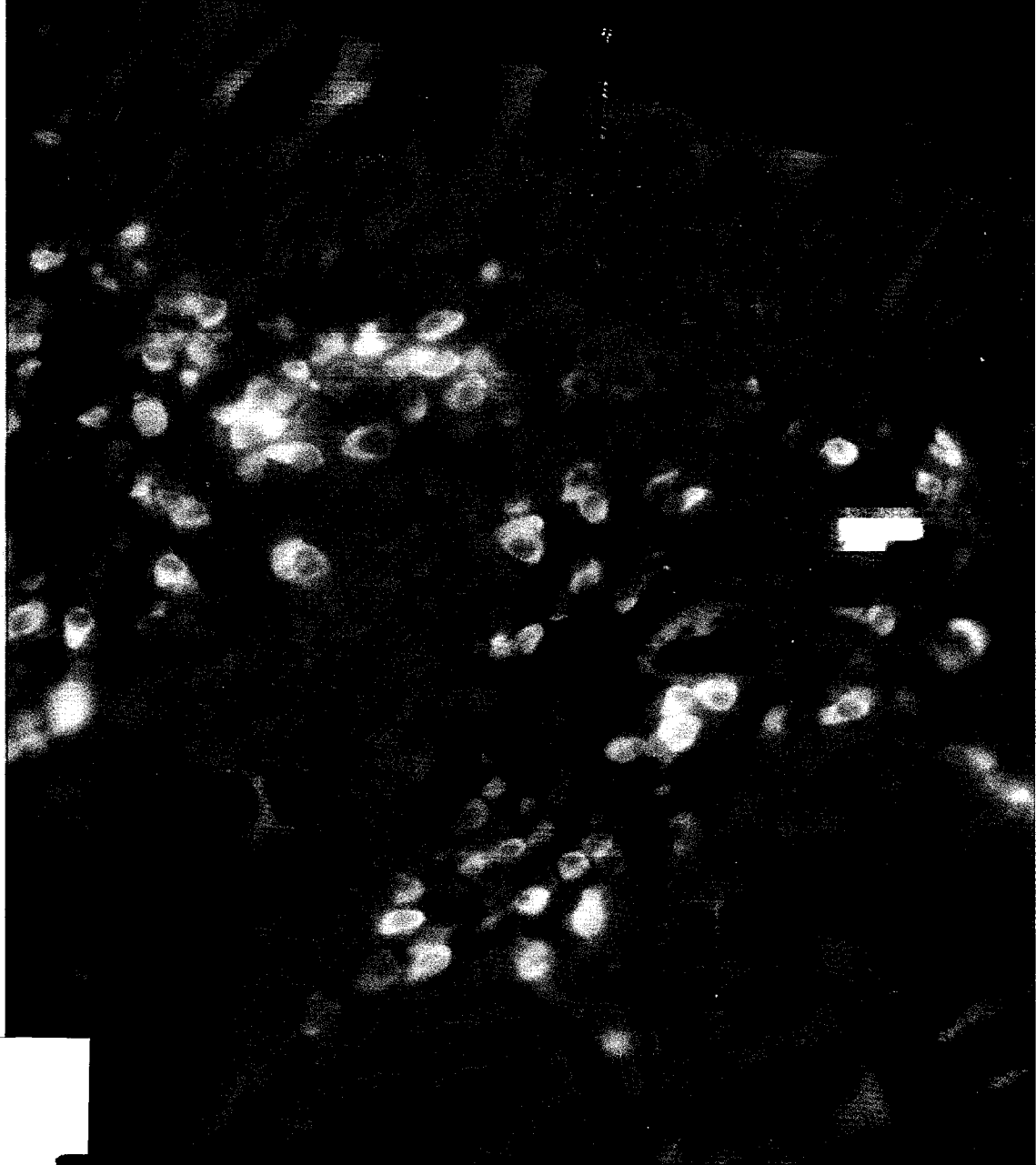


MANIFESTAÇÕES SISTÊMICAS DA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

FERNANDO TAVARELA VELOSO



MANIFESTAÇÕES SISTÉMICAS DA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

ESTUDO CLÍNICO E IMUNOPATOLÓGICO

FERNANDO TAVARELA VELOSO

FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO/1982

**DISSERTAÇÃO APRESENTADA À FACULDADE DE MEDICINA
DA UNIVERSIDADE DO PORTO, PARA OBTENÇÃO
DO GRAU DE DOUTOR EM MEDICINA INTERNA**

Trabalho realizado na Unidade de Gastrenterologia (Director: Professor Tomé Ribeiro) e no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina do Porto (Director: Professor Daniel Serrão). O estudo efectuado foi subsidiado pelo Centro de Anatomia Patológica e Oncologia do Instituto Nacional de Investigação Científica, e a sua publicação subsidiada pela Fundação Calouste Gulbenkian.

Art.º 48.º, § 3.º — A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação.

(Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto, 28 de Janeiro de 1951. — Decreto n.º 19.337)

**AO CORPO CATEDRÁTICO DA
FACULDADE DE MEDICINA DO PORTO**

A MINHA MULHER
AO FILIPE E À RITA

Foram muitos e constantes os estímulos e ajudas recebidos ao longo destes anos de trabalho. A orientação científica deve-se ao Senhor Professor Daniel Serrão. A amizade e interesse com que há muitos anos nos tem guiado, os avisados conselhos e a confiança com que sempre acolheu as nossas ideias e resultados, agradecemos com a promessa do nosso constante esforço no cumprimento do dever, que nos compete, como seu discípulo.

Igualmente do Senhor Professor Tomé Ribeiro, a quem muito devemos da nossa formação profissional, recebemos o apoio do seu incitamento e a orientação do seu conselho amigo, bem como o interesse posto na cuidadosa revisão do manuscrito.

Aos Senhores Professores Emídio Ribeiro e Cerqueira Magro, ficamos a dever os convites para pertencermos ao corpo docente da nossa Faculdade, os valiosíssimos ensinamentos e o exemplo, que junto deles procuramos apreender e seguir.

Ao Senhor Professor Vaz Saleiro, queremos testemunhar o nosso reconhecimento pela colaboração constante e a amabilidade com que nos auxiliou nos estudos histológicos e ultrastruturais.

Ao Senhor Professor Lopes Vaz, que nos prestou a sua preciosa orientação no estudo dos doentes com manifestações reumáticas, queremos expressar a nossa gratidão.

Aos Senhores Professores Nuno Grande, Carneiro Chaves e Falcão de Freitas, agradecemos a amizade e o interesse com que nos auxiliaram no começo da nossa vida universitária.

Aos Senhores Doutores Armando Mendes e Rosa Araújo, agradecemos o interesse que demonstraram pelo nosso trabalho, tornando possível a realização de estudos imunológicos nos laboratórios que dirigem.

Aos colegas e amigos que de algum modo nos auxiliaram em diferentes momentos da elaboração deste trabalho, o nosso obrigado.

Ao pessoal de enfermagem da Unidade de Gastrenterologia e ao pessoal técnico do Serviço de Anatomia Patológica que connosco colaboraram, testemunhamos a nossa gratidão.

Devemos à Fundação Calouste Gulbenkian, a concessão de um subsídio para a publicação deste trabalho. Pelo valioso auxílio prestado, aqui manifestamos o nosso reconhecimento.

Ao Senhor Professor Ian Dawson, agradecemos a observação crítica e os comentários estimulantes que fez ao nosso estudo de imuno-fluorescência.

Finalmente, à Senhora Professora Margot Shiner, pelo interesse manifestado em diversas fases do trabalho e a atenção com que connosco discutiu muitos problemas, esclarecendo dúvidas e prestando preciosos ensinamentos, um sentimento de gratidão especial. Pelo significado que contém, transcrevemos a apreciação que fez ao nosso trabalho: «I know and value Dr. Veloso's work and have acted as an advisor on many of his scientific papers. His clinical and research work is thorough and he has obtained important results as judged by international standards».

O presente trabalho que, confiadamente, submetemos à apreciação do Douto Júri que o vai julgar, insere-se numa linha de investigação cultivada durante alguns anos e surge como consequência natural dessa actividade.

— / —

Pela legislação que regulamenta as normas a que deve obedecer a elaboração da dissertação de doutoramento, esta poderá englobar resultados de trabalhos já publicados. São utilizados nesta dissertação dados publicados nos seguintes trabalhos :

Tavarela Veloso F, Lopes Vaz A, Tomé Ribeiro A, Mendes A. HLA and complement in the arthritis of the inflammatory bowel disease. Proc. VI World Congress of Gastroenterology, Madrid. Abstract Book, 234, 1978.

Saleiro J V, Tavarela Veloso F. Blebs involving the microvillous border in ulcerative colitis. Journal Submicroscopic Cytology. 12 : 687-9, 1980.

Tavarela Veloso F, Saleiro J V. Heterogeneity of plasma cells in Crohn's disease — An electron microscopic analysis. *Journal Submicroscopic Cytology*, 13: 57-62. 1981.

Tavarela Veloso F. Imunoglobulina E (IgE) na mucosa rectal de doentes com colite ulcerosa. *Jornal da Sociedade das Ciências Médicas de Lisboa*, 48 : 47-52, 1981.

Tavarela Veloso F, Fleming Torrinha J, Tomé Ribeiro A. Imunoglobulinas séricas na colite ulcerosa e doença de Crohn. *Acta Médica Portuguesa*, 3 : 37-42, 1981.

Tavarela Veloso F, Almeida G, Saleiro J V, Lopes Vaz A. Colite ulcerosa e artrite — estudo clínico e imunológico. *Reumatologia Multidisciplinar*, 1 : 23-27, 1981.

Tavarela Veloso F, Saleiro J V, Baptista F, Emidio Ribeiro. Whipple's Disease : report of a case with clinical immunological studies. *American Journal of Gastroenterology*, 75 : 419-25; 1981.

Tavarela Veloso F. «Whipple's bacillus». *Digestive Disease and Sciences*, 27 : 283, 1982.

Tavarela Veloso F, Saleiro J V. Whipple's disease : Antibacterial immunofluorescence reactions in macrophages. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 106 : 153, 1982.

Tavarela Veloso F, Saleiro J V, Cruz I, Freitas J, Pinto T, Marvão L. Whipple's disease : antibacterial immunofluorescent studies of four cases. *Proc. VII World Congress of Gastroenterology, Stockholm. Scandinavian Journal of Gastroenterology* 17, Suppl. 78: 438, 1982.

Tavarela Veloso F, Lopes Vaz A. The arthritis associated with inflammatory bowel disease. *Proc. VII World Congress of Gastroenterology, Stockholm. Scandinavian Journal of Gastroenterology* 17, Suppl. 78 : 351, 1982.

Tavarela Veloso F, Saleiro J V. Mast cell/IgE/eosinophils in ulcerative colitis. Proc. VII World Congress of Gastroenterology, Stockolm. Scandinavian Journal of Gastroenterology 17, Suppl. 78 : 350, 1982.

Tavarela Veloso F, Saleiro J V. Immunocytes in Crohn's disease — immunohistochemical and electronmicroscopy studies. Proc. VII World Congress of Gastroenterology, Stockholm. Scandinavian Journal of Gastroenterology 17, Suppl. 78 . 446, 1982.

Tavarela Veloso, F, Saleiro J V. Mast cells in Whipple's disease. Journal Submicroscopic Citology, 14 : 515-20, 1982.

Tavarela Veloso F, Saleiro J V. Difficulty in Whipple's Diagnosis. Gastroenterology, 83 : 728-9, 1982.

Tavarela Veloso F, Saleiro J V, Ortigão Oliveira A, Falcão Freitas A. Atypical plasma cells in alpha-chain disease. Cancer, in press.

Tavarela Veloso F, Lopes Vaz A, Saleiro J V. The arthritis of inflammatory bowel disease — A clinical and immunopathological study. Clinical Rheumatology, in press.

INTRODUÇÃO

A doença inflamatória do intestino compreende fundamentalmente duas entidades anátomo-clínicas de etiologia desconhecida — doença de Crohn e colite ulcerosa. O seu agrupamento no epónimo de doença inflamatória intestinal, resulta de apresentarem grande semelhança nos aspectos clínico, epidemiológico e imunológico (1-4). Uma percentagem considerável destes doentes sofre em determinado momento da evolução clínica, de uma ou mais complicações extra-intestinais. Praticamente, todos os órgãos podem ser atingidos o que determina uma constelação de problemas raramente encontrados em qualquer outra doença humana.

Decorridos mais de um século após a descrição inicial da colite ulcerosa e 50 anos desde que Crohn baptizou a ileíte regional, quase todos os aspectos da doença — etiologia, evolução, complicações e terapêutica — continuam mal conhecidos (5-16).

O desejo de estabelecer associação entre manifestações clínicas externas e doenças internas obscuras é tão velho como a própria medicina. Com efeito, a patogenése das manifestações sistémicas da doença inflamatória intestinal e a sua relação com a lesão intestinal, permanece não totalmente esclarecida. Todavia, algumas manifestações periféricas da doença revestem-se de particular significado no que diz respeito à interpretação patogénica, como as que podem depender de um mecanismo de «hipersensibilidade» relacionado com a lesão intestinal e que compreendem, especialmente, as complicações com expressão nas articulações, pele, boca e olhos (3,7). De facto, a revisão da literatura sobre as complicações extra-intestinais da doença inflamatória intestinal, revelou-nos a dificuldade que tem sido encontrada na sua interpretação patogénica, o que justificou que tivéssemos estudado este problema nos nossos doentes. Ao fazê-lo, tivemos presente que poucas situações médicas serão mais complexas que a doença inflamatória do intestino, pelo que esta constitui um desafio para quem procurar compreendê-la e ocupar-se dela.

No trabalho que realizamos, procuramos averiguar através do estudo clínico, imunológico e histopatológico a existência de pontes de ligação entre aspectos intestinais e extra-intestinais da doença.

Efectuamos um estudo clínico prospectivo em 100 doentes com doença inflamatória do intestino, incidindo a nossa atenção nas complicações extra-intestinais. Em virtude da grande heterogeneidade dos doentes com doença inflamatória do intestino, torna-se indispensável o estudo de subgrupos clínicos com semelhanças. Uma das finalidades da investigação clínica realizada, foi saber se as várias manifestações sistémicas surgem associadas entre si com maior frequência do que seria de esperar, o que pode sugerir a existência de um factor causal comum para as diferentes expressões da doença. Procuramos saber se as complicações extra-intestinais são idênticas e se têm incidência semelhante na doença de Crohn e na colite ulcerosa, tornando verosímil a hipótese de dependerem de um denominador comum — a lesão inflamatória do intestino. Com a mesma finalidade tentamos observar durante a evolução da doença a existência de simultaneidade no aparecimento das manifestações intestinais e extra-intestinais, bem como de sincronismo nas remissões induzidas pela terapêutica.

A hipótese das manifestações sistémicas representam uma resposta não específica à inflamação intestinal é reforçada pelo facto de algumas das complicações referidas não serem exclusivas da doença de Crohn e da colite ulcerosa. Efectivamente, ocorrem também manifestações sistémicas associadas a outras doenças intestinais em cuja patogenia participam agentes bacterianos, como se verifica na doença de Whipple e nas enterites por *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter* (17-22). Complicações semelhantes podem também verificar-se na enteropatia que surge após derivação jejuno-ileal para tratamento da obesidade e que se considera resultar da proliferação bacteriana anormal no intestino (23). De facto, a infecção é um factor importante no desencadear da maioria das doenças reumatismais com base genética, conforme se verifica na espondilite anquilosante (24-25). Por outro lado, observa-se, também, na doença inflamatória intestinal, associação com espondilite anquilosante, quer a nível individual, quer a nível familiar (26-28). Em conclusão, as espondiloartropatias sero-negativas da doença de Crohn e da colite ulcerosa, da doença de Whipple, da enteropatia de derivação e da doença de Reiter pós enterite bacteriana apresentam grande afinidade de manifestações clínicas (25,29-33). Pensamos,

portanto, que por analogia, as complicações extra-intestinais da doença inflamatória do intestino poderiam estar relacionadas com antígenos bacterianos absorvidos no intestino e influenciadas por predisposição genética.

Grande diversidade de alterações imunológicas têm sido descritas, quer na doença de Crohn, quer na colite ulcerosa, às quais se atribui importância na patogenia das manifestações extra-intestinais. De entre as alterações descritas, reveste-se de interesse particular, o estudo de complexos imunológicos, uma vez que as manifestações da doença inflamatória intestinal apresentam grande semelhança com as que ocorrem em doenças reconhecidamente provocadas por este mecanismo (34-48). Com efeito, na doença inflamatória intestinal foram demonstrados complexos imunológicos circulantes que apresentam correlação positiva, com a actividade e duração da doença intestinal e com a presença de manifestações extra-intestinais (39). Também na doença de Whipple, nas enterites bacterianas e na «enteropatia de derivação», complicadas de artrite, foram observados complexos imunológicos circulantes (23,40,41). A sua identificação não implica necessariamente, que sejam importantes na patogénese, todavia devemos recordar que o potencial dos complexos imunológicos para causar lesão inflamatória encontra-se estabelecido e que a sua presença nos deve alertar na procura dos efeitos patogénicos (42). Na doença inflamatória intestinal, uma combinação de reacções de imunidade humoral e celular, envolvendo formas de indução e de supressão, tem sido descrita em resposta a antígenos do lume intestinal (43). Quais os aspectos imunológicos que são de importância etiopatogénica e quais são simples epifenómenos, permanece desconhecido. Independentemente desta dúvida, os complexos imunológicos poderiam ser responsabilizados, conforme dissemos, pelas manifestações à distância, isto é, pelas complicações extra-intestinais e o seu estudo futuro pode abrir uma janela na compreensão da sua patogenia (44-45).

Procuramos verificar a existência de alterações imunológicas comuns à doença de Crohn e à colite ulcerosa, bem como estabelecer correlações entre aspectos imunológicos e clínicos. Analisamos, particularmente, aspectos da imunidade relacionados com hipersensibilidade mediada por anticorpos (46). Assim, efectuamos determinações séricas das imunoglobulinas, do complemento total e de algumas das suas fracções, de complexos imunológicos, e das células B circulantes. Num grupo de

doentes com complicações articulares, efectuamos determinações do complemento no líquido sinovial (47-48).

Os factores que influenciam a intensidade da resposta imunológica, que pode ser geneticamente determinada, revestem-se de grande importância nas doenças com participação de complexos imunológicos, embora o estudo desses factores se encontre ainda em fase inicial. O conceito da vulnerabilidade individual, ou talvez, da resistência ao desenvolvimento das complicações extra-intestinais, tornou-se mais atractivo, após os novos conhecimentos do sistema de histocompatibilidade e da sua relação com os mecanismos imunológicos geneticamente influenciados e com possíveis deficiências do sistema do complemento. Neste sentido, realizamos determinações do antigénio de histocompatibilidade, especialmente, nos doentes com artrite associada à doença inflamatória intestinal (49).

Muitos dos aspectos morfológicos da doença de Crohn e da colite ulcerosa sugerem a participação de mecanismos imunológicos na patogénese das lesões intestinais. A presença de grandes áreas de mucosa intestinal inflamada, condiciona que o tubo intestinal perdendo a sua capacidade estanque, possa permitir aumento da absorção de antigénios do lume intestinal, que atravessando a barreira da mucosa ocasionem a formação de complexos imunológicos locais combinando-se com os anticorpos apropriados (50). Ocasionalmente, estes complexos imunológicos ao depositar-se nos tecidos, poderiam causar artrite, eritema nodoso, estomatite ulcerosa e irite, complicando o curso clínico de alguns doentes com doença inflamatória intestinal (37-39, 51).

Estudámos aspectos da resposta imunológica da mucosa rectal em doentes com doença de Crohn e colite ulcerosa, utilizando técnicas de imunofluorescência e de ultraestrutura, no sentido de procurar alterações morfológicas que possam reflectir uma resposta ao aumento da penetração antigénica, através da barreira epitelial lesada. Com esta finalidade, realizámos o estudo quantitativo e qualitativo da população de células encarregadas da produção de imunoglobulinas, ou seja, pesquisamos alterações nos plasmócitos indicadoras da estimulação da produção de anticorpos (52,53). Efectuámos, também, o estudo do sistema mastócito/IgE/eosinófilo em diferentes fases de actividade da doença inflamatória intestinal e pesquisamos sinais de desgranulação destas células (54,55). É possível que fenómenos de hipersensibilidade na mucosa intestinal ocorram em consequência da penetração de antigénios bacterianos comuns

aos existentes nos helmintas (56,57). Uma vez que os agentes bacterianos podem participar na imunopatogénese das manifestações sistémicas, realizámos a pesquisa por ultramicroscopia de bactérias na mucosa intestinal, em biópsias de doentes com doença inflamatória intestinal. Em 4 doentes com doença de Whipple, procuramos determinar se o padrão de fluorescência antibacteriana dos macrófagos que contêm produtos de degradação do «bacilo de Whipple», apresenta antigénios comuns a outros agentes bacterianos, reconhecidamente associados com artrite reactiva (17, 52, 58, 61-63).

Nas biópsias rectais procuramos identificar depósitos simultâneos de imunoglobulinas e de complemento, eventualmente tradutores da presença de complexos imunológicos. Nas biópsias sinoviais colhidas em doentes com artrite, nas biópsias da pele de lesões de eritema nodoso e de «pyoderma gangrenosum», e em lesões de estomatite aftosa, pesquisámos por microscopia óptica e por imunofluorescência, alterações sugestivas do depósito de complexos imunológicos (48).

No trabalho que realizámos, procuramos conjugar aspectos de gastroenterologia clínica, de imunologia e de morfologia, visto que a análise da participação de mecanismos imunológicos na patogénese das manifestações intestinais e extra-intestinais deve basear-se em observações clínicas, imunológicas e histológicas (36). Temos perfeita consciência da enorme importância de que se revestem os aspectos enunciados, assim como, das deficiências e limitações que surgem no estudo destas complexas doenças, que têm ocupado várias gerações de investigadores. Conforme refere Kirsner, para decifrar os segredos da doença inflamatória do intestino torna-se necessário encontrar uma chave, como aconteceu com a Pedra Roseta ao desvendar os segredos da civilização egípcia, ciosamente guardados durante vários milhares de anos. No trabalho que realizámos, interessou-nos, sobretudo, a exploração de caminhos que falta percorrer para compreensão de aspectos clínicos destas enigmáticas doenças.

MATERIAL E MÉTODOS

Estudamos de forma prospectiva, na Unidade de Gastreenterologia, doentes com diagnóstico de doença inflamatória do intestino (doença de Crohn e colite ulcerosa), observados na consulta externa ou no internamento, durante os anos de 1975 a 1981, inclusivé. Além destes, estudamos alguns outros internados em Serviços de Medicina e de Cirurgia. Todos passaram a ser seguidos por nós, na consulta de Doença Inflamatória Intestinal, que criamos dentro da Unidade. São coligidos os resultados dos estudos efectuados em 40 doentes com doença de Crohn e em 60 doentes com colite ulcerosa, observados consecutivamente.

CRITÉRIOS DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO

DOENÇA DE CROHN

Para o diagnóstico de doença de Crohn, utilizamos a metodologia seguido pelo grupo cooperativo para estudo daquela doença (65).

Consideramos a existência de doença de Crohn no intestino delgado, quando se verificaram alguns dos seguintes critérios: 1 — doença inflamatória crónica do intestino delgado, com aspectos radiográficos típicos (66) ou com lesões histológicas características na biópsia ou em segmento intestinal ressecado cirurgicamente (67); 2 — lesões intestinais demonstradas durante intervenção cirúrgica e confirmadas pela presença de granuloma sem caseificação em gânglio linfático mesentérico. Consideramos a existência de doença de Crohn do colon, quando pelo menos um dos seguintes critérios estava presente: 1 — doença inflamatória do colon com envolvimento acentuado do intestino delgado, apresentando características radiográficas da doença de Crohn (68); 2 — doença inflamatória do colon, em que as características radiográficas (69) ou histológicas eram semelhantes às consideradas para a enterite regional (70); 3 — doença inflamatória segmentar do colon e com normalidade da

mucosa rectal confirmada por biópsia; 4 — doença inflamatória do colon associada com fistulas (74).

COLITE ULCEROSA

Para o diagnóstico de colite ulcerosa utilizamos os critérios definidos por Schachter e Kirsner (72), considerando obrigatória a presença de pelo menos três dos seguintes critérios (73); 1 — história clínica de diarreia com sangue ou rectorragias nos intervalos das dejectões, durante mais de uma semana, ou em períodos repetidos; 2 — aspectos endoscópicos (compreendendo no mínimo duas das seguintes características): mucosa granitada ou friável, sangue ou pús no lume intestinal, ulcerações grandes ou punctiformes, pseudopólios (74); 3 — biópsia rectal com sinais inflamatórios característicos (74); 4 — sinais radiográficos: espiculado, ulcerações (formando duplo contorno), pseudopólipos (68).

MANIFESTAÇÕES SISTÊMICAS

Para cada doente foi preenchido um inquérito sobre a história da doença incluindo as manifestações extra-intestinais e registou-se a presença ou ausência de artrite periférica, espondilite anquilosante, irite, eritema nodoso, «pyoderma gangrenosum» e estomatite ulcerosa (75).

O diagnóstico de artrite periférica foi feito com base na história de um ou mais ataques de sinovite com tumefacção articular dolorosa, sem evidência de outra causa e ainda na maioria dos doentes pelo exame objectivo de artrite aguda. O diagnóstico de espondilite anquilosante obedeceu aos critérios de Nova York (76). Não foram considerados doentes com artralguas isoladas e mialgias não específicas.

As alterações cutâneas pesquisadas compreenderam o eritema nodoso e o «pyoderma gangrenosum». Na mucosa da boca, procuramos lesões de estomatite com base na história e observação de ataques recorrentes de úlceras na boca, semelhantes a aftas.

O diagnóstico de irite foi efectuado pela história clínica ou exame objectivo e o de uveíte foi efectuado em exame oftalmológico.

ESTUDO ANALÍTICO

Realizaram-se os seguintes exames: hemograma, velocidade de sedimentação, ureia, glicose, transaminase glutâmica oxalacética e transaminase glutâmica pirúvica, fosfatase alcalina, bilirrubina directa e total, proteínas totais e electroforese, ferro sérico, exame sumário de urina, exame parasitológico e bacteriológico de fezes com pesquisa de amibas no raspado da mucosa rectal. Em alguns casos efectuaram-se prova da d-xilose e teste de Schilling.

As colheitas de sangue para realização de estudos imunológicos foram efectuadas, sempre que possível, antes do começo da terapêutica. Utilizaram-se diferentes provas para avaliação da actividade imunológica. As imunoglobulinas séricas IgG, IgA, IgM e IgE, as fracções do complemento C₃ e C₄, as proteínas séricas haptoglobina, transferrina e α_1 anti-tripsina, foram determinadas por imunodifusão radial, utilizando reagentes «Behringwerk». (77-78).

O doseamento da actividade hemolítica total do complemento (CH₅₀), no sangue e liquido sinovial, foi determinado com base na técnica de Kabat e Mayer (79). A pesquisa dos factores anti-nucleares e anti-mitocondria foi feita utilizando técnicas de imunofluorescência indirecta (80, 81) e a determinação do factor reumatóide pela reacção de Waaler-Rose (82). Efectuaram-se contagens dos linfócitos T e B, (83-84) e pesquisaram-se complexos imunológicos circulantes (85).

Foram realizados estudos in vitro com testes de transformação blástica dos linfócitos e de inibição da migração leucocitária, com estimulação pela fitohemaglutinina (86, 87). Foram efectuadas intradermorreacções utilizando a Tuberculina PPD, Berna na diluição de 1/100. Procedeu-se ainda ao estudo de antígenos dos «loci» A e B do sistema de histocompatibilidade - HLA (88).

Estes estudos foram realizados nos Serviços de Imunologia e Reumatologia desta Faculdade e no Serviço de Sangue do Hospital S. João.

ESTUDO MORFOLÓGICO

Utilizamos para estudo histológico e imunohistoquímico o seguinte material: biópsias rectais obtidas em 45 doentes com colite ulcerosa e em 24 doentes com doença de Crohn; tecido sinovial obtido em 7 doentes

com artrite enteropática; biópsias cutâneas de «pyoderma gangrenosum», de eritema nodoso e de úlceras da boca de 6 doentes.

As biópsias rectais utilizadas como controlo, foram colhidas em 15 doentes com hemorróides, sem alteração de trânsito intestinal nem lesões da mucosa aos exames endoscópico e histológico.

As biópsias rectais foram realizadas a 10-12 cm. do canal anal, orientadas em lamelas de vidro e fixadas em soluto de Bouin. Utilizaram-se como métodos de rotina para observação em microscopia óptica, as colorações com hematoxilina-eosina e PAS. A classificação das biópsias foi efectuada por um anátomo-patologista sem conhecimento da informação clínica e endoscópica, segundo grupos constituídos por diferentes graus histológicos de inflamação (74, 89).

ESTUDO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA

A escolha do método imunohistoquímico para estudo da distribuição e quantidade de células imuno-secretoras, teve em conta a necessidade de se conseguir boa preservação dos aspectos morfológicos e da actividade imunológica das determinantes antigénicas. Utilizamos basicamente a técnica de imunofluorescência descrita por Dorsett (90). As biópsias após colheita, foram orientadas em lamelas de vidro, introduzidas rapidamente em soluto de Bouin e incluídas em parafina a temperatura inferior a 56° C. Efectuaram-se cortes seriados com 4 μ de espessura, que se desparafinaram através de lavagens com xilol, etanol absoluto, etanol a 95 % e etanol a 80 %. Os cortes foram seguidamente rehidratados com tampão fosfato salino a pH 7,2 sob a agitação constante, durante duas horas. A conjugação efectuou-se com imunossoros anti-cadeia pesada, fragmento IgG/F(ab)₂, monoespecífico para imunoglobulinas humanas e anti C₃ marcados pela fluoresceína ou rodamina e comercializados por «Behringwerke» e «Dacko». Os imunossoros foram diluídos em fosfato salino e utilizados em concentrações variáveis de 1 para 10 a 1 para 50. Após conjugação com um ou dois fluorocromos, as lâminas foram incubadas em câmara húmida à temperatura ambiente, durante uma hora, seguindo-se a remoção do anticorpo não ligado à proteína com lavagens em solução salina sob agitação. A preceder a montagem que foi efectuada com glicerina tamponada com carbonato a pH 9,0 aplicou-se soluto de azul de Evans (91) para melhorar o contraste da

fluorescência produzida pela fluorescência. A observação efectuou-se em microscópio de epi-fluorescência Nikon, utilizando-se luz azul ou verde e combinação adequada de filtros. As fotografias foram obtidas em filme colorido (Agfa 50 L). Foi realizada dupla exposição para obtenção no mesmo diapositivo de células marcadas pela fluoresceína e rodamina. Utilizamos para controlo da especificidade da reacção de imunofluorescência testes indirectos, de bloqueamento e de absorção (92).

A quantificação dos imunócitos foi efectuada em unidades de mucosa (93), definidas por um comprimento de 500 μ e altura correspondente à distância da superfície epitelial à «muscularis mucosae», sendo considerados apenas cortes sagitais. Uma média de 4 a 6 unidades foi fotografada em cada secção histológica, sendo este número calculado pela técnica da média das somas (94). Os diapositivos foram projectados a uma ampliação total de 500 vezes sendo contadas as células com citoplasma verde bem definidas. As secções histológicas foram reexaminadas após coloração com hemotoxilina-eosina.

A imunofluorescência dos fragmentos de sinovial, pele e mucosa da boca, foi praticada em cortes de tecido fixado em Bouin e incluído em parafina, e os dados obtidos foram confrontados com cortes adjacentes corados pela hematoxilina-eosina para exacta identificação das zonas imunorreactivas.

ESTUDO DE ULTRASTRUTURA

No estudo ultraestrutural foram utilizados fragmentos de biópsias rectais obtidas em 12 doentes com doença de Crohn e em 12 doentes com colite ulcerosa.

A fixação dos fragmentos fez-se por imersão em glutaraldeído a 4% tamponado com cacodilato de sódio a 0,1M, a pH 7,4, durante 2 horas e à temperatura de 4° C e pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1 % em tampão fosfato. A desidratação efectuou-se através de passagens sucessivas em soluções progressivamente mais concentradas de etanol e a inclusão efectuou-se numa mistura total de epon 812, segundo método estabelecido (95). Os cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina e os cortes ultra-finos uma vez recolhidos em grelha de malha de cobre, sem revestimento, foram sucessivamente corados com acetato de uranilo, em solução aquosa de citrato de chumbo. Estes cortes

efectuaram-se em ultra micróto mo LKB e foram observados em microscópio electrónico Jeol-100 U.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cálculos referentes à associação de complicações extra-intestinais no mesmo doente e às determinações do antigénio de histocompatibilidade foram efectuados pelo teste qui-quadrado, com correcção de Yates, sempre que os resultados o permitiram.

Os valores obtidos nos estudos analíticos e morfológicos foram expressos em média $\pm$ desvio padrão da média. A significância estatística das diferenças entre grupos, foi avaliada pelo teste *t* de Student. Foram considerados significativos os valores de *P* inferiores a 0,05.

RESULTADOS

I — ESTUDO CLÍNICO

DOENTES COM DOENÇA DE CROHN

Foram estudados 40 doentes. A média da idade dos doentes foi de $27,8 \pm 9,5$ anos, variação dos 10 aos 66 anos. Na distribuição por sexos, verificou-se que 19 doentes (47 %) eram do sexo masculino e 21 (53 %) do sexo feminino (Fig. 1). Foram incluídos no estudo dois irmãos de sexo diferente.

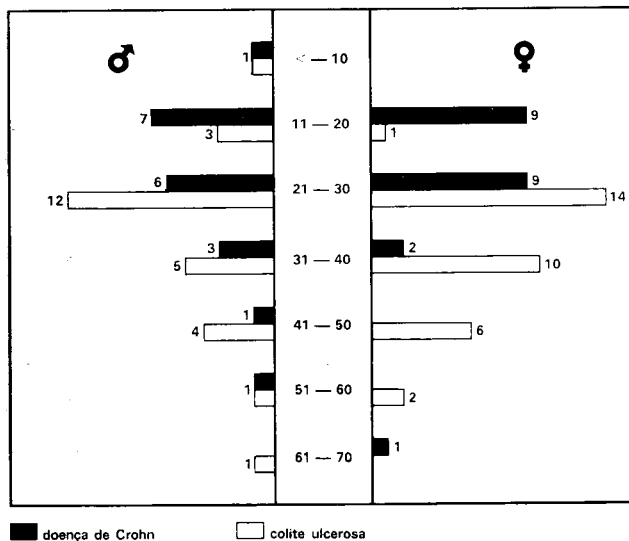


Fig. 1 — Distribuição por idades e sexos de 100 doentes com doença inflamatória intestinal.

A idade de começo dos sintomas oscilou entre os 10 e 49 anos, média de $23,6 \pm 8,2$ anos. Em 33 doentes (83%) os sintomas surgiram antes dos 30 anos, sendo em 17 (43%) abaixo dos 20 anos e em 16 (40%) entre os 20 e 30 anos (Fig. 1). O tempo médio que decorreu entre o início dos sintomas e o diagnóstico foi de 2,6 anos, com variação 0,5 a 13 anos. O diagnóstico da doença de Crohn, foi efectuado na maioria dos casos, durante a realização deste estudo.

Necessitaram de internamento hospitalar 34 doentes (85 %), sendo 15 (38 %) internados apenas uma vez, 8 (20 %) internados três vezes

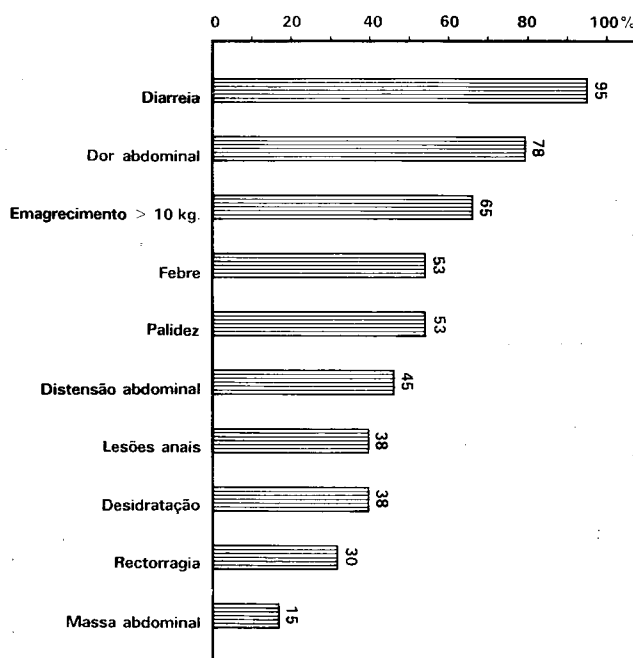
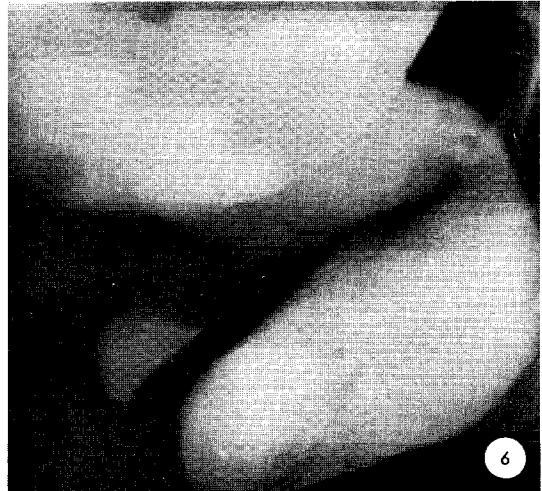
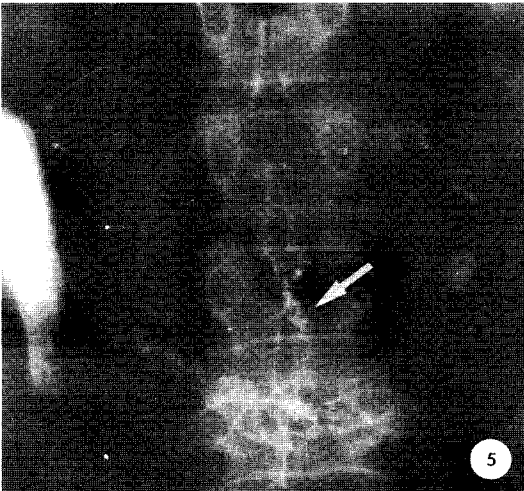


Fig. 2 — Doença de Crohn: manifestações clínicas no período de doença activa.

e 5 (13 %) internados por mais de seis vezes. Os sintomas mais frequentes durante o período da doença activa foram (Fig. 2): diarreia referida por 38 doentes (95%), dor abdominal em 31 (78%), emagrecimento superior a 10 Kg foi observado em 26 (65%), dos quais 11 tiveram emagrecimento superior a 20 Kg (28%), febre em 21 (53%),



FÍSTULAS NA DOENÇA DE CROHN

Figs. 3, 5 — Orifício externo de fistula umbilico-cólica, evidenciada na fistulografia.

Figs. 4 — Fístula anal múltipla; 6 — Fístula recto-vaginal.

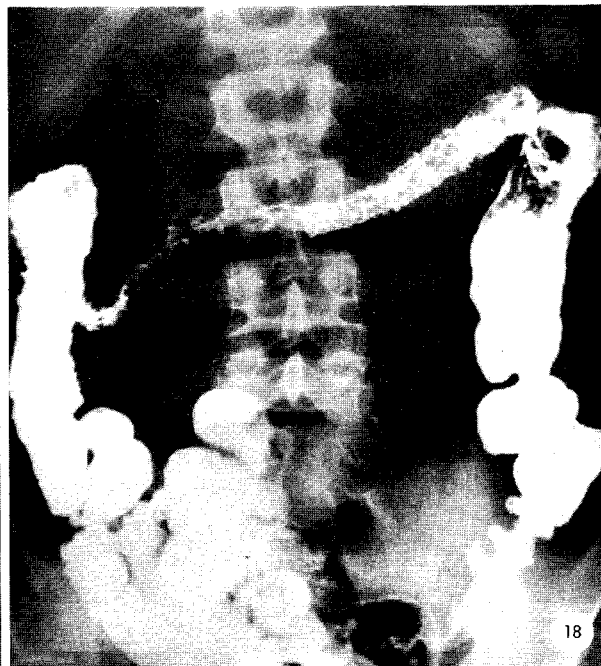
Figs. 7 — Fístula entero-cutânea; 8 — Fístula íleo-sigmoideia.



DOENÇA DE CROHN ILEAL E ÍLEO-CÓLICA

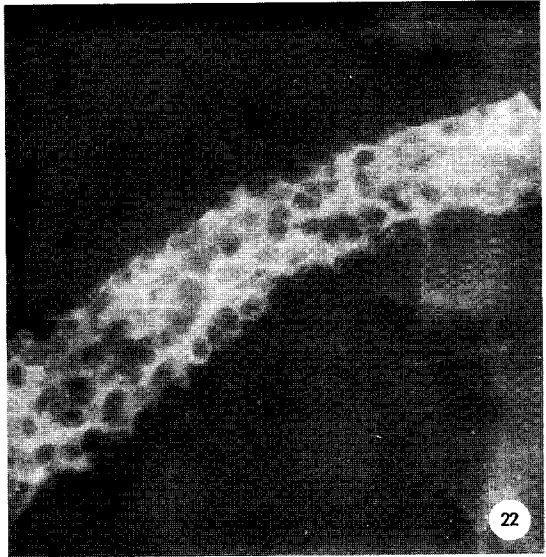
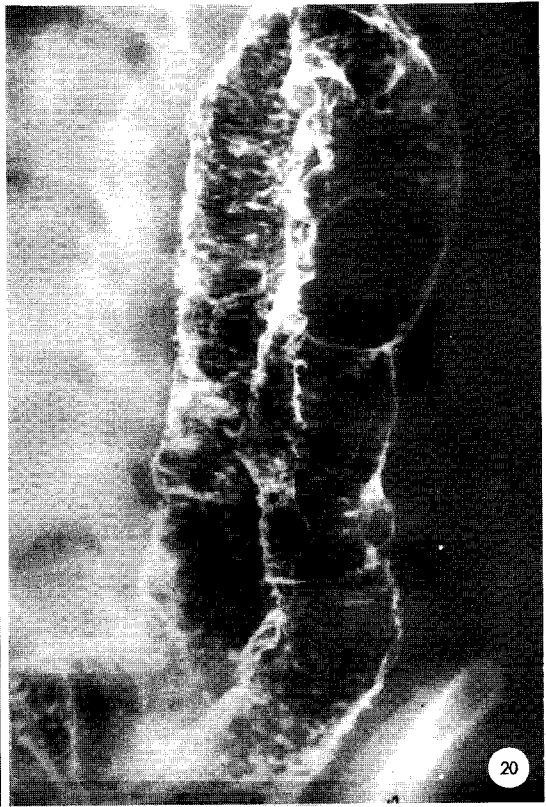
Figs. 9, 10 — Localização íleo-cólica em dois irmãos; 11 — Aspecto em «corda» do íleo terminal.

Figs. 12, 13 — Aspecto geódico do íleo e cego; 14 — Estenose ileal.



COLITE DE CROHN

Figs. 15 — Descontinuidade das lesões; 16 — Atingimento assimétrico da parede intestinal.
 Figs. 17 — Estenose excêntrica do sigmóide; 18 — Pseudopolipose da parte proximal do colon.



COLITE DE CROHN

Figs. 19 — Encurtamento e aperto do colon; 20 — Ulcerações superficiais da mucosa.

Figs. 21 — Ulcerações profundas (duplo contorno); 22 — Pseudopolipose do colon transverso.

palidez da pele e mucosa em 21 (53 %), distensão gasosa do abdomen em 18 (45 %), desidratação em 15 (38 %), hemorragia intestinal em 12 (30 %), edema maleolar em 6 (15 %), massa abdominal palpável em 6 (15 %). Observaram-se complicações perianais em 15 doentes (38%). Fistula perianal ocorreu em 11 doentes (28%) e em três doentes (8%) havia lesão destrutiva do ânus (Fig. 4). Verificou-se abscesso perianal em 7 (18 %) e estenose do canal anal em 3 (8 %). Ocorreram fistulas internas em 5 doentes (13 %) e externas em 3 doentes (8 %) (Figs. 3-8). Num caso observamos fistula espontânea entre o colon e o umbigo, o que consitui uma complicação, extraordinariamente rara (96, 97). As fistulas perianais tinham sido tratadas previamente, de forma cirúrgica em 7 casos (18 %), resultando num doente incontinência anal. Alguns doentes com fistulas múltiplas, bem como o que apresentou fistula umbilical melhoraram pelo tratamento médico com corticosteróides, metronidazol ou 6 - mercaptopurina.

Observaram-se complicações extra-intestinais em 12 doentes (30%) (Quadro I). Estas manifestações sistêmicas surgiram associadamente entre si em 10 doentes e isoladamente em 2 doentes. Verificaram-se

QUADRO I
COMPLICAÇÕES EXTRA-INTESTINAIS

Artrite periférica	23%
Espondilite anquilosante	5%
Eritema nodoso	20%
«Pyoderma gangrenosum»	5%
Estomatite aftosa	25%
Irite	8%
Lesão hepática	5%
Litíase renal	15%
Flebite	13%

manifestações articulares em 11 doentes (28 %), sendo de sinovite periférica em 9 (23 %) e de espondilite anquilosante em 2 (5 %). As complicações muco-cutâneas observadas foram: úlcera de boca em 10 (25 %), eritema nodoso em 8 doentes (20 %) e «pyoderma gangreno-

sum» em 2 doentes (5%). Ocorreram lesões oculares em 3 doentes (8%). Dois doentes tiveram icterícia (5%). Verificou-se litíase renal em 6 doentes (15%), flebite nos membros inferiores em 5 (13%) e trombose arterial em 2 (5%).

Na análise dos exames laboratoriais (Quadro II), verificamos valores de hemoglobina inferiores a 10g/100ml em 18 doentes (45%) e inferiores a 6g/100ml em 5 (13%). Encontramos leucocitose superior a 7 000 em 35 doentes (88%) e maior que 10 000 em 21 (53%), com valor extremo de 29 600. Em 21 doentes (53%) o valor da albumina foi inferior a 3g/100ml e em 3 (8%) menor que 2g/100ml.

QUADRO II
ESTUDO ANALÍTICO DURANTE A FASE ACTIVA

Hemoglobina	< 10g/dl	45%
	6g/dl	13%
Leucócitos	> 7000/mm ³	88%
	10000/mm ³	53%
Albumina	< 3g/dl	53%
	2g/dl	8%
Ferro	< 50µg/dl	68%
Teste Schilling (baixa absorção de vit. B ₁₂)		53%
Fosfatase alcalina > 60 U.I.		5%

A concentração média de α_2 globulina foi de 0.9 ± 0.2 g/100ml (normal 0.6 ± 0.1), correspondente na electroforese das proteínas a $12.9 \pm 3\%$ (normal 8.8 ± 1.5). Os valores mais elevados de α_2 globulina e da velocidade de sedimentação, verificaram-se nos doentes em fase aguda. A velocidade de sedimentação na 1.^a hora foi em média de 45 ± 30 . Observou-se um valor de ferro sérico inferior a 50 µg/100ml em 27 doentes (68%). O teste de Schilling efectuado em 20 doentes (50%), mostrou valores baixos de absorção da vitamina B₁₂ associada ao factor intrínseco em 13 doentes. A fosfatase alcalina estava discretamente elevada em 2 doentes (5%) e o restante estudo analítico realizado não apresentava alterações significativas.

Os resultados do estudo imunológico humoral realizado, são apresentados detalhadamente no capítulo referente a este assunto, referindo-se aqui apenas as observações respeitantes à imunidade celular. Em 20 doentes (50 %) determinou-se a percentagem de linfócitos T, que foi $62,5 \pm 8,7 \%$ (normal $64,8 \pm 15,6$). Em 12 doentes (30%) o índice de transformação blástica dos linfócitos foi de $0,51 \pm 0,22$ (normal $> 0,25$) e o índice de inibição da migração leucocitária foi de $0,70 \pm 0,26$ (normal $> 0,60$). A intradermoreacção pela tuberculina efectuada em 24 doentes (60 %), foi positiva em 58 % dos casos.

O estudo endoscópico foi realizado por rectossigmoidoscopia em todos os doentes e por colonoscopia em 11 doentes (28 %). Este último método foi empregue nas seguintes indicações: diagnóstico diferencial e definição da natureza de estenoses ou de lesões pseudopolipóides. As principais alterações da mucosa observadas foram: granitado, eritema, ulceração e pseudopólipos. A configuração das úlceras variou desde o tipo aftóide observado em zonas com aspecto normal até úlceras grandes, lineares, longitudinais e confluentes.

Na avaliação dos dados radiográficos consideraram-se, principalmente, os seguintes aspectos: fistula enterocutânea ou enteroentérica; úlceras lineares, fissuras transversais profundas e sulcos prepêndiculares ao lume produzindo um padrão geódico da mucosa «cobblestone»; descontinuidade das lesões; separação das ansas intestinais; atingimento assimétrico da parede intestinal associado com massa adjacente; estenose segmentar do intestino, (Figs. 9-22).

Verificaram-se alterações histológicas características da doença de Crohn em 23 doentes, sendo em 14 nos segmentos do intestino ressecados cirurgicamente, em 2 nos tecidos obtidos na éxerese de fistulas perianais e em 7 na biópsia rectal ou cólica (Fig. 43).

O diagnóstico na doença de Crohn, foi estabelecido, principalmente, com base nos critérios histológicos característicos em 23 doentes (58 %), e assentou em critérios radiográficos característicos nos restantes 17 (42 %).

Observou-se atingimento isolado do intestino delgado em 12 casos (30 %) e do colon em 9 (23 %). A combinação de lesões do intestino delgado e colon ocorreu em 19 casos (47 %) (Fig. 23).

Foram submetidos a tratamento cirúrgico dirigido à doença intestinal 14 doentes, (35%). A indicação de tratamento cirúrgico resultou

em 10 doentes de oclusão ou perfuração intestinal, em 2 de fístulas internas e em 2 de massa abdominal.

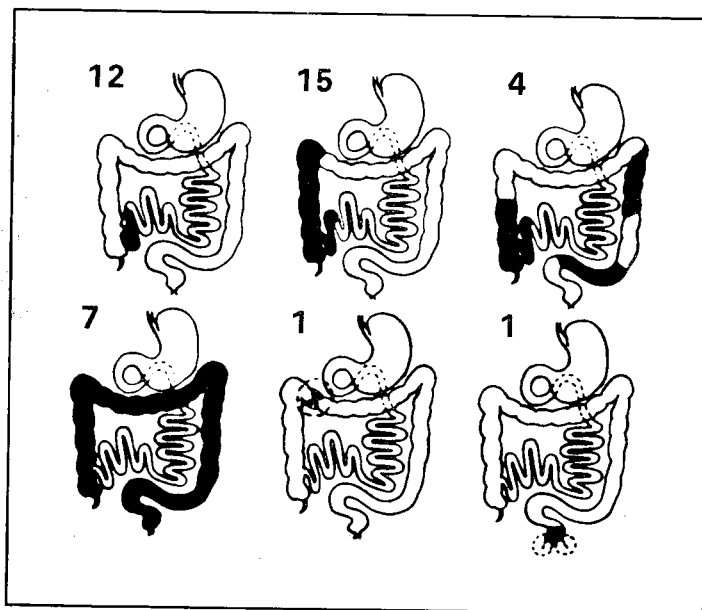


Fig. 23 — Localização da doença de Crohn

A complicação de hemorragia intestinal maciça ocorreu em 3 doentes (8 %) e num doente verificou-se perfuração do colon. Esta doente faleceu no período pós-operatório, mortalidade global 3 %, (Quadro III).

QUADRO III COMPLICAÇÕES INTESTINAIS

Fístula anal	28%
Fístula enteroentérica	13%
Fístula enterocutânea	8%
Oclusão intestinal	23%
Perfuração intestinal	3%
Hemorragia intestinal	8%
Pseudopólipos	5%

DOENTES COM COLITE ULCEROSA

O estudo realizado compreendeu 60 doentes. O diagnóstico de colite ulcerosa foi estabelecido pelo uso combinado de dados clínicos, endoscópicos, radiográficos e histológicos (72) e baseou-se em 4 critérios em 44 doentes (73 %) e em 3 critérios em 16 doentes (27 %). Observaram-se critérios clínicos em 59 doentes (98 %), endoscópicos em 53 doentes (88 %), radiográficos em 44 doentes (73 %) e histológicos em 54 doentes (90 %).

A média da idade dos doentes foi de $37,4 \pm 11,9$ anos, variação dos 11 aos 66 anos. Na distribuição por sexos, verificou-se que 27 doentes (45 %) pertenciam ao sexo masculino e 23 (55 %) ao sexo feminino (Fig. 1). A idade de início dos sintomas foi aos $32,2 \pm 10,3$ e oscilou entre os 11 e 65 anos, sendo em 5 (8 %) abaixo dos 20 anos, em 41 (68 %) entre os 20 e os 40 anos, em 10 (17 %) entre os 40 e os 50 anos e em 4 (7 %) acima dos 50 anos (Fig. 1).

O diagnóstico foi realizado nos primeiros seis meses de evolução da doença em 33 doentes (55 %) e entre 6 meses e 11 anos (média 4,5 anos) nos restantes 27 (45 %). Necessitaram de internamento hospitalar 40 doentes (67 %), sendo 16 (27 %) internados apenas uma vez, 5 (8 %) duas vezes, 5 (8 %) três vezes e 6 (10 %) tiveram mais de seis internamentos.

Os sintomas mais frequentes durante o período da doença activa foram (Fig. 24): rectorragias em 59 doentes (98 %), diarreia em 57 (95 %), dor abdominal em 40 (67 %) e tenesmo em 29 (48 %), palidez da pele e mucosa em 23 (38 %), febre em 19 (32 %), emagrecimento superior a 10 % do peso em 16 (27 %), distensão gasosa do abdome em 12 (20 %) e edema maleolar em 9 (15 %).

No estudo rectossigmoidoscópico observaram-se as seguintes alterações da mucosa: aspecto friável em 48 doentes (80 %), granitado em 43 (72 %), úlceras em 43 (72 %), presença de inducto muco-sanguinolento em 36 (60 %) e pseudopólipos em 7 (12 %). Realizou-se colonoscopia em 9 doentes (15 %) sendo em 6 (10 %) para vigilância de displasia e em 2 (3 %) para diagnóstico diferencial.

A biópsia rectal foi realizada em todos os doentes, tendo sido observadas alterações histológicas características da colite ulcerosa no momento do diagnóstico, em 54 doentes (90 %), (Fig. 42).

As principais alterações radiográficas observadas foram (Figs. 25-28): rigidez do colon em 39 casos (65 %), alargamento do espaço retro-rectal em 28 (47 %), encurtamento do quadro cólico em 28 (47 %), espiculado em 27 (45 %), aspecto geódico em 9 (15 %), duplo contorno em 6 (10 %), ileite por refluxo em 4 (7 %) e distensão do colon, superior a 5 cm em 3 (5 %). A extensão da doença avaliada a partir de dados radiológicos foi de colite ulcerosa total em 29 (48 %), distal (ângulo esplênico) em 22 (37 %) e rectossigmoidite em 9 (15 %).

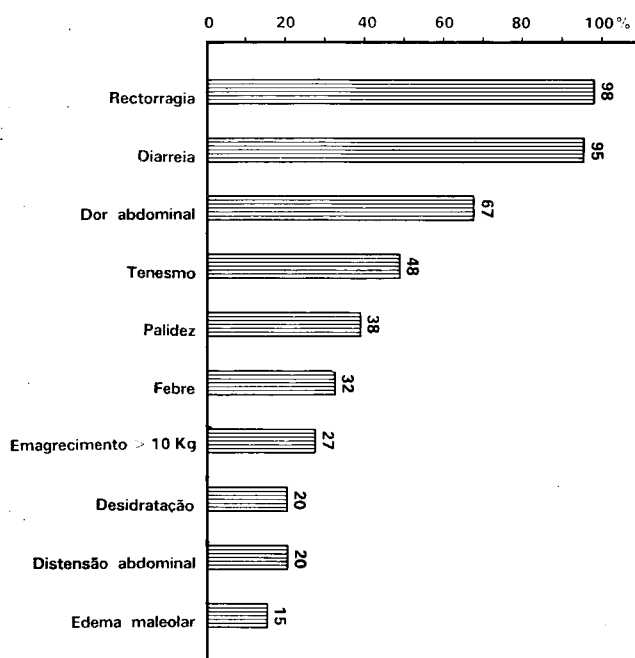
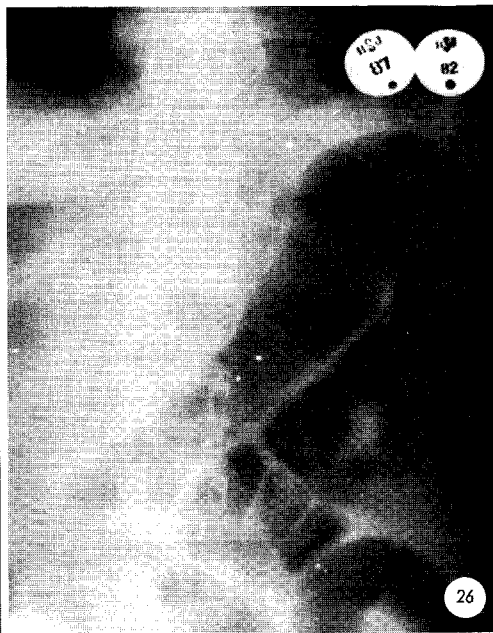


Fig. 24 — Manifestações clínicas na colite ulcerosa.

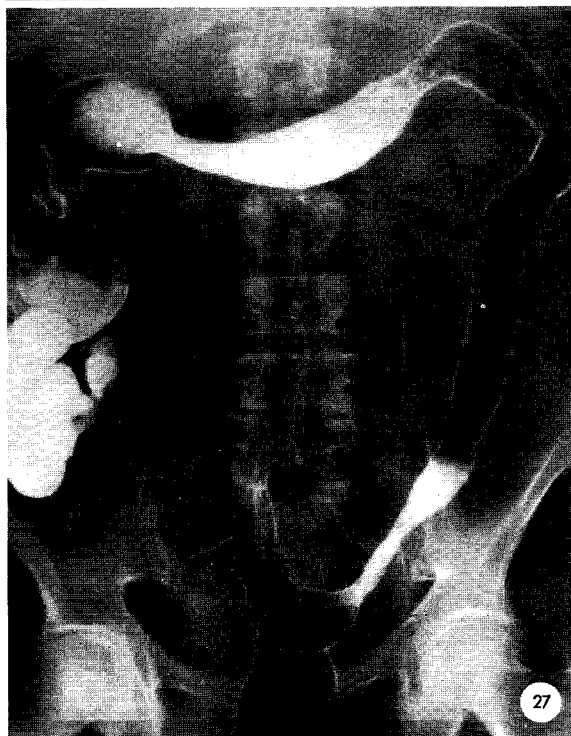
Na análise dos dados laboratoriais verificamos valores de hemoglobina inferiores a 10g/100ml em 30 doentes (50 %) e inferiores a 6g/100ml em 6 doentes (10 %). Encontramos leucocitose superior a 7 000 em 44 doentes (73 %) e superior a 10 000 em 21 doentes (35 %), com o valor mais elevado de 30 000. Em 19 doentes (32 %) a albumina sérica foi inferior a 3g/100ml e em 8 (13 %) inferior a 2g/100ml, sendo



25



26



27



28

COLITE ULCEROSA

Figs. 25 — Colite total com ileíte de refluxo; 26 — Dilatação aguda do colon.
 Figs. 27 — Encurtamento e estenose cólica; 28 — Estenose recto-sigmoideia

o valor mais baixo observado de 0,8g/100ml. Observou-se em 36 doentes (60%), ferro sérico inferior a 50 μ g/100ml (Quadro IV).

Em 3 doentes (5 %) observaram-se elevações discretas das transaminases bem como da fosfatase alcalina. O restante estudo analítico efectuado não apresentou alterações significativas. As concentrações séricas de haptoglobina, transferrina e α_1 antitripsina foram determinadas em 25 doentes (42%). Verificaram-se valores elevados da haptoglobina, 332 ± 220 (normal 200 ± 100) e da α_1 antitripsina 421 ± 153 (normal 300 ± 100) ($p < 0.01$). O valor da transferrina foi 151 ± 176 (normal 300 ± 100).

QUADRO IV
ESTUDO ANALÍTICO DURANTE A FASE ACTIVA

Hemoglobina	<	10g/dl	50%
		6g/dl	10%
Leucócitos	>	7000/mm ³	77%
		10000/mm ³	35%
Albumina	<	3g/dl	32%
		2g/dl	13%
Ferro	<	50 μ g/dl	60%
Fosfatase alcalina	>	60 U.I.	5%

Os resultados do estudo da imunidade humoral realizado são apresentados no capítulo referente a este assunto, referindo-se aqui as observações referentes à imunidade celular. Em 20 doentes (33 %) efectuaram-se contagem dos linfócitos T e realizaram-se estudos in vitro da capacidade funcional dos linfócitos. A percentagem dos linfócitos T observada foi de $63,4 \pm 10,4$ % (normal $64,8 \pm 15,6$), o índice de transformação blástica dos linfócitos foi $0,35 \pm 0,19$ (normal $> 0,25$) e o índice de inibição da migração leucocitária foi $0,74 \pm 0,44$ (normal $> 0,60$). A intradermorreacção pela tuberculina efectuada em 36 doentes (60 %) foi positiva em 67 % dos casos.

Observaram-se manifestações extra-intestinais em 22 doentes (37 %) que surgiram isoladas em 10 doentes e de forma múltipla em 12 doentes. Ocorreram manifestações articulares em 16 doentes (27 %).

sendo de sinovite periférica, em 12 (20 %) e de espondilite anquilosante, em 4 (7 %). As principais complicações muco-cutâneas observadas foram: úlcera da boca em 19 doentes (31 %), eritema nodoso em 3 (5 %), e «pyoderma gangrenosum» num doente (2 %). Lesões oculares de conjuntivite, irite ou uveíte, observaram-se em 8 doentes (13 %). Na história clínica 2 doentes referiram icterícia e outros 2 asma brônquica. Em 2 dos doentes que durante o estudo apresentaram alterações analíticas da função hepática, efectuaram-se biópsias hepáticas que revelaram esteatose discreta. Flebite dos membros inferiores ocorreu em 5 doentes (8 %). Litíase renal foi diagnosticada em 3 doentes (5 %) (Quadro V). Em 4 doentes observou-se agravamento dos sintomas da colite durante o período da gravidez ou pós-parto.

Nenhum doente foi submetido a tratamento cirúrgico ao colon. Esta indicação foi colocada a duas doentes com colite total de longa duração e com lesões múltiplas de displasia grave, mas não aceitaram o tratamento proposto. Dois doentes (3 %) tiveram megacolon tóxico, recuperando com tratamento médico intensivo. Durante este período de estudo, verificou-se falecimento de um doente, ocorrido após alta hospitalar exigida, em fase activa da doença.

QUADRO V
COMPLICAÇÕES EXTRA-INTESTINAIS

Artrite periférica	20%
Espondilite anquilosante	7%
Eritema nodoso	5%
«Pyoderma gangrenosum»	2%
Estomatite aftosa	31%
Irite	13%
Lesão hepática	5%
Litíase renal	5%
Flebite	8%

DOENTES COM COMPLICAÇÕES EXTRA-INTESTINAIS

Em 34 dos 100 doentes (34 %) com doença inflamatória do intestino estudados, observaram-se complicações extra-intestinais com expressão nas articulações, pele, boca e olhos. Estas manifestações sistêmicas surgiram isoladamente em 12 % e associadas entre si em 22 % dos doentes. O aparecimento de duas complicações extra-intestinais observou-se em 7 doentes, a associação de três manifestações ocorreu em 8 doentes e quatro complicações surgiram em 7 doentes. Passamos a descrever as principais características clínicas destas manifestações sistêmicas.

1. *Manifestações articulares*

1.1. *Artrite da doença de Crohn*

Nove dos 40 doentes (23 %) com doença de Crohn, apresentaram artrite periférica, sendo 5 doentes do sexo feminino e 4 do sexo masculino.

A idade de começo dos sintomas articulares, variou entre os 10 e os 50 anos (média $31,4 \pm 13,8$) e a idade do início dos sintomas intestinais entre os 10 e os 49 anos (média $25 \pm 12,5$) (Fig. 29).

A artrite começou de forma aguda em 7 doentes (78 %). Verificou-se atingimento com derrame articular acentuado em 8 doentes (89 %). Na maioria dos doentes houve atingimento de uma a duas articulações, durante o primeiro episódio de artrite. O número destes episódios variou consideravelmente de caso para caso, pois enquanto 3 dos doentes (33 %) apenas apresentaram um ataque de artrite, em 4 (44 %) verificaram-se mais de 6 crises. As articulações predominantemente atingidas foram os joelhos e tíbio-társicas, seguindo-se os cotovelos, punhos e metacarpofalângicas (Fig. 30).

O tempo que mediou entre o começo dos sintomas articulares e a sua expressão máxima foi na maioria dos doentes de 48 horas. Durante este período iniciou-se a migração de processo inflamatório sinovial a outras articulações, geralmente de forma assimétrica. Não se observou predomínio nocturno das queixas articulares. A duração da sinovite foi em 7 dos doentes (78 %) de 6 a 8 semanas e em 2 (22 %) de cerca de 6 meses. O estudo radiológico revelou aspecto normal ou ligeira

osteoporose em todos os doentes, menos em um que apresentava artrite crônica astragalo-escafoideia (Fig. 41).

Os sintomas intestinais precederam os articulares em 4 doentes (44 %), enquanto que em 5 (56 %) foi simultâneo o início destes sintomas (Fig. 31). Todos os doentes referiram sincronismo entre a exacerbação da artrite e o agravamento das queixas intestinais (48).

A localização das lesões intestinais neste grupo de doentes foi em 44 % dos casos no íleo, em 22 % no íleo e colon e em 33 % no colon.

Todos os doentes que apresentaram eritema nodoso (8 casos), tiveram simultaneamente artrite aguda. Dos 10 doentes que tiveram ulceração recorrente da boca 7 (70 %) apresentaram artrite enteropática, enquanto que dos restantes 30 que não sofreram de úlceras bucais, apenas um teve sinovite (3 %). Foi verificada a presença de iríte em 3 doentes, todos com artrite (Fig. 32).

Efectuaram-se biópsias da sinovial em 7 doentes. Em todos os casos o eixo vilositário apresentava tecido conjuntivo denso, com infiltrado inflamatório discreto e os vasos, por vezes, apresentavam fibrose perivascular (Figs. 44, 45).

Ocorreram lesões de espondilite anquilosante em 2 doentes do sexo masculino correspondendo a 5 % do total dos casos estudados com doença de Crohn. Estes doentes apresentavam dor e dificuldade de mobilização da coluna, das articulações sacro-iliacas e condro-esternais. As principais alterações radiográficas observadas, foram anquilose das articulações sacro-iliacas e sindesmofitose ao nível da transição da coluna dorso-lombar (Figs. 34, 35). A idade do começo dos sintomas articulares foi em ambos os casos aos 14 anos. Num doente, o início destas queixas foi síncrone com o aparecimento de lesões perianais da doença de Crohn e somente três anos depois se evidenciaram lesões radiográficas de ileíte terminal. No outro caso os primeiros sintomas intestinais surgiram 6 anos após o começo das lesões na coluna, tendo sido de oclusão intestinal. As queixas da coluna progrediram após a ressecção cirúrgica do íleo terminal. Apresentou também manifestações sistêmicas associadas de «pyoderma gangrenosum» e de iríte (Fig. 37).

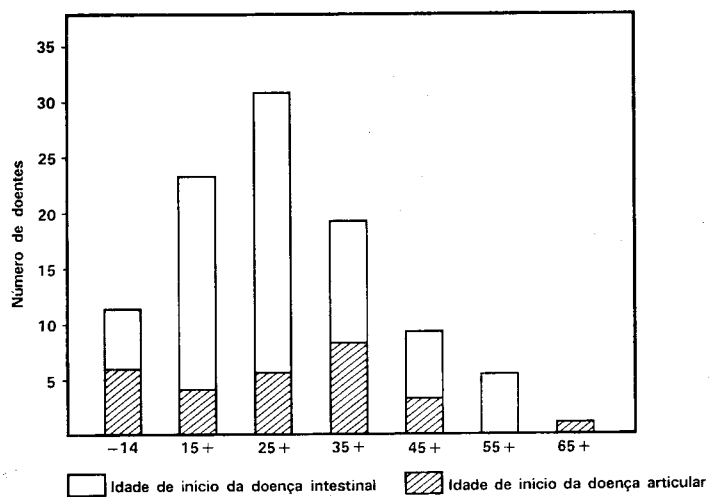


Fig. 29 — Idade do começo dos sintomas intestinais e articulares

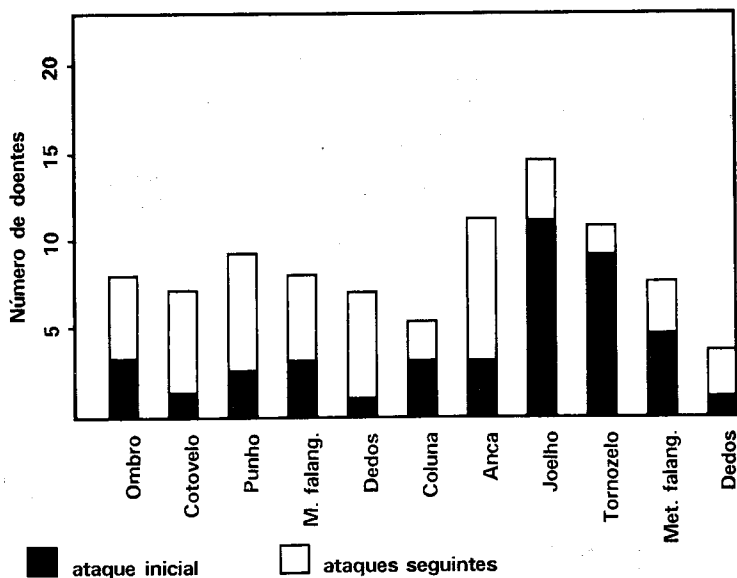


Fig. 30 — Articulações atingidas em 27 doentes com artrite e doença inflamatória intestinal.

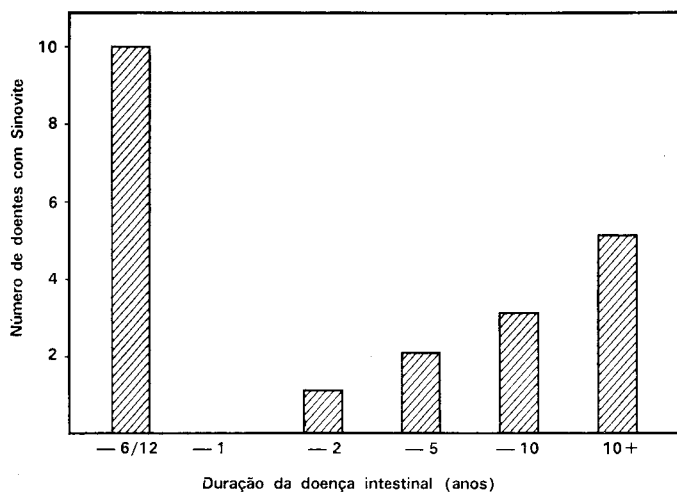


Fig. 31 — Início da artrite relacionada com a duração da doença intestinal.

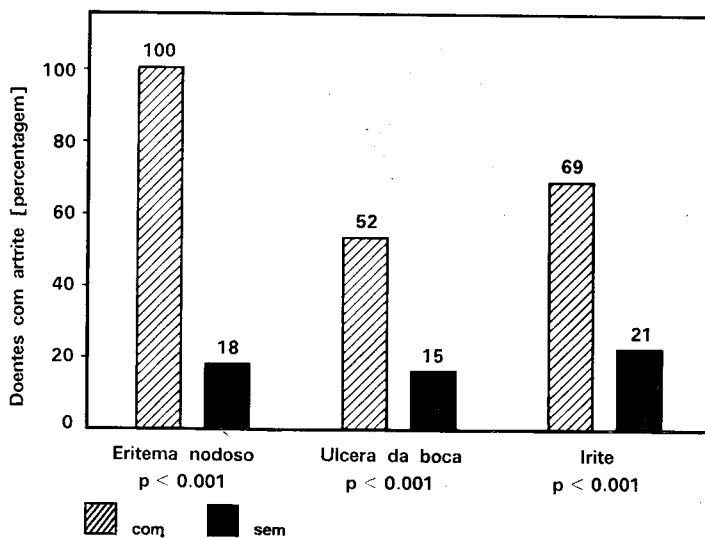


Fig. 32 — Associação da artrite com complicações sistêmicas.

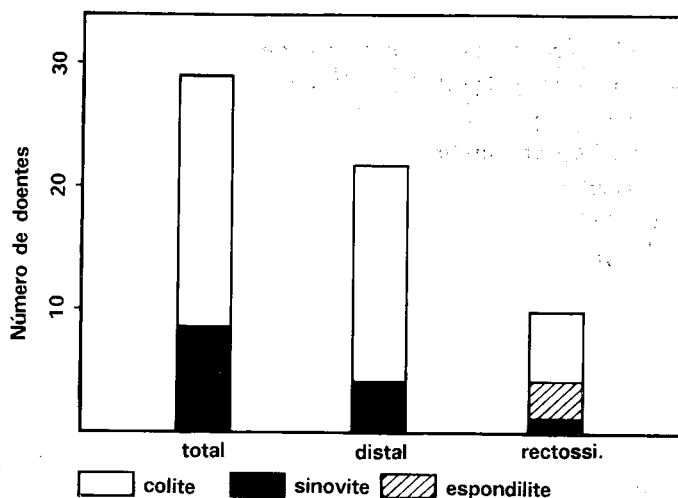


Fig. 33 — Número de doentes com doença articular, relacionado com a extensão da colite.

1.2. Artrite da colite ulcerosa

Doze dos 60 doentes (20%) com colite ulcerosa apresentaram artrite periférica, sendo 8 doentes do sexo feminino e 4 doentes do sexo masculino. A idade do começo dos sintomas articulares variou entre os 24 e os 42 anos (média $39,7 \pm 8,2$) e a idade do início dos sintomas intestinais entre os 21 e 39 anos (média $33,1 \pm 12,6$) (Fig. 29).

A artrite começou de forma aguda em 9 doentes (75%), apresentando-se as articulações afectadas, dolorosas, tumefactas e ocasionalmente com eritema. O início dos episódios de artrite, fez-se geralmente pelas grandes articulações dos membros inferiores, com atingimento nos joelhos em 8 casos (66%). A duração do ataque inicial da sinovite foi na maioria dos doentes de 4 a 6 semanas.

A frequência dos episódios de sinovite, variou consideravelmente, dependendo do tempo de «follow-up». Enquanto alguns doentes apenas tiveram um episódio artrítico, outros apresentaram mais de seis. As grandes articulações dos membros inferiores foram as mais frequentemente atingidas (Fig. 30). A dor e tumefacção articular começaram geralmente por uma articulação, que ao fim de 24 horas apresentava

atingimento máximo, coincidindo com o começo destas queixas noutras articulações. A duração da sinovite foi na maioria dos doentes de 4 a 6 semanas. Todavia, 3 doentes (25 %) tiveram artrite continua durante anos, com remissões parciais e agravamentos síncrones com a actividade da colite (99). Verificou-se recuperação com restabelecimento normal da função articular, em 10 doentes (83 %). Apresentaram alterações radiográficas de erosão óssea, provocadas por entesopatia (Fig 39) 2 doentes (16 %) (99).

O começo das queixas intestinais e articulares foi simultâneo em 5 doentes (41 %). Verificou-se na maioria dos casos paralelismo entre o agravamento das queixas intestinais e articulares, bem como a sua remissão síncrona pela terapêutica médica (48).

Observou-se artrite, em 7 dos 29 doentes (24 %) com colite total, em 4 dos 22 doentes (18 %) com colite distal e em 1 dos 9 doentes (11 %) com rectossigmoidite. Verificou-se, portanto, maior incidência da artrite colítica, nos casos de colite mais extensa (Figs. 33, 38-40). Em 4 doentes (33 %) a colite apresentava pseudopolipos.

Em 3 dos doentes com artrite (25 %) ocorreu eritema nodoso. Dos 19 doentes que tiveram ulceração recorrente da boca 6 (32 %) tiveram artrite periférica, enquanto que dos restantes 41, apenas 15 % teve esta complicação. Dos 8 doentes que apresentaram lesões oculares, metade teve também sinovite, enquanto que dos restantes 52, apenas 15 % teve sinovite (Fig. 32). Observaram-se alterações analíticas da função hepática em 2 doentes com artrite.

Verificou-se associação com espondilite anquilosante em 4 doentes, 3 homens e uma mulher, correspondendo a 7 % dos casos de colite estudados. Estes doentes tinham apagamento da lordose lombar, dor e limitação dos movimentos da coluna e alterações radiográficas de esclerose, erosão ou anquilose das articulações sacro-iliacas. Em 2 doentes havia calcificação dos ligamentos paravertebrais.

A idade de começo destes sintomas articulares variou entre os 13 e os 30 anos (média $20 \pm 7,7$), e o início dos sintomas colíticos ocorreu entre os 16 e 36 anos (média $28,5 \pm 9$).

As queixas articulares precederam as digestivas em todos os doentes. Não se observou paralelismo entre a exacerbação destas queixas e o agravamento dos sintomas intestinais. Somente um doente apresentou manifestações sistémicas associadas, que foram conjuntivite e estomatite recorrente.

2. Lesões da pele

2.1. Eritema nodoso

Observamos eritema nodoso em três doentes com colite ulcerosa e em oito doentes com doença de Crohn, correspondendo respectivamente a 5 % e 20 % do total de doentes estudados. Seis indivíduos eram do sexo feminino e cinco do sexo masculino.

O eritema nodoso surgiu em todos os doentes, durante a agudização da doença intestinal. Verificou-se recorrência desta lesão cutânea em 4 casos. Todos os doentes apresentaram eritema nodoso simultaneamente com artrite aguda (100 %) (Fig. 32). Verificou-se associação com estomatite aftosa em 73 % e com irite em 55 % destes doentes.

Foi realizada biópsia de eritema nodoso, num doente com doença de Crohn que mostrou: «epiderme e derme normais; na hipoderme alguns vasos arteriulares apresentam hialinização fibrinóide da parede com infiltrado de polinucleares e linfócitos muito sugestivo de reacção vascular à circulação e depósito de imuno-complexos» (Figs. 47, 49).

2.2. «Pyoderma gangrenosum»

Observamos «pyoderma gangrenosum» num doente com doença de Crohn e espondilite anquilosante. Em virtude de ser excepcional a complicação de «pyoderma gangrenosum» na doença de Crohn (100) e de raramente ter sido referida a associação com artrite (101), descrevemos este caso clínico, referente a um indivíduo do sexo masculino, que foi hospitalizado pela primeira vez aos 11 anos com enterite aguda. Aos 15 anos começou a apresentar dor na região lombar e dificuldade de mobilização da coluna. Aos 17 anos foi internado com lesões ulcerosas da pele dos membros inferiores e dois anos depois, foi readmitido por recorrência destas lesões. Aos 20 anos foi internado no Hospital S. João, com diarreia, febre e dor abdominal. Apresentava dor e rigidez na coluna dorso-lombar. Durante o internamento foi operado por oclusão intestinal, tendo sido efectuado hemicolectomia direita com ressecção de 46 cm de íleo terminal. O exame histológico mostrou lesões de doença de Crohn. Aos 22 anos foi internado com dor e rigidez na coluna e dor nas articulações condro-esternais, coxo-femural esquerda e joelho direito. Durante

este internamento apresentou novamente lesões ulcerosas na pele da perna esquerda, com características clínicas de «pyoderma gangrenosum» (Fig. 37). Foi realizada biópsia que revelou: «perda de revestimento superficial-úlceras e na derme processo inflamatório com células histiocitárias e linfocitárias de predomínio peri-vascular. Alguns vasos junto à zona ulcerada apresentam necrose fibrinóide da parede (Fig. 46). Aos 24 anos voltou a ser internado com diarreia e febre, observando-se no estudo radiográfico, recorrência das lesões intestinais da doença de Crohn e alterações na coluna, típicas de espondilite anquilosante, com anquilose sacro-iliaca e sindesmofitose na coluna dorso-lombar (Fig. 35). Apresentava artrite do joelho direito, pelo que foi efectuada biópsia da sinovial, que mostrou hiperplasia do revestimento mesotelial; presença de material fibrinóide à superfície e no interior das franjas; e numerosos vasos, por vezes rodeados de intenso infiltrado inflamatório.

Num doente com colite ulcerosa, observamos durante uma recidiva grave da doença intestinal, lesões eritematosas nas pernas, que evoluíram com ulcerações múltiplas e que levaram várias semanas a cicatrizar. Efectuou-se biópsia da lesão ulcerosa que evidenciou inflamação crónica com hialinização de pequenos vasos (Fig. 48). Outro doente com doença de Crohn, apresentou lesões cutâneas vesiculares que evoluíram para úlceras necróticas (Fig. 36).

3. *Lesões da boca*

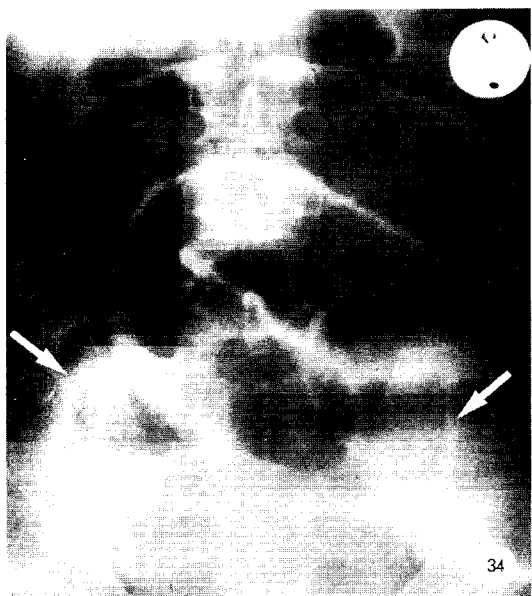
Verificou-se estomatite ulcerosa recorrente em 19 doentes com colite ulcerosa e em 10 doentes com doença de Crohn, correspondendo respectivamente a 31 % e 25 % do total dos doentes estudados. As úlceras na boca, surgiram geralmente durante as recidivas da doença intestinal e concomitantemente com outras complicações extra-intestinais. Com efeito, 52 % dos doentes que apresentaram estomatite tiveram artrite (Fig. 32), 28 % eritema nodoso e 34 % apresentaram complicações oculares.

4. *Lesões oculares*

Verificaram-se lesões de conjuntivite, iríte ou uveíte em 9 doentes com colite ulcerosa e em 3 doentes com doença de Crohn, correspondendo

respectivamente a 15 % e 8 % da totalidade dos doentes estudados. A maioria dos doentes apresentaram estas lesões durante agudização da doença intestinal e concomitantemente com outras manifestações sistêmicas.

Verificou-se associação significativa de lesão ocular e artrite (Fig. 32). Dos doentes que apresentaram lesões oculares, 46 % tiveram artrite periférica e 33 % espondilite anquilosante. Os doentes com lesões oculares, tiveram também eritema nodoso em 46 % e estomatite ulcerosa em 69 % dos casos.

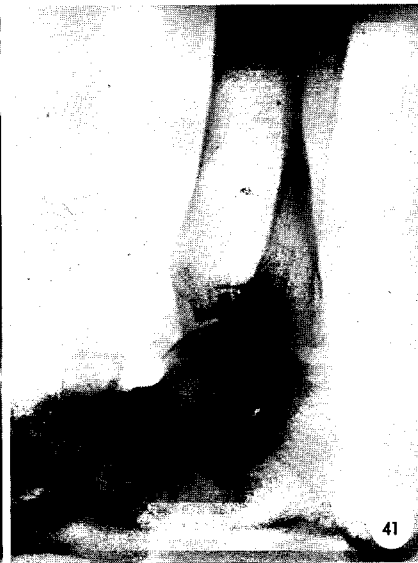
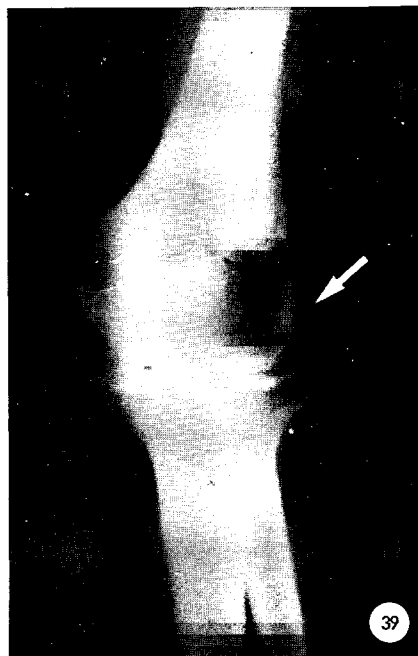


COMPLICAÇÕES ARTICULARES E CUTÂNEAS DA DOENÇA DE CROHN

Fig. 34 — Rx simples do abdomen, num doente com oclusão intestinal e sacro-ileite bilateral.

Fig. 35 — Lesões por recorrência da doença e espondilite anquilosante (setas).

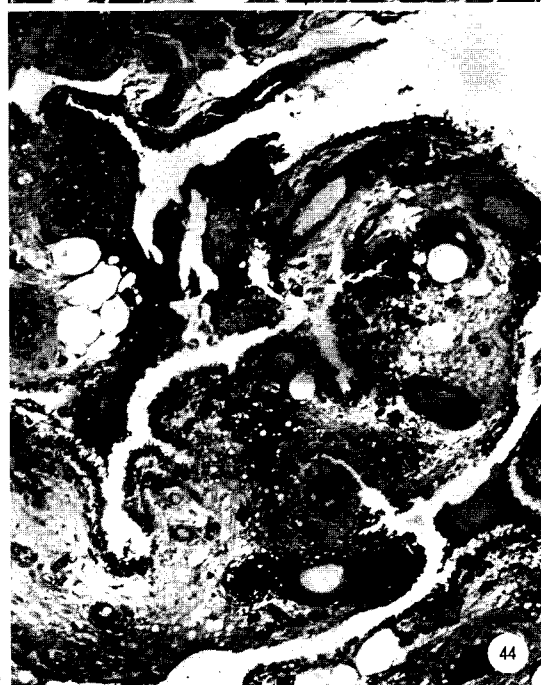
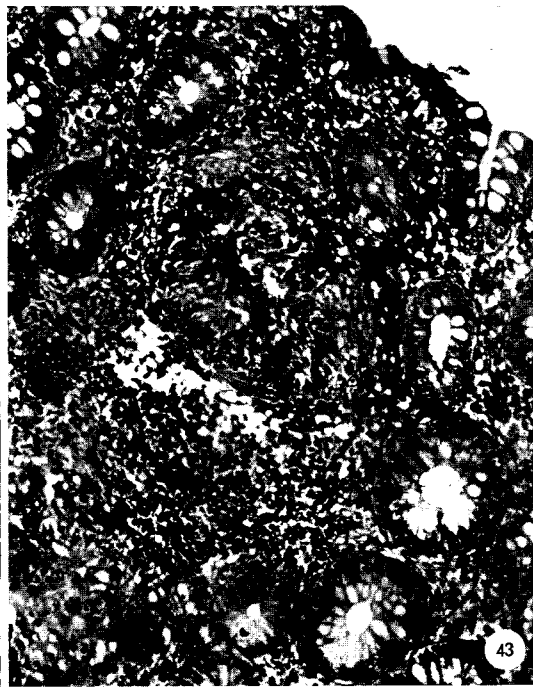
Figs. 36 — Lesões múltiplas de «pyoderma gangrenosum»; 37 — Úlcera pré-tibial «pyoderma gangrenosum».



COLITE ULCEROSA E ARTRITE

Figs. 38-40 — Doente com estenose acentuada do colon; erosão do epicôndilo e artrite com deformidade das mãos.

Fig. 41 — Artrite astrágalo-escafoideia e esporão calcaneano.

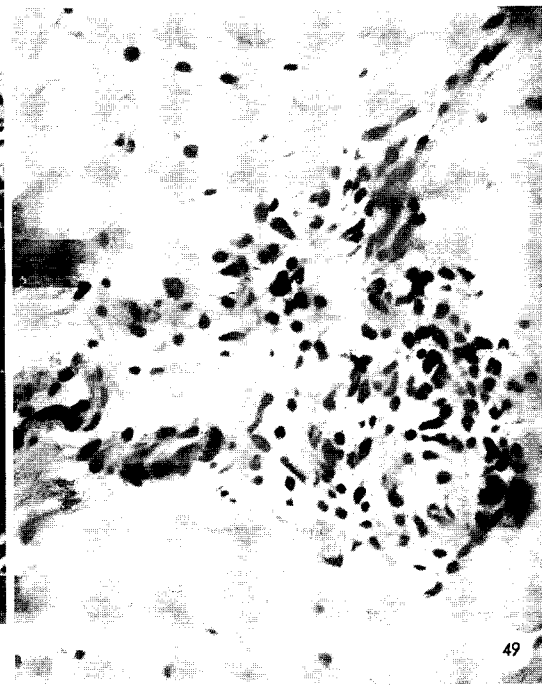


BIÓPSIA RECTAL E SINOVIAL

Fig. 42 — Mucosa rectal com microabcessos cripticos, na colite ulcerosa $\times 200$.

Fig. 43 — Mucosa rectal com granuloma, na doença de Crohn $\times 100$.

Figs. 44, 45 — Membrana sinovial com infiltração peri-vascular $\times 50$ e $\times 200$.



BIÓPSIAS CUTÂNEAS NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Figs. 46, 48 — Lesões de «pyoderma gangrenosum»: perda de revestimento superficial, na derme processo inflamatório peri-vascular $\times 200$.

Figs. 47, 49 — Lesões de eritema nodoso: hialinização fibrinóide da parede dos vasos com infiltrado de polinucleares e linfócitos $\times 50$ e $\times 200$.

II — ESTUDO IMUNOLÓGICO

a) — *Imunoglobulinas séricas*

As concentrações séricas médias de IgG, IgA e IgM (mg/100ml), observadas em 36 doentes (90 %) com doença de Crohn, foram respectivamente de 1931 ± 722 (normal 1300 ± 500), 309 ± 142 (normal 270 ± 180) e 156 ± 76 (normal 155 ± 95) (Fig. 50). Verificou-se aumento significativo de IgG ($p < 0.001$) relativamente aos normais. Em 25 doentes (63 %) determinaram-se também as concentrações séricas de IgE. Apenas 3 doentes tinham níveis de IgE superiores ao normal, dos quais 2 sofriam de asma brônquica.

Os valores das concentrações séricas médias de IgG, IgA e IgM nos doentes com artrite, foram respectivamente de 2321 ± 873 , 261 ± 121 e 195 ± 75 , enquanto que as mesmas determinações no grupo sem artrite foram de 1667 ± 554 , 321 ± 138 e 129 ± 64 . Na comparação entre as médias destes dois grupos, verificou-se aumento significativo de IgG e IgM ($p < 0.02$), nos doentes com mais manifestações articulares. A diferença entre as médias observadas no grupo com artrite e nos normais, foi significativa para a IgG ($p < 0.01$) (Quadro 6).

Em 36 doentes com colite ulcerosa (60 %) determinaram-se as concentrações séricas médias de IgG, IgA e IgM, que foram respectivamente: 1767 ± 521 , 267 ± 94 e 185 ± 96 . Verificou-se aumento significativo de IgG ($p < 0.001$) relativamente aos normais (Fig. 50). Efectuaram-se determinações de IgE em 25 doentes (42 %), verificando-se valores superiores ao normal em 4 doentes, dos quais 1 sofria de asma brônquica.

Em 13 dos 16 doentes com colite ulcerosa e artrite observamos os seguintes valores médios de IgG, IgA e IgM: 1902 ± 436 , 279 ± 121 e 223 ± 188 respectivamente, enquanto que as mesmas determinações nos doentes sem artrite foram: 1665 ± 556 , 258 ± 91 e 177 ± 98 .

Na comparação dos resultados destes grupos, não se verificou todavia diferença significativa. As diferenças entre as médias observadas no grupo com artrite e nos normais, foram significativas para a IgG ($p < 0.001$) e para IgM ($p < 0.01$), (Quadro VI).

Comparando os dois grupos, doentes com doença de Crohn e com colite ulcerosa, não se observaram diferenças significativas.

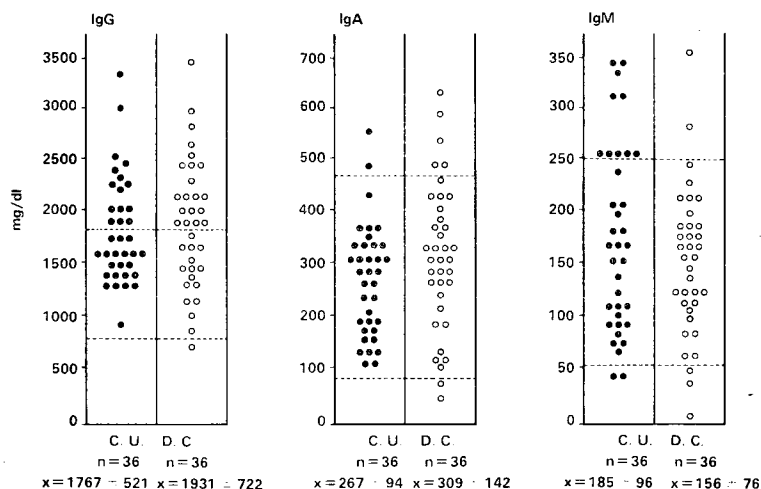


Fig. 50 — Imunoglobulinas séricas em 36 doentes com doença de Crohn e em 36 doentes com colite ulcerosa.

QUADRO VI

NÍVEIS SÉRICOS DE IMUNOGLOBULINAS (mg/100ml)
EM 24 DOENTES COM ARTRITE E DOENÇA
INFLAMATÓRIA DO INTESTINO

	IgG	IgA	IgM
Normais	1300 ± 500	270 ± 180	155 ± 95
Doença de Crohn n = 11	2321 ± 873*	261 ± 121	195 ± 75
Colite ulcerosa n = 13	1902 ± 436**	279 ± 121	223 ± 108*

Valores de p referentes à comparação com os normais

* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$

b) — Complemento no sangue e líquido sinovial

As médias das concentrações séricas de CH_{50} (U /ml), C_4 (mg/100ml) e C_3 (mg/100ml), observadas em 36 doentes (90 %) com doença de Crohn, foram respectivamente de 53 ± 10 (normal 42 ± 8), 47 ± 15 (normal 35 ± 15) e 112 ± 24 (normal 110 ± 30). Verificou-se aumento significativo de CH_{50} e C_4 , relativamente aos normais ($p < 0.001$), (Fig. 51).

Os valores das concentrações séricas médias de CH_{50} , C_4 e C_3 , observados nos doentes com doença de Crohn associada a artrite foram respectivamente de 55 ± 11 , 45 ± 14 e 119 ± 30 , e não diferiram significativamente dos encontrados nos doentes sem artrite e que foram de: 54 ± 8 , 50 ± 14 e 109 ± 20 .

A diferença entre as médias observadas nos grupos com artrite e nos normais, foi significativa para CH_{50} ($p < 0.02$), (Quadro VII).

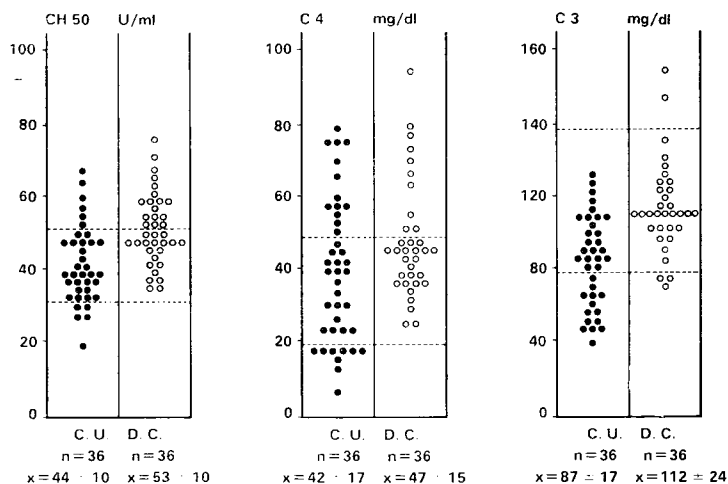


Fig. 51 — Determinações do complemento sérico em 36 doentes com doença de Crohn e em 36 doentes com colite ulcerosa.

QUADRO VII

NÍVEIS SÉRICOS DE COMPLEMENTO EM 24 DOENTES
COM ARTRITE E DOENÇA INFLAMATÓRIA
DO INTESTINO

	CH50 u/ml	C4 mg/100ml	C3 mg/100ml
Normais	42 ± 18	35 ± 15	110 ± 30
Doença de Crohn n = 11	55 ± 11*	45 ± 14	119 ± 30
Colite ulcerosa n = 13	46 ± 10	43 ± 18	86 ± 21**

Valores de p referentes à comparação com os normais

*p < 0.02; **p < 0.01

Em seis doentes com doença de Crohn e artrite aguda do joelho, efectuaram-se determinações simultâneas de CH₅₀ no sangue e líquido sinovial. A média das determinações no líquido sinovial foi de 15 ± 6,2 e não diferiu significativamente do valor normal (21,2 ± 2,6), (Quadro VIII).

QUADRO VIII

ACTIVIDADE DO COMPLEMENTO (CH50) NO SANGUE
E LÍQUIDO SINOVIAL

	Doentes							Média ± DP
Sangue	61.0	50.0	62.4	76.8	86.8	46.5		64 ± 15
Liq. sinovial	16,6	12,1	16,1	8,7	26,3	10,2		15 ± 6.2

Em 36 doentes com colite ulcerosa (60 %), determinaram-se as concentrações séricas médias de CH₅₀, C₄ e C₃, verificando-se respectivamente os seguintes resultados 44 ± 10, 42 ± 17 e 87 ± 21 (Fig. 51). Verificou-se aumento de C₄ (p < 0.005) e diminuição de C₃ (p < 0.001) relativamente ao controlo.

Em 13 dos 16 doentes com colite ulcerosa e artrite ocorreram os seguintes valores médios de CH_{50} , C_4 e C_3 : 46 ± 10 , 53 ± 19 e 88 ± 20 respectivamente enquanto que as mesmas determinações nos doentes sem artrite foram: 43 ± 11 , 42 ± 18 e 86 ± 21 . Na comparação dos resultados destes grupos, não se verificou diferença significativa, todavia a diferença entre as médias das determinações de C_3 observadas no grupo com artrite e nos normais foi significativa ($p < 0.01$) (Quadro 7).

Comparando os dois grupos, doentes com doença de Crohn e doentes com colite ulcerosa, verificamos diminuição significativa de CH_{50} ($p < 0.01$) e de C_3 ($p < 0.001$) na colite ulcerosa.

c) — Linfócitos B no sangue

O estudo das populações de linfócitos B no sangue, foi realizado em 20 doentes com doença de Crohn, em 20 doentes com colite ulcerosa e num grupo de controlo de 29 indivíduos saudáveis, dadores de sangue.

O total de células B expressas em números absolutos foi no grupo de normais de 405 ± 139 , na doença de Crohn de 640 ± 363 e na colite ulcerosa de 551 ± 234 . Verificaram-se aumentos significativos nos grupos com doença de Crohn $p < 0,05$ e com colite ulcerosa $p < 0,05$, relativamente aos normais. Esta linfocitose, foi também verificada em percentagem e reflectiu aumentos significativos dos três tipos celulares estudados — IgA, IgG e IgM (Quadro IX).

QUADRO IX
LINFÓCITOS B (%), NA DOENÇA DE CROHN, COLITE
ULCEROSA E NORMAIS

	Normais	Doença de Crohn	Colite ulcerosa
IgA	$4,9 \pm 2,6$	$7,2 \pm 4,2^*$	$8,0 \pm 3,8^{***}$
IgG	$9,2 \pm 5,0$	$12,5 \pm 5,2^{**}$	$10,9 \pm 3,9$
IgM	$5,0 \pm 3,8$	$6,8 \pm 3,6$	$7,7 \pm 3,8^{**}$
Total	$19,3 \pm 5,3$	$21,4 \pm 6,4$	$23,3 \pm 4,3^{***}$

Valores de p referentes à comparação com os normais

* $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.01$

d) — *Complexos imunológicos circulantes*

O estudo dos complexos imunológicos no sangue, foi efectuado em 20 doentes com doença de Crohn, em 20 doentes com colite ulcerosa e num grupo de controlo de 100 individuos saudáveis, dadores de sangue.

Os resultados expressos em densidade óptica, foram no grupo de normais de $0,040 \pm 0,029$, na doença de Crohn de $0,053 \pm 0,042$ e na colite ulcerosa de $0,052 \pm 0,035$. Em 12 dos doentes que tiveram complicações extra-intestinais, predominantemente artrite, observou-se a média de $0,064 \pm 0,045$. Estes resultados são superiores aos verificados no grupo de controlo, todavia as diferenças das médias não têm significado estatístico.

e) — *Antigénio de histocompatibilidade*

Procedeu-se ao estudo dos antigénios dos «loci» A e B do sistema HLA, em 36 doentes com doença inflamatória intestinal, sendo 14 com doença de Crohn e 22 com colite ulcerosa.

A frequência dos antigénios nestes grupos de doentes e num grupo de 144 individuos normais é apresentada no Quadro X.

O cálculo estatístico referente à associação dos antigénios, evidenciou apenas alteração significativa do antigénio B_{27} . Assim, verificou-se que a sua frequência foi significativamente superior no grupo de doentes com doença inflamatória intestinal $p < 0,05$. A presença deste antigénio foi analisada nos doentes com manifestações articulares, tendo sido verificado em 5,8 % dos doentes com artrite periférica e em 66,6 % dos doentes com artropatia da coluna. Num doente com doença de Crohn, espondilite anquilosante e «pyoderma gangrenosum» o antigénio B_{27} foi negativo.

Verificamos em dois irmãos de sexo diferente, com doença de Crohn, o seguinte fenótipo do antigénio de histocompatibilidade:

$A_2 A_{28} B_{14} Bw_{44}$.

QUADRO X

FREQUÊNCIA DO ANTIGÊNIO HLA (%) NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL (DII)					
Antigênio HLA	DII (n = 36)	Normais (n = 144)	Antigênio HLA	(n = 36) DII	Normais (n = 144)
Locus A			Locus B		
A1	22.2	21.5	B5	25	25.7
A2	55.5	45.8	B7	5.5	8.3
A3	22.2	20.8	B8	19.4	11.8
A9	19.4	27.8	B12	27.7	26.1
A10	5.5	12.5	B13	—	2.8
A11	13.8	14.5	B14	13.8	15.3
A28	8.3	5.6	B15	5.5	9.6
A29	8.3	7.7	BW16	5.5	5.8
AW30	—	11.5	B17	8.3	11.1
AW32	2.7	1.9	B18	—	9.6
			BW21	8.3	4.9
			BW22	5.5	1.9
			B27	13.8*	3.5
			BW35	22.2	11.1
			B37	—	3.4
			B40	2.7	3.4
			BW44	5.5	—

*p < 0.05

III — ESTUDO MORFOLÓGICO

1. IMUNOFLUORESCÊNCIA

a) — *Contagem das células que contêm imunoglobulinas IgA, IgM e IgG*

Indivíduos normais

Efectuamos contagem da população de células que contêm imunoglobulinas dos tipos IgA, IgM e IgG na mucosa rectal, em 12 indivíduos normais. Verificamos os seguintes valores em números absolutos, representados pela média, desvio padrão e variação: totalidade de imunócitos $66 \pm 23,2$ (20-101), células contendo IgA $60 \pm 20,6$ (18-85), células contendo IgM $3,9 \pm 3,1$ (1-10) e células contendo IgG $3,1 \pm 1,9$ (0-8). Em percentagem observamos um predomínio de células do tipo IgA, representado por $89 \pm 3,6\%$ dos imunócitos. A sua distribuição na lâmina própria processou-se de forma uniforme, havendo contudo, uma densidade celular maior na zona luminal. As células IgG corresponderam a $4,3 \pm 2,3\%$ do total de imunócitos e distribuíram-se preferencialmente pela parte basal da mucosa e na proximidade de folículos linfóides. A percentagem de células IgM foi de $5,3 \pm 3,1\%$, enquanto que as células IgE e IgD raramente foram observadas.

Doença de Crohn

Efectuamos contagem das células IgA, IgM e IgG na mucosa rectal de 24 doentes com doença de Crohn (Figs. 54 - 61).

O número total de imunócitos observado, $168 \pm 76,4$, foi significativamente superior ao registado nos indivíduos normais $p < 0,001$, (65, 415). A população das células com estes diferentes tipos de imunoglobulinas, foi avaliada em grupos definidos segundo critérios histológicos. Procuramos verificar se o número de células contendo imunoglobulinas estava em relação com a intensidade da inflamação verificada no exame histológico. Assim, as biópsias rectais destes 24 doentes foram classificadas em 2 grupos correspondendo a graus histológicos diferentes de inflamação. Em 12 doentes as biópsias foram classificadas como variantes do normal ou contendo lesões inflamatórias mínimas (Grupo I), enquanto que no outro grupo de 12 doentes observaram-se acentuados sinais inflamatórios da mucosa (Grupo II), não se incluindo, todavia, áreas ulceradas. Verificamos que 83 % das biópsias classificadas como tendo sinais inflamatórios acentuados, corresponderam aos doentes com doença de Crohn do colon.

O número total de imunócitos observados nas biópsias classificadas como variantes de normal (Grupo I) foi em média de 118 ± 41 , repartindo-se pelos tipos de IgA 88 ± 30 , IgM 10 ± 8 e IgG 19 ± 17 , e correspondendo respectivamente a $75 \pm 12 \%$, $8 \pm 5 \%$, $16 \pm 11 \%$, do total de células contadas por unidade de mucosa (Quadro XI).

QUADRO XI

DISTRIBUIÇÃO DE IMUNÓCITOS NA MUCOSA RECTAL/
/«UNIDADE DE MUCOSA» EM NORMAIS (n = 12)
E NA DOENÇA DE CROHN (n = 24)

Células Ig	NORMAL	DOENÇA DE CROHN	
		Graus histológicos de inflamação	
		Lesões mínimas (I) n = 12	Lesões graves (II) n = 12
IgA	66(89%)	88* (75%)	124** (58%)
IgM	5(6%)	10* (8%)	36*** (16%)
IgG	4(5%)	19** (16%)	56*** (26%)
TOTAL	75	118*	217***
Quociente IgA/IgG	16.6	4.6	2.2

Valores de p referentes à comparação com o grupo normal

*p < 0.02; **p < 0.01; ***p < 0.001

O número total de imunócitos observados nas biópsias classificadas com inflamação grave (Grupo II) foi em média de 217 ± 79 , correspondendo aos tipos IgA 124 ± 62 , IgM 36 ± 18 e IgG 56 ± 19 , sendo em percentagem respectivamente $58 \pm 18\%$, $16 \pm 6\%$ e $26 \pm 13\%$ (Quadro XI). O número de células IgA, IgM e IgG estava significativamente aumentado, em relação ao normal, respectivamente, 1,3; 2 e 4,8 vezes no grupo I e 1,9; 7,2 e 14 vezes no Grupo II. O quociente entre o número de células IgA/IgG, observado no grupo de normais foi de 16,6 no grupo com lesões mínimas de 4,6 e no grupo com lesões acentuadas de 2,2 (Quadro XI).

Colite ulcerosa

Efectuamos contagem das células que contêm imunoglobulinas dos tipos IgA, IgM e IgG na mucosa rectal de 36 doentes com colite ulcerosa, (Figs. 62-65). O número total de imunócitos observado, 247 ± 175 (37-650), foi significativamente superior ao registado no grupo de normais $p < 0.001$.

A contagem destes elementos celulares realizou-se em biópsias rectais seleccionadas do seguinte modo: em 24 doentes as lesões inflamatórias eram mínimas (Grupo I), enquanto que em 12 doentes havia sinais inflamatórios acentuados (Grupo II). O número total de imunócitos no Grupo I foi de 139 ± 66 e no Grupo II de 437 ± 142 , apresentando a diferença entre estas duas médias significado estatístico $p < 0.001$. Verificamos a seguinte repartição dos diferentes tipos celulares, no Grupo I: IgA 92 ± 43 , IgM 22 ± 21 e IgG 24 ± 22 , que corresponderam, em percentagem aos seguintes valores: IgA $70 \pm 19\%$, IgM $14 \pm 10\%$ e IgG $16 \pm 10\%$ (Quadro XII). A distribuição dos elementos celulares no Grupo II foi em números absolutos: IgA 242 ± 93 , IgM 59 ± 34 e IgG 136 ± 131 e em percentagem IgA $58 \pm 20\%$, IgM $14 \pm 9\%$ e IgG $27 \pm 20\%$. (Quadro XII). O número de células IgA, IgM e IgG aumentou significativamente em relação ao normal de 1,4; 4,4 e 6 vezes no Grupo I e de 3,6; 11,8 e 34 vezes no Grupo II. O quociente entre o número de células IgA/IgG, observado no grupo de normais foi de 16,6. Nos doentes com colite ulcerosa sem lesões inflamatórias significativas na mucosa rectal, este quociente foi de 3,8 e nos doentes com lesões inflamatórias graves de 1,8 (Quadro XII).

QUADRO XII

DISTRIBUIÇÃO DE IMUNÓCITOS NA MUCOSA RECTAL/
/«UNIDADE DE MUCOSA» EM NORMAIS (n = 12)
E NA COLITE ULCEROSA (n = 36)

Células Ig	NORMAL	COLITE ULCEROSA	
		Graus histológicos de inflamação	
		Lesões mínimas (I) n = 24	Lesões graves (II) n = 12
IgA	66(89%)	92* (70%)	242***(58%)
IgM	5(6%)	22**(14%)	59***(14%)
IgG	4(5%)	24**(16%)	136***(27%)
TOTAL	75	139*	437***
Quociente IgA/IgG	16.6	3.8	1.8

Valores de p referentes a comparação com o grupo normal

*p < 0.02; **p < 0.01; ***p < 0.001

b) — Contagem de células IgE

Procedemos ao estudo das células contendo IgE em grupos de doentes com diferentes estados de inflamação. Procuramos realizar uma identificação destas células, efectuando a coloração das secções tecidulares previamente observadas em imunofluorescência, com soluto de azul de Alcian ou com soluto de Lendrum, para evidenciar mastócitos e eosinófilos.

Doença de Crohn

As células contendo IgE foram contadas em 24 doentes com doença de Crohn e em 15 indivíduos com mucosa rectal histologicamente normal. As médias observadas foram nos doentes com doença de Crohn $28,5 \pm 21$ e no grupo de normais de $6,3 \pm 4$, apresentando a sua diferença significado estatístico ($p < 0.001$).

As biópsias dos doentes com doença de Crohn, foram divididas, segundo critérios histológicos, em dois grupos, conforme previamente referido. Verificamos para o grupo I uma média de $13,5 \pm 9,4$ células e para o Grupo II $46,1 \pm 20$. A diferença entre estas médias apresentou significado estatístico ($p < 0.001$). Verificou-se, também, diferença significativa entre o Grupo I ($p < 0.02$) e o Grupo II ($p < 0.001$), relativamente ao grupo de normais.

Colite ulcerosa

Estudamos os seguintes grupos, constituídos por 15 doentes cada: Grupo 1 — doentes em fase aguda e com sintomas graves necessitando de internamento hospitalar; Grupo 2 — doentes em recidiva moderada, apesar de estarem em tratamento de manutenção com salazopirina; Grupo 3 — doentes em remissão clínica e sigmoidoscópica e em tratamento com salazopirina.

O número de células IgE, por unidade tecidular de mucosa, foi determinado nos vários grupos estudados (Figs. 52, 53). Verificamos que no grupo com colite ulcerosa em fase aguda, o número de células IgE foi significativamente superior ao verificado no grupo constituído por 15 indivíduos normais ($p < 0.001$), assim como ao dos doentes com colite ulcerosa em remissão ($p < 0.001$). Em dez doentes foram efectuadas contagens durante a fase aguda e após indução da remissão clínica e endoscópica da colite ulcerosa (Figs. 66, 67). Verificamos, também, que o número de células IgE, diminuiu paralelamente com a diminuição da actividade clínica da doença ($p < 0.001$).

Não se observou diferença significativa entre as médias dos doentes com colite ulcerosa em remissão e do grupo de normais.

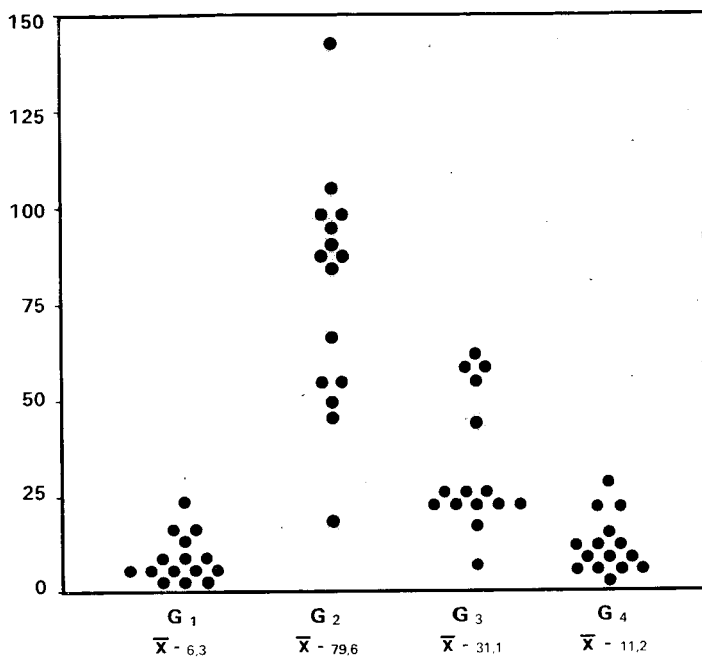


Fig. 52 — Células IgE por unidade de mucosa, no grupo de controle com mucosa rectal histologicamente normal (G_1) e na colite ulcerosa em diferentes estadios de actividade (G_2 , G_3 , G_4).

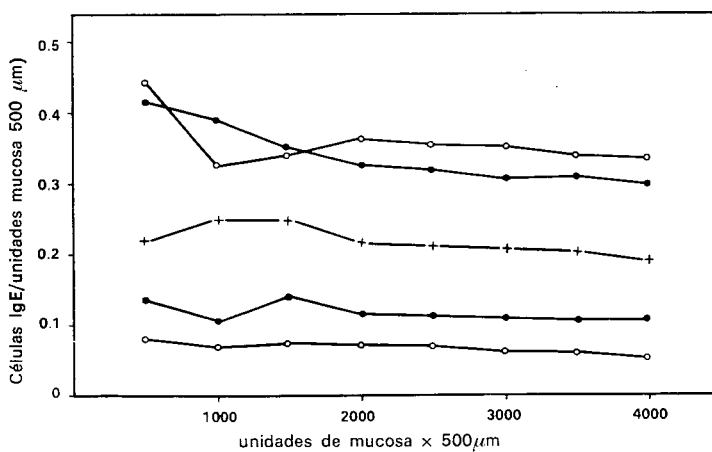
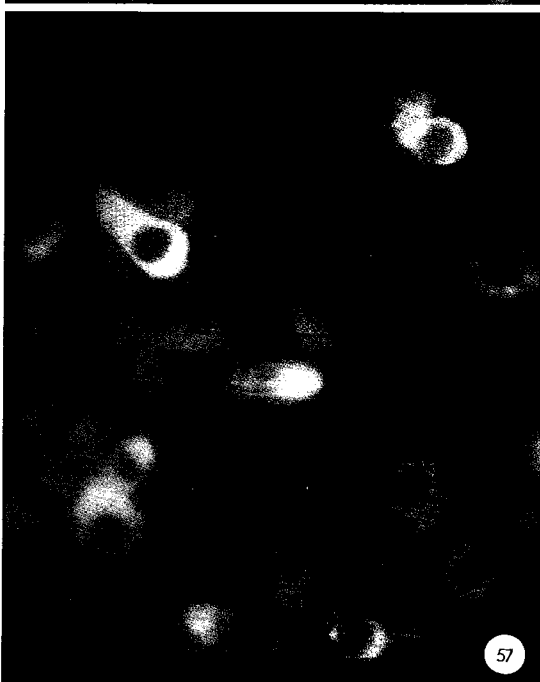
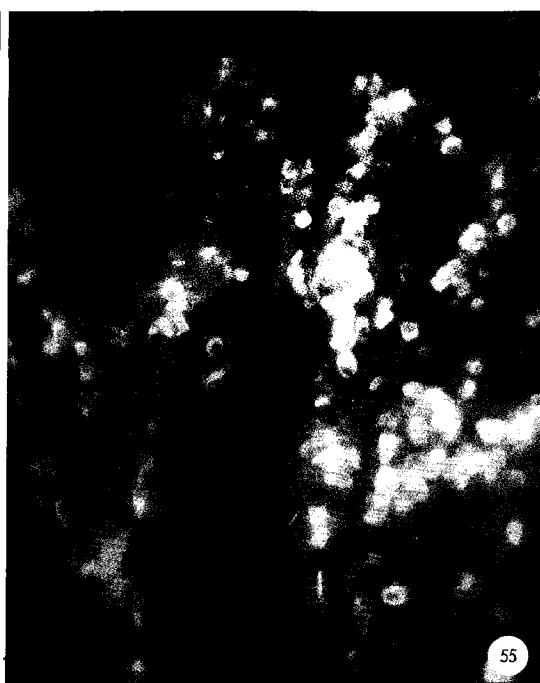
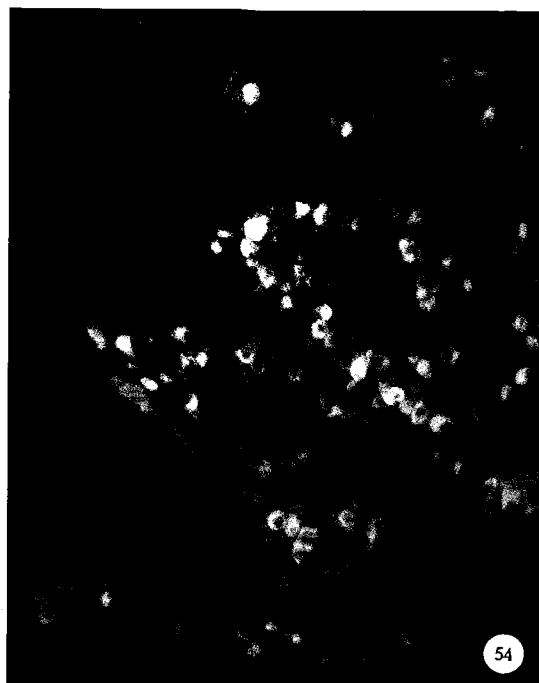


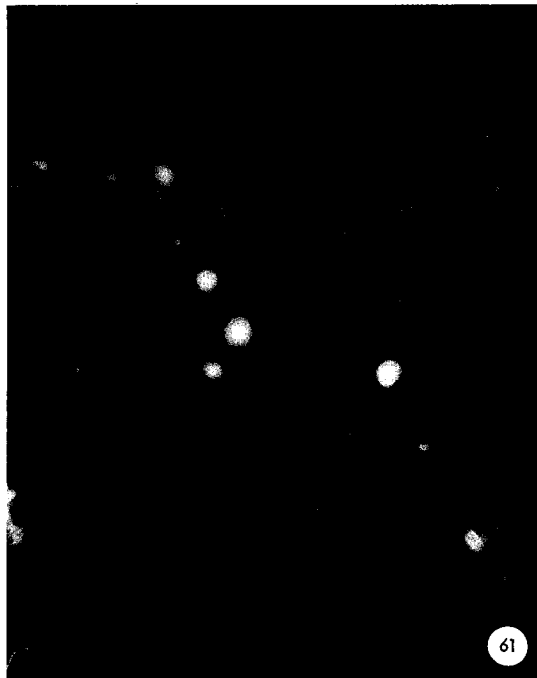
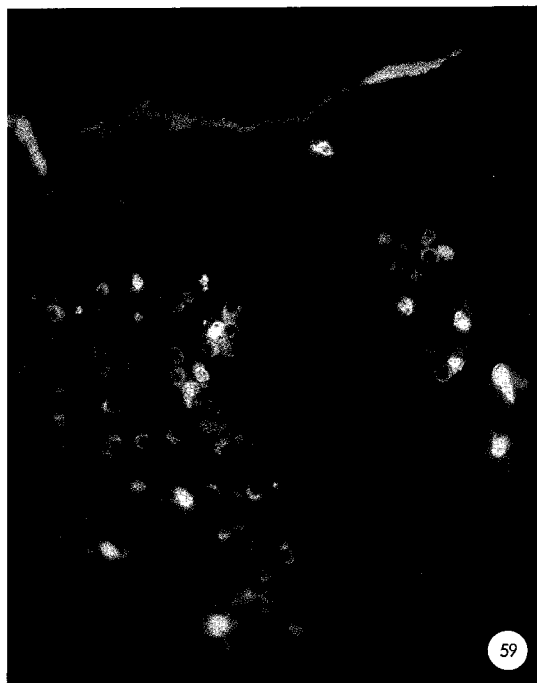
Fig. 53 — Curvas determinadas pela técnica da soma das médias, relativas ao número de células IgE, por unidade de mucosa.



CÉLULAS CONTENDO IMUNOGLOBULINAS NA MUCOSA RECTAL

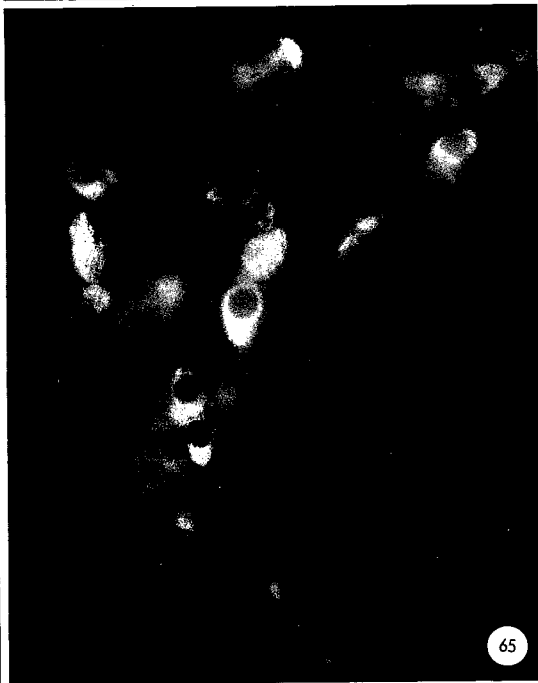
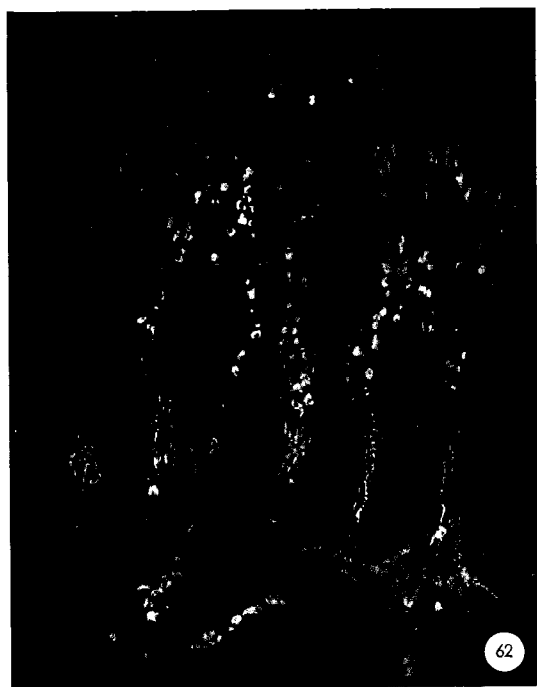
Figs. 54, 55 — Estudo com dupla marcação. Células IgA (verde-fluoresceína); células IgG (vermelho-rodamina), $\times 200$.

Figs. 56, 57 — Secção tecidual estudada com soro anti-IgA e com hematoxilina-eosina. Evidenciam-se plasmócitos com fluorescência $\times 500$.



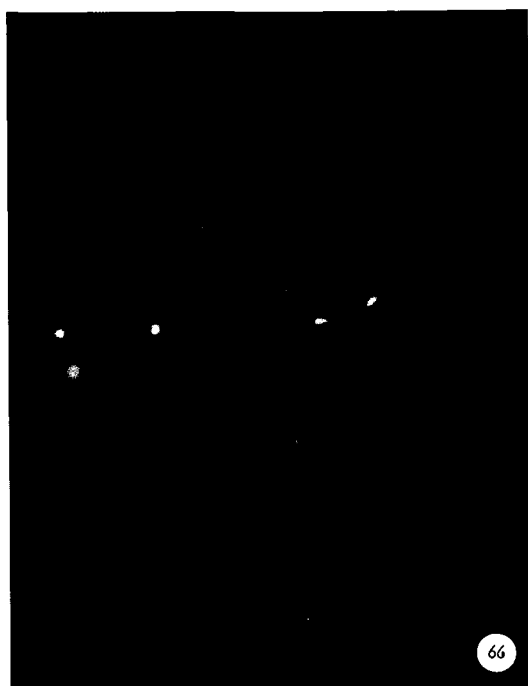
CÉLULAS IgA, IgG e IgM NA MUCOSA RECTAL

Figs. 58 - 61 — Secções tecidulares adjacentes, estudadas com soros anti-IgG (Figs. 58 e 60); anti-IgA (Fig. 60); anti-IgM (Fig. 61), $\times 50$ e $\times 200$.

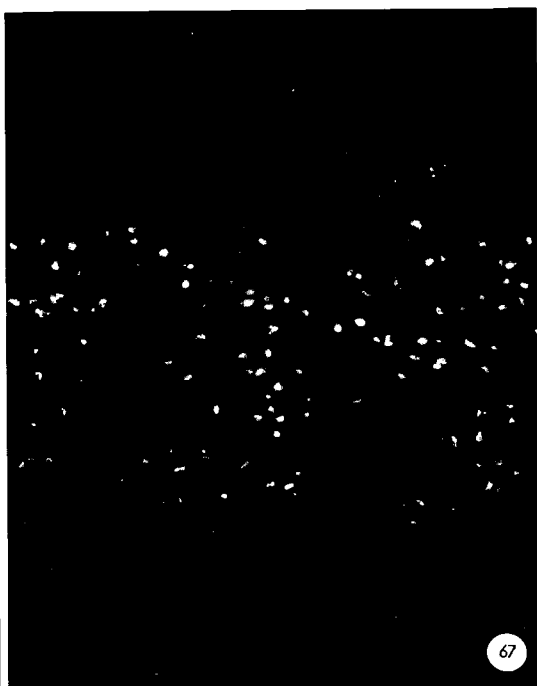


CÉLULAS IgA NA MUCOSA RECTAL

Figs. 62 — Aspecto normal ($\times 100$); 63 — Colite ulcerosa activa $\times 100$.
Figs. 64, 65 — Colite de Crohn, $\times 100$ e $\times 500$.



66



67



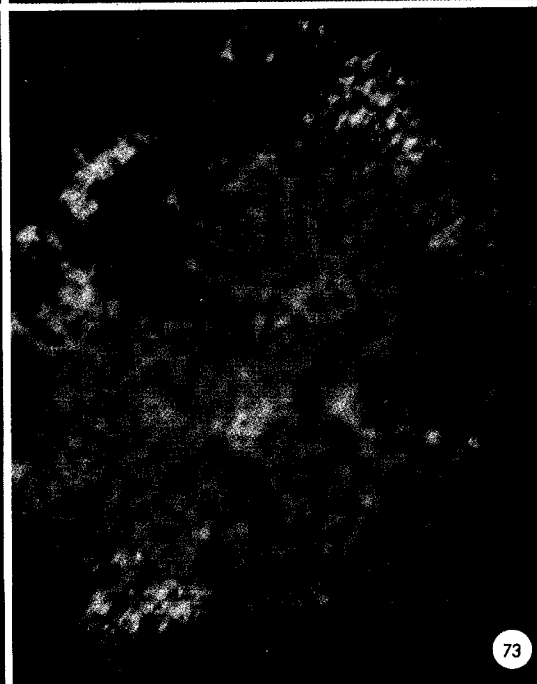
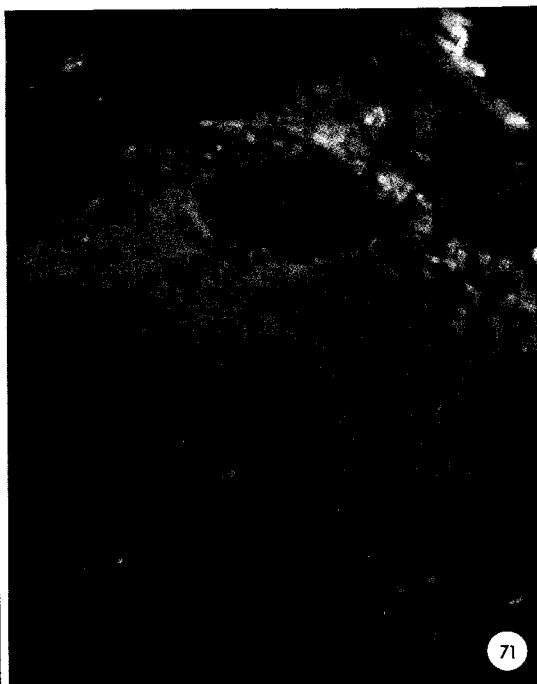
68



69

CÉLULAS IgE e IgG NA MUCOSA RECTAL

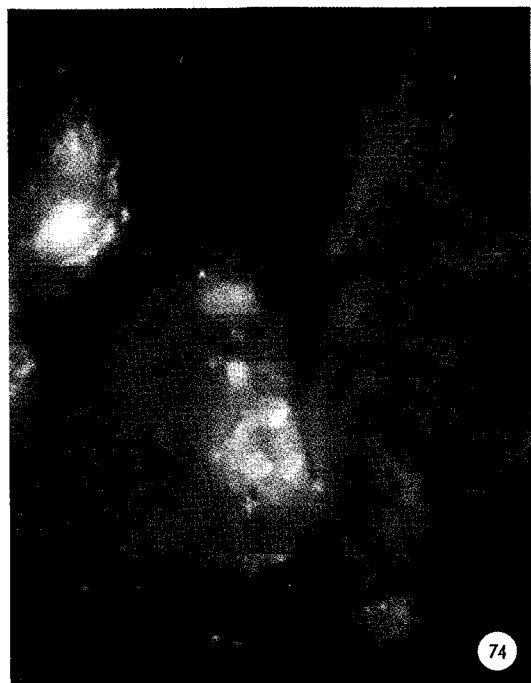
Figs. 66 — Colite inactiva, soro anti-IgE, $\times 200$; 67 — Colite activa, soro anti-IgE, $\times 100$.
 Figs. 68 — Ulceração da mucosa, soro anti-IgG, $\times 100$; 69 — Ulceração da mucosa, soro anti-IgE, $\times 100$.



DEPÓSITOS EXTRA-CELULARES DE IMUNOGLOBULINAS NA MUCOSA RECTAL

Figs. 70 — Imunoglobulina IgG peri-vascular $\times 200$; 71 — Depósito de IgG na periferia de granuloma $\times 200$.

Figs. 72 — Depósito de IgG peri-glandular $\times 200$; 73 — Depósito reticular de IgM em folículo linfóide $\times 500$.



DEPÓSITOS TECIDULARES DE IMUNOGLOBULINA E COMPLEMENTO
EM BIÓPSIAS EXTRA-INTESTINAIS

Figs. 74, 75 — Depósitos extra-celulares na sinovial, produzidos por soro anti-IgG (verde-fluoresceína) e anti-C₃ (vermelho-rodamina) × 500.

Figs. 76 — Depósitos granulares de IgG na sinovial × 200; 77 — Biópsia de «pyoderma gangrenosum», soro anti-IgG e azul de Evans evidenciando positividade (verde) × 200.

c) — *Depósitos de imunoglobinas e de complemento na mucosa rectal*

Nas biópsias com lesões inflamatórias acentuadas, observamos depósitos extra-celulares de imunoglobinas IgG e IgM, bem como da fracção C₃ do complemento. Estes depósitos foram mais evidentes junto da membrana basal do epitélio de revestimento, das criptas glandulares e dos vasos sanguíneos (Figs. 70-72). Nas zonas ulceradas verificamos, ocasionalmente, depósitos de IgE e maior número de células contendo IgE e IgG (Figs. 68, 69). Nos centros germinativos de alguns folículos linfóides, observamos depósitos de IgM, com distribuição reticular (Fig. 73). Na periferia dos folículos linfóides verificamos, com frequência, imunócitos IgG. Nos granulomas, observamos, apenas, fluorescência extra-celular com IgG (Fig. 71). Em cortes seriados e utilizando a técnica de dupla marcação com fluoresceína e rodamina, verificamos que algumas células do infiltrado inflamatório, especialmente leucócitos polimorfonucleados, apresentavam simultaneidade de fluorescência com imuno-soros anti-C₃ e anti-E. Coli polivalente.

d) — *Depósitos de imunoglobulinas e de complemento nas lesões extra-intestinais*

Efectuamos o estudo do tecido sinovial, colhido por biópsia, em 7 doentes com doença de Crohn e que apresentaram artrite do joelho. Em dois casos (29%), verificamos depósitos extra-celulares de IgG e C₃. Estes depósitos, observados em pequena quantidade eram, geralmente, granulares (Figs. 74 - 76). Em nenhum caso foi observado fluorescência celular ou na parede dos vasos.

No estudo que realizamos nas lesões da mucosa da boca, também não observamos depósitos nas paredes dos vasos. Em dois doentes com eritema nodoso e «pyoderma gangrenosum» verificamos na derme, por imunofluorescência e por imunoperoxidase, depósitos de imunoglobulina e de complemento (Fig. 77).

2. ESTUDO ULTRASTRUTURAL

Em 12 doentes com doença de Crohn e em 12 doentes com colite ulcerosa, realizamos estudo das biópsias rectais por microscopia elec-

trónica. Seis doentes com doença de Crohn apresentavam lesões rectais em actividade, enquanto que nos restantes as lesões estavam situadas a outro nível do intestino. As biópsias dos doentes com colite ulcerosa foram efectuadas em 6 doentes com lesões inflamatórias graves e em 6 doentes sem alterações significativas da mucosa rectal nos exames endoscópico e histológico.

A observação ultrastrutural foi dirigida para o epitélio de revestimento, no sentido de procurar alterações morfológicas da barreira epitelial, e para o infiltrado celular da lâmina própria, para estudo da resposta inflamatória imunológica.

Nas biópsias com lesões activas a principal alteração observada no epitélio de revestimento, consistiu na separação dos elementos celulares devido à dilatação dos espaços intercelulares provocada pelo edema (Figs. 82, 83). As células epiteliais apresentavam, ocasionalmente, vacúolos intracitoplasmáticos e na parte apical pequenas estruturas vesiculares membranosas. As microvilosidades eram de pequenas dimensões, todavia, num doente com colite ulcerosa em actividade, verificamos em várias células contíguas, microvilosidades fundidas, formando evaginações pleomórficas do citoplasma (blebs), (Figs. 84, 85).

As células caliciformes tinham morfologia normal. Os linfócitos intrapiteliais foram observados frequentemente, na parte basal do epitélio (Fig. 80-83) e excepcionalmente em migração para o lume intestinal (Figs. 78, 79). Os leucócitos intraepiteliais apresentavam-se, por vezes, desgranulados o que foi mais evidente nos doentes com colite ulcerosa (Figs. 90, 93). Em 2 destes doentes observamos neutrófilos com bactérias fagocitadas e em 2 doentes com doença de Crohn rectal, documentamos bactérias na lâmina própria (Figs. 86-89). A forma e dimensões das bactérias foi diferente em todos os casos e apenas foram observadas em biópsias com necrose focal.

O estudo da resposta imunológica local ao nível da mucosa rectal, compreendeu a observação das células que sintetizam imunoglobulinas (plasmócitos) e de algumas células envolvidas directamente no processo de lesão tecidual mediada por anticorpos (mastócitos, eosinófilos e neutrófilos).

Observamos importantes alterações morfológicas nos plasmócitos, principalmente, nas biópsias dos doentes com lesões rectais em actividade. Estas células constituíram juntamente com os linfócitos, os elementos celulares mais frequentes ao nível da lâmina própria e a sua densidade

foi maior nos casos com lesões inflamatórias activas. Verificamos a presença de numerosos plasmócitos com a configuração de células adultas, isto é, com nucléolo evidente, aparelho de Golgi bem diferenciado, presença de centríolos e retículo endoplásmico rugoso bem diferenciado (Fig. 94). Todavia, observamos também, elementos celulares plasmocitários com morfologia diferente (Fig. 95). Nestas células o retículo endoplásmico rugoso apresentava-se muito dilatado e deformado constituindo cisternas que por vezes apresentavam ruptura, permitindo o efluxo de citoplasma (Figs. 96, 97). As cisternas encontravam-se frequentemente destacadas dos plasmócitos, surgindo como ilhas na lâmina própria, e concentrando-se junto da membrana basal. Descrevemos também plasmócitos obstipados, ou seja contendo material de secreção floculado no interior das cisternas (Fig 98) e plasmócitos com vacúolos citoplasmáticos, contendo fragmentos de membrana no seu interior (Fig. 99).

O aspecto ultrastrutural dos mastócitos revelou heterogeneidade na sua morfologia, que variou desde grandes células repletas de grânulos a células mais pequenas com desgranulação parcial. Nestas células os grânulos eram menos densos ou estavam representados por lacunas vazias e a membrana de revestimento apresentava muitas vilosidades e digitações (Figs. 102-105). Foram encontradas mais vezes nos casos com lesões inflamatórias em actividade, localizadas preferencialmente adjacentes aos vasos sanguíneos e linfáticos, na vizinhança de estruturas do sistema nervoso autónomo e em zonas edemaciadas junto à membrana basal do epitélio.

Observamos, frequentemente, eosinófilos na lâmina própria dispondo-se em grupos e estabelecendo íntimo contacto entre si bem como com outras células do infiltrado inflamatório, especialmente, macrófagos, plasmócitos e neutrófilos (Figs. 100, 101). Verificamos, por vezes, alterações ao nível dos grânulos dos eosinófilos, caracterizada pela perda total ou parcial do seu conteúdo. O mesmo fenómeno foi observado nos neutrófilos e basófilos do infiltrado inflamatório da lâmina própria. Estas células encontraram-se preferencialmente localizadas próximo de vasos sanguíneos, e junto da membrana basal do epitélio de revestimento (Figs. 91, 93).



LINFÓCITOS INTRAEPITELIAIS NA DOENÇA DE CROHN

Figs. 78, 79 — Linfócitos em migração para o lume intestinal e no interior do mesmo $\times 6\,000$ e $\times 4\,500$.

Figs. 80, 81 — Linfócitos com grânulos intracitoplasmáticos $\times 7\,500$ e $\times 6\,000$.



ALTERAÇÕES EPITELIAIS NA COLITE ACTIVA

Figs. 82, 83 — Separação dos elementos celulares; Linfócitos com numerosos lisossomas $\times 6\,000$.

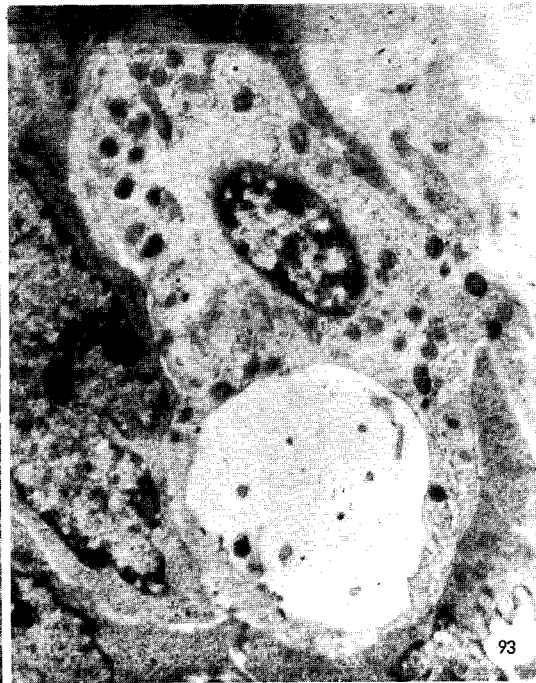
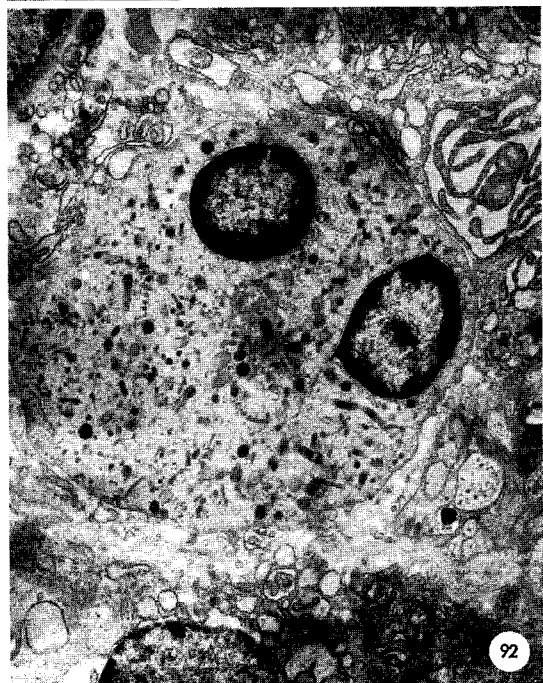
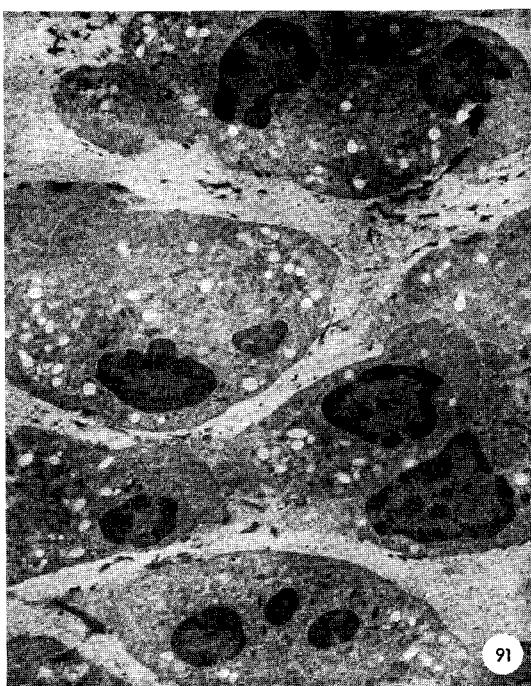
Figs. 84, 85 — Microvilosidades em forma de «blebs», na colite ulcerosa $\times 12\,000$ e $\times 15\,000$.



BACTÉRIAS NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Figs. 86, 87 — Bactérias na lâmina própria, próximo da membrana basal em doentes com doença de Crohn (seta) $\times 4\,500$ e $\times 9\,000$.

Figs. 88, 89 — Bactérias intracelulares na colite ulcerosa (seta) $\times 9\,000$ e $\times 22\,500$.



LEUCÓCITOS NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

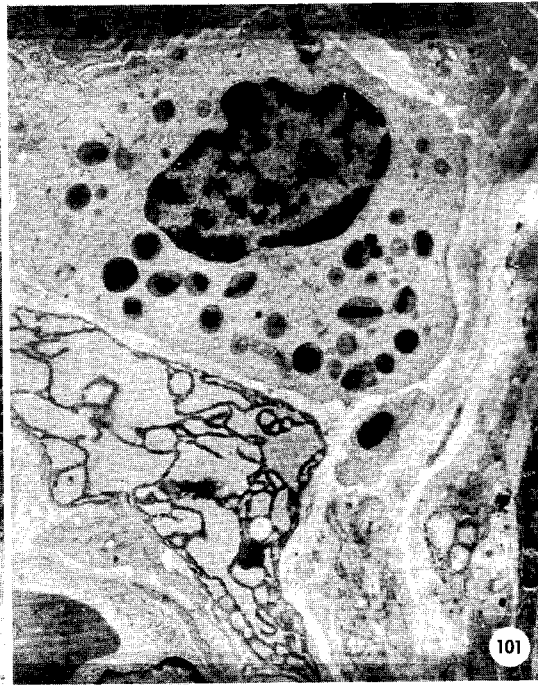
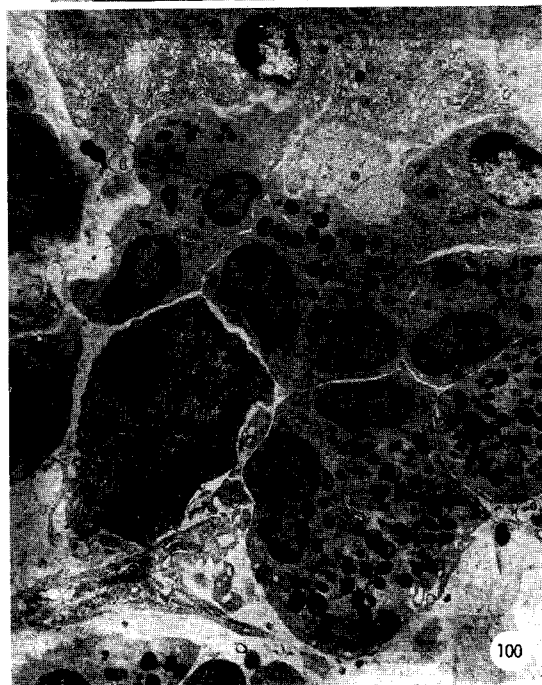
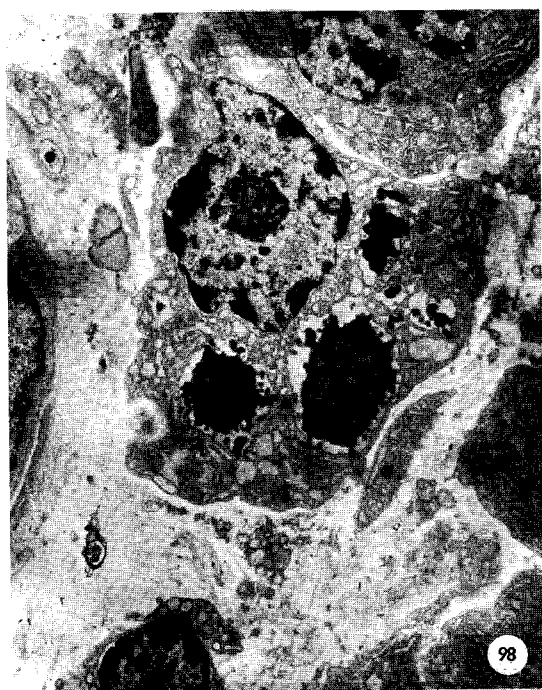
Figs. 90 - 92 — Neutrófilos com vacúolos intracitoplasmáticos e parcialmente desgranulados ($\times 7\,500$, $\times 4\,500$ e $\times 6\,000$).

Fig. 93 — Basófilo desgranulado, a atravessar a membrana basal do epitélio $\times 7\,500$.



PLASMÓCITOS NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Figs. 94 — Plasmócito maduro, com retículo endoplasmático rugoso, ap. de Golgi e centríolos bem diferenciados $\times 9\,000$; 95 — Plasmócito com morfologia atípica $\times 6\,000$.
Figs. 96, 97 — Plasmócitos com dilatação acentuada do retículo, formando cisternas $\times 6\,000$.

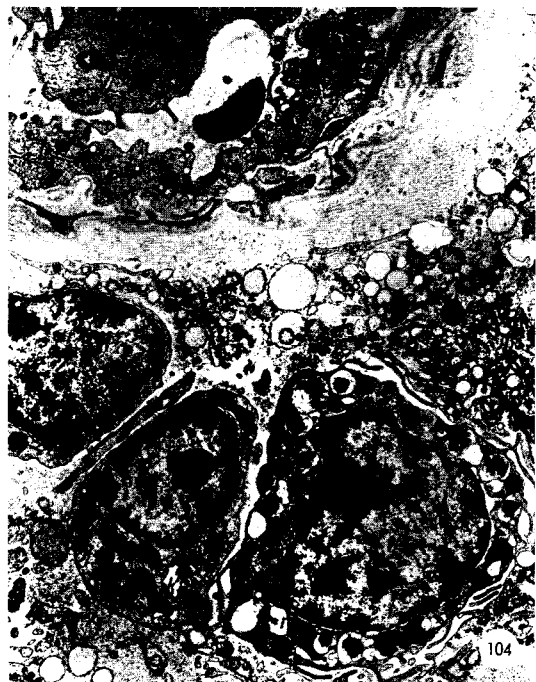
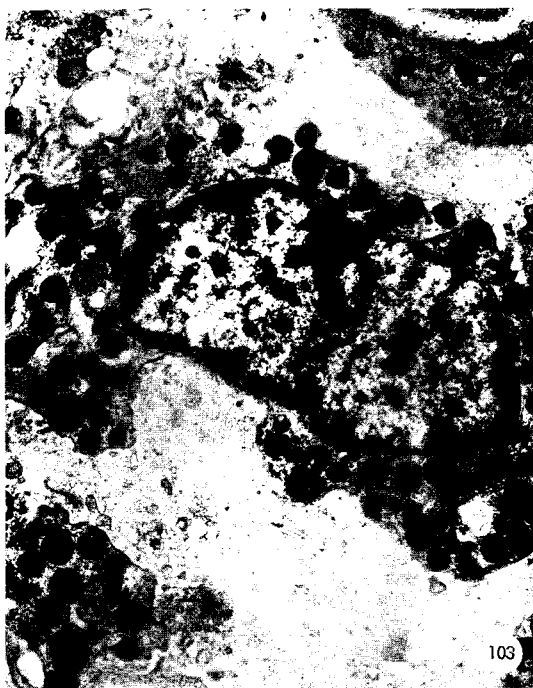


PLASMÓCITOS E EOSINÓFILOS NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Fig. 98 — Plasmócito «obstipado» $\times 6\,000$.

Fig. 99 — Plasmócito com vacúolo intracitoplasmático ($\times 12\,000$).

Figs. 100, 101 — Eosinófilos parcialmente desgranulados $\times 4\,500$ e $\times 6\,000$.



MASTÓCITOS NA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Figs. 102 - 105 — Mastócitos em diferentes fases de desgranulação, próximo de vasos e de estruturas nervosas $\times 6\,000$ e $\times 9\,000$.

DISCUSSÃO

Manifestações sistémicas

Poucas doenças humanas estão associadas com tantas manifestações sistémicas como a doença inflamatória do intestino. Esta associação inclui, virtualmente, todos os órgãos e sistemas do corpo (6,64).

A etiologia e a patogénese das complicações sistémicas, permanecem tão obscuras como as da doença inflamatória intestinal subjacente (16). Todavia, uma vez que estas complicações são semelhantes na doença de Crohn e na colite ulcerosa, a lesão intestinal pode ser a fonte das manifestações à distância. De facto, muitas destas complicações, como as que ocorrem nas articulações, pele, boca e olhos, parecem resultantes de um mecanismo de hipersensibilidade, relacionado com a lesão intestinal. Outras manifestações, porém, podem ser secundárias a antigenemia ou bacteriemia pélvica e portal, nomeadamente, as doenças hepáticas e as complicações trombo-embólicas. Finalmente, a perturbação funcional resultante das lesões anatómicas do intestino ocasiona, por vezes, graves alterações metabólicas, devidas às perdas de sangue, líquidos, electrólitos e substâncias nutritivas (3,7).

Analizamos seguidamente, as complicações dependentes de um provável mecanismo imunológico com origem na inflamação intestinal e expressão ao nível da sinovial, pele, boca e aparelho coróideu do olho.

Lesões articulares

Embora a associação de doença inflamatória intestinal e artrite, tenha sido referida pela primeira vez, no Lancet em 1895, em dois doentes com colite que apresentavam depósito articular de «urato de sódio», a artite como doença associada ou complicação da colite ulcerosa foi pela primeira vez descrita por Borgen em 1929, num grupo de 30 doentes

(102, 103). A confusão criada pelo facto da artrite periférica ser interpretada como artrite reumatóide e da não separação desta doença da espondilite anquilosante, só foi clarificada nas duas últimas décadas, com uma melhor definição dos síndromes reumáticos associados com a colite ulcerosa e a doença de Crohn (26-30). Nestas doenças, ocorrem dois tipos principais de manifestações articulares: artrite periférica (sinovite intestinal, artrite colítica ou artrite enteropática) e artrite axial (sacroileíte e espondilite anquilosante) (6).

A incidência da artrite periférica na colite ulcerosa e doença de Crohn, varia entre 12 e 34 % na maioria das séries publicadas recentemente (16, 26, 27, 33, 75, 104, 105). Durante muitos anos, pensou-se que a artrite era mais frequente na colite ulcerosa do que na doença de Crohn, todavia, mais recentemente, verificou-se que esta associação é pelo menos tão frequente, se não mesmo superior na doença de Crohn (27, 75).

As características clínicas da artrite são semelhantes na colite ulcerosa e na doença de Crohn, sendo negativos os testes para o factor reumatóide (105, 106). Na maioria dos doentes a artrite inicia-se, subitamente, sendo monoarticular ou pauciarticular e afecta, principalmente, as grandes articulações dos membros inferiores, de modo assimétrico. As articulações atingidas apresentam-se, geralmente, tumefactas e dolorosas, podendo ter um carácter migratório e assemelhando-se à febre reumática. Os sinais inflamatórios desaparecem, geralmente, dentro de 6 semanas sem deixar deformação articular. A artrite, tal como as outras complicações extra-intestinais, raramente, precede o início da doença intestinal, é mais frequente nos doentes com lesões extensas do intestino e surge, habitualmente, durante os agravamentos da doença intestinal, muitas vezes em associação com úlceras aftosas da boca, lesões da pele e irite (3, 16, 26-30, 75).

A coincidência entre os agravamentos dos sintomas intestinais e articulares, assim como a resposta favorável destes ao tratamento médico ou cirúrgico, dirigidos à doença intestinal são mais aparentes na colite ulcerosa que na doença de Crohn (27, 105). A impossibilidade frequente de avaliar a gravidade e extensão das lesões da doença de Crohn e de remover cirurgicamente todo o intestino lesado, podem explicar a menor coincidência na evolução de ambas as alterações.

Na doença de Crohn, observa-se uma maior incidência de artrite nos casos com colite ou ileocolite do que naqueles com lesões do intestino

delgado (107, 108). Verifica-se também uma incidência mais elevada de artrite nos casos com doença peri-anal (75).

A espondilite anquilosante é cerca de vinte vezes mais frequente nos doentes com doença inflamatória intestinal do que na população em geral (6). A sua frequência na doença de Crohn, foi estudada apenas em algumas séries de doentes e variou de 2 a 6,9 % (3, 27, 105). O aumento da frequência de espondilite anquilosante na colite ulcerosa, encontra-se estabelecido em vários trabalhos, observando-se associação em 2,8 a 12,6 % dos doentes (3, 26, 28, 109). A espondilite que acompanha a doença inflamatória intestinal é clínica e radiologicamente idêntica à espondilite anquilosante ideopática, embora a sua gravidade e preponderância pelo sexo masculino sejam menores (5, 30, 31, 110, 111). A espondilite anquilosante pode preceder o desenvolvimento da doença intestinal e apresentar evolução independente, contrariamente ao observado na artrite periférica (28, 109, 112).

Os familiares dos doentes com doença inflamatória intestinal, apresentam também maior incidência de espondilite e uveíte bem como associação com o antigéneo de histocompatibilidade B₂₇ (28, 32, 33).

Nos doentes que estudamos, a incidência de artrite periférica foi de 23 % na doença de Crohn e de 20 % na colite ulcerosa e verificamos associação com espondilite anquilosante em 5 % dos doentes com doença de Crohn e em 7 % dos doentes com colite ulcerosa. Estes resultados apresentam concordância com os observados por outros autores, conforme já referimos. Todavia, na revisão de literatura que efectuamos sobre a associação de artrite com doença inflamatória intestinal, observamos grande diferença na prevalência, verificando-se uma tendência para os gastroenterologistas referirem uma incidência mais baixa de artrite do que os reumatologistas, reflectindo, presumivelmente, menos interesse e experiência nesta área (27). Outra razão para as diferenças observadas, deve-se ao facto de algumas séries incluírem também artralgia e queixas reumáticas mal definidas. No estudo que realizamos, apenas consideramos como sinovite, os sinais agudos de lesão articular e excluímos outras causas de reumatismo, ocasionalmente associadas com doença inflamatória do intestino. A associação com artrite reumatóide ocorreu apenas numa doente com colite ulcerosa que não foi incluída no estudo, por se considerar que a artrite colítica é específica, portanto, diferente da artrite reumatóide nos aspectos clínico, radiográfico, e serológico (33).

Na distribuição por sexos, verificamos que o quociente mulheres/

/homens foi para a totalidade dos doentes com colite ulcerosa de 1,22; para os doentes com colite ulcerosa associada a artrite periférica, esta razão foi de 2,0 e para os doentes com espondilite anquilosante de 0,33. Este quociente foi na totalidade dos doentes com doença de Crohn de 1,10, e no grupo com artrite de 1,25. Os dois casos observados com doença de Crohn e espondilite anquilosante pertenciam ao sexo masculino. Verificamos, portanto, um predomínio de artrite periférica nas mulheres e de espondilite nos homens.

O começo da artrite surgiu em indivíduos mais jovens na doença de Crohn ($31,4 \pm 13,8$ anos) do que no colite ulcerosa ($39,7 \pm 8,2$ anos), tal como aconteceu com o início da própria doença intestinal. A artrite colítica, começou geralmente de forma aguda, afectando, predominantemente, uma única articulação dos membros inferiores, geralmente o joelho ou a articulação tíbio-társica. Estes resultados apresentam concordância, em geral, com os publicados previamente no que respeita à distribuição da artrite, predomínio das grandes articulações sobre as pequenas e dos membros inferiores sobre os superiores. Confirmamos também a semelhança das características clínicas das manifestações articulares da doença de Crohn e da colite ulcerosa.

A maioria dos casos de artrite surgiram simultaneamente com o começo dos sintomas intestinais e nos restantes verificou-se que a frequência do seu aparecimento aumentou com o tempo de duração da doença, contrariamente, ao observado nos doentes com lesão da coluna, em que as queixas articulares precederam os sintomas intestinais. Verificou-se, geralmente, paralelismo entre o agravamento dos sintomas intestinais e articulares, nos doentes com artrite periférica. Confirmamos portanto, que a maioria dos casos de artrite intestinal, ocorrem ou simultaneamente com o começo da doença intestinal ou durante a evolução e verificamos uma tendência para os exacerbamentos da doença articular e intestinal coincidirem. Cerca de metade dos doentes com doença de Crohn e artrite, apresentaram lesões no colon e em cerca de um terço dos casos havia também formação de fistulas. A frequência da artrite periférica variou com a extensão das lesões de colite ulcerosa, sendo maior nos casos com colite total. Pelo contrário, as lesões de espondilite surgiram, principalmente, nos doentes que apresentaram rectosigmoidite. Em dois doentes com artrite periférica observaram-se alterações radiográficas de entesopatia, conforme é característico nas espondiloartropias seronegativas. As principais alterações radiográficas observadas nos

doentes com espondilite anquilosante, foram esclerose das articulações sacro-iliacas e diminuição dos espaços intervertebrais lombares com osteofitose e calcificação dos ligamentos, todavia sem a exuberância que ocorre na espondilite anquilosante ideopática.

Com o tratamento médico, anti-inflamatório, dirigido à doença intestinal observou-se melhoria concomitante das manifestações articulares periféricas, enquanto que, as lesões de espondilite evoluíram independentemente dos tratamentos realizados para a doença inflamatória intestinal.

Os doentes com manifestações articulares, apresentaram, frequentemente, outras complicações extra-intestinais. Em 41 % destes doentes ocorreu também eritema nodoso, criando algumas vezes, dificuldade no diagnóstico diferencial, entre artrite colítica e febre reumática. A associação com úlceras na boca verificou-se em 56 % dos casos e com lesões oculares em 33 % destes doentes. Verificamos, também, que a artrite é significativamente mais frequente nos doentes que apresentaram outras complicações extra-intestinais. Assim, todos os doentes que apresentaram eritema nodoso, tiveram simultaneamente artrite aguda (100 %) enquanto que dos doentes sem eritema nodoso, somente 21 % apresentaram artrite. Nos doentes que tiveram estomatite aftosa recorrente, verificou-se artrite em metade (50 %), comparativamente com a incidência de 19 % observada nos doentes sem úlcera da boca. No que respeita ao grupo de doentes que apresentaram lesões oculares, verificou-se associação significativa com artrite em 69 % dos casos, enquanto que nos restantes doentes sem esta complicação a artrite ocorreu em 24 %.

Lesões cutâneas

As principais lesões da pele associadas à doença intestinal inflamatória, são eritema nodoso e «pyoderma gangrenosum» (5-7, 115).

Conforme a literatura, o eritema nodoso pode aparecer em cerca de 5 a 15 % dos doentes e surge, geralmente, durante a fase de actividade da doença, conjuntamente com artrite, úlcera na boca e irite (6, 115). As lesões são constituídas por nódulos cutâneos vermelhos, duros e dolorosos, localizados electivamente na superfície de extensão dos membros inferiores. Histologicamente caracteriza-se por vasculite com tumefacção das células endoteliais e infiltrado inflamatório peri-vascular (5, 6, 116).

A lesão de «pyoderma gangrenosum» é muito rara e, embora característica da doença inflamatória intestinal pode ocorrer associada com outras entidades patológicas. Surge na colite ulcerosa, numa incidência de 0,5 a 5 % e é ainda menos frequente na doença de Crohn (3,5-7,100, 117). A associação de «pyoderma gangrenosum» com artrite e com doença inflamatória intestinal tem sido descrita raramente (101, 118-120). Os aspectos clínicos desta complicação são característicos, e traduzem-se por lesão ulcerosa e destrutiva da pele, geralmente, com margem serpiginosa, violácea e localizada na região pré-tibial da perna. As alterações histopatológicas compreendem necrose, supuração, angíte com necrose fibrinóide e trombose, e ocasionalmente granuloma (5-7, 115-123).

Nos nossos doentes, observamos eritema nodoso em 11 % dos casos. Esta complicação extra-intestinal surgiu geralmente durante as fases de agudização da doença intestinal e foi mais frequente na doença de Crohn (20 %) do que na colite ulcerosa (5 %). Todos os doentes que apresentaram eritema nodoso tiveram simultaneamente artrite aguda e verificaram-se também associações significativas com estomatite aftosa e com lesões oculares.

Observamos «pyoderma gangrenosum» em 3 % dos doentes. Dois deles tinham doença de Crohn e um apresentava colite ulcerosa. Verificamos associação com espondilite anquilosante num dos doentes com doença de Crohn. Esta associação de «pyoderma gangrenosum», espondilite anquilosante e doença inflamatória intestinal, no mesmo doente, é excepcional (101, 119).

Estomatite aftosa

A ulceração aftosa recorrente da boca, é uma complicação frequente na doença inflamatória do intestino. A sua frequência tem sido avaliada em 20 % (124). Esta percentagem elevada pode dever-se ao facto destas lesões estarem associadas, com baixa de ferro e ácido fólico séricos, aspectos que se observam na doença inflamatória do intestino (125). Todavia, os mecanismos imunológicos parecem desempenhar um papel relevante na etiologia das úlceras da boca (126, 127). As úlceras assemelham-se geralmente a aftas de tamanho variável, podendo ser assintomáticas ou muito dolorosas. O seu início é habitualmente súbito,

coincidente com a recorrência dos sintomas intestinais e com o aparecimento de outras complicações extra-intestinais (3, 6, 7, 124). Todavia, na doença de Crohn podem ocorrer lesões na boca, que apresentam aspectos macroscópico e histológico característicos da doença, portanto, sobreponíveis aos observados em outros segmentos do tubo digestivo (128).

A frequência de estomatite ulcerosa nos doentes que estudamos foi de 29 %. Estas lesões surgiram geralmente durante a fase de doença intestinal em actividade, acompanhada de outras manifestações sistémicas.

Lesões oculares

As lesões oculares, frequentemente, associadas com a doença inflamatória intestinal são: conjuntivite, uveíte (incluindo irite), e episclerite (6). A frequência destas complicações tem sido referida em 4 a 13 % dos doentes (3,6). Verifica-se geralmente o seu aparecimento durante as agudizações da doença intestinal. A maioria dos doentes com manifestações oculares têm simultaneamente outras complicações sistémicas, nomeadamente articulares, sendo mais frequente nos que têm espondilite (20 %), do que, nos que têm artrite (12 %) (16, 28, 129).

Nos doentes que estudamos, as lesões oculares surgiram em 12 % dos casos. Estas complicações ocorreram após o começo dos sintomas intestinais, geralmente, associadas com outras manifestações extra-intestinais.

Em suma, verificamos que 34 % dos nossos doentes apresentaram pelo menos uma complicação extra-intestinal nas articulações, pele, boca e olhos. Estas mesmas complicações surgiram em 36 % dos casos na série de Greenstein, baseada no estudo de 700 doentes (6). A semelhança dos nossos resultados deve-se, provavelmente, ao facto de termos utilizado um questionário orientado para as manifestações sistémicas que foi repetidamente perguntado a cada doente nas consultas, durante este período de 7 anos. Verificamos artrite periférica em 21 %, espondilite anquilosante em 6 %, estomatite aftosa em 29 %, eritema nodoso em 11 %, «pyoderma gangrenosum» em 3 % e conjuntivite ou uveíte em 12 % dos casos.

A frequência e as características clínicas destas complicações foram semelhantes na doença de Crohn e na colite ulcerosa.

O aparecimento e a actividade clínica das complicações extra-intestinais coincidiu, geralmente, com as fases de agudização da doença intestinal. Todavia, os doentes com espondilite anquilosante não apresentaram tal paralelismo, comportando-se a doença intestinal e articular, como doenças associadas.

As combinações de complicações extra-intestinais no mesmo indivíduo surgiram em maior frequência do que seria de esperar pelo acaso. Efectivamente, em 22 % dos doentes observaram-se manifestações extra-intestinais múltiplas.

Outras alterações sistémicas

Na doença inflamatória do intestino, as manifestações sistémicas que têm sido interpretadas como secundárias a antigeniemia ou bacteriemia pélvica e portal, compreendem as doenças hepatobiliares e as lesões provocadas por tromboembolismo (3,7).

Embora o fígado faça parte do aparelho digestivo o seu envolvimento na doença inflamatória do intestino tem sido considerado como uma complicação sistémica. São muito variáveis as lesões hepáticas que podem acompanhar a doença inflamatória intestinal, variando desde uma simples inflamação dos espaços porta, pericolangite, até à cirrose hepática. Em trabalhos em que foram realizadas determinações de transaminases, fosfatase alcalina e retenção da sulfabromoftalaína, evidenciaram-se alterações em 10 a 15 % dos doentes (3, 6, 7). As biópsias hepáticas quando realizadas nestes doentes, nem sempre revelaram alterações histológicas, tal como sucedeu nos casos que tivemos oportunidade de estudar com alteração da função hepática. Todavia, outros trabalhos referem que as alterações hepáticas, quando diligentemente procuradas, são encontradas em percentagem elevada de doentes (64, 130-133). Lesões hepáticas têm, também, sido descritas em doentes com diverticulite aguda ou com apendicite supurativa, o que sugere uma relação com o intestino inflamado ou com a flora microbiana intestinal anormal (64). Em alguns estudos experimentais, verificou-se que a bacteriemia portal crónica pode produzir inflamação portal, hiperplasia das células de Kuppfer, necrose focal dos hepatócitos e proliferação dos

canalículos biliares, todavia, sem produzir a colangite esclerosante (64, 134). Estudos imunológicos sobre a patogênese desta lesão, não têm sido concludentes, embora um mecanismo imunológico possa ser uma possibilidade atraente (6,64), conforme sugere o facto de existirem determinantes antigénicos comuns entre os canais biliares e o epitélio do colon.

A doença tromboembólica é uma complicação frequente da doença de Crohn e da colite ulcerosa (5-7). Foi por nós observada em 12 % dos casos. Vários factores podem contribuir para o desenvolvimento da trombose vascular, tais como: o repouso, a toxemia, o tratamento cirúrgico e a alteração da coagulação (136-138).

A principal complicação renal descrita na doença inflamatória do intestino é a nefrolitíase. Esta situação resulta, provavelmente, de alterações que ocorrem na fisiologia do colon (3, 5-7, 139-141). A incidência de litíase renal varia de 2 a 10%, sendo ainda mais frequente nos doentes submetidos a tratamento cirúrgico. Nos nossos doentes, observamos esta complicação em 9 %. Os cálculos de oxalato são particularmente frequentes na doença de Crohn em consequência da má absorção de sais biliares no íleo terminal (6,141).

A anemia é uma complicação muito frequente da doença inflamatória intestinal, conforme tivemos oportunidade de constatar nos doentes que estudamos. Esta complicação deve-se, geralmente, a factores reversíveis, tais como as deficiências de ferro, de vitamina B₁₂ e de ácido fólico. A anemia pode, portanto, ser uma consequência das lesões do intestino, mas outras vezes, resulta de alteração sistémica (hemólise) ou da utilização de fármacos (sulfasalazina, azatioprina, etc.) (142-144).

Têm sido descritas outras alterações sistémicas, como por exemplo: vasculite, pericardite aguda, miosite, síndrome nefrótico, doença da tireóide, fibrose pulmonar intersticial e amiloidose (145-155). Destas complicações observamos pericardite aguda numa doente com doença de Crohn e bócio numa doente com colite ulcerosa.

Imunopatogénese das manifestações extra-intestinais

O facto de se ter verificado associação significativa de múltiplas complicações extra-intestinais no mesmo doente, sugere um mecanismo patogénico comum (75). A evidência clínica de que as manifestações nas articulações, pele, boca e olhos, surgem geralmente após o começo dos sintomas intestinais e de que se verifica simultaneidade na expressão

da sintomatologia intestinal e extra-intestinal, manifestada quer nos agravamentos, quer nas remissões clínicas induzidas pela terapêutica, apoia a hipótese de o mecanismo patogénico destas complicações ser dependente da lesão intestinal. Conforme referimos, previamente, este mecanismo pode estar relacionado com factores bacterianos e imunológicos, actuando de forma complementar, como parece ocorrer noutras doenças intestinais associadas com espondiloartropia sero-negativa (23, 25, 156).

A pesquisa de uma causa infecciosa para a doença inflamatória intestinal não é um facto recente e a incapacidade prolongada em demonstrar um agente específico, pode significar a existência de múltiplos agentes capazes individualmente de iniciar a doença, ou que esta resulta da interacção de múltiplos agentes, nenhum dos quais, por si só capaz de a desencadear (35, 157, 158). Um facto clínico importante é que o colon e o intestino delgado podem reagir a agentes patogénicos específicos de uma maneira não específica, resultando uma situação clínica, endoscópica e radiográfica que pode semelhar a colite ulcerosa e a doença de Crohn (159-160).

Apesar do intestino estar exposto a um número infinito de antígenos, têm sido, principalmente, os agentes microbianos que receberam a maioria das referências como candidatos etiológicos destas doenças (157-162). Este facto, resulta em grande parte das semelhanças clínicas da colite ulcerosa com a disenteria bacilar e da doença de Crohn com a tuberculose (8, 163). Além disso, aspectos histológicos da colite ulcerosa, tais como a destruição das células epiteliais, a microulceração, a infiltração celular por granulócitos e células mononucleares com formação de abscessos crípticos, podem ocorrer nas enterites bacterianas. De forma análoga, a infiltração por linfócitos, a presença de fagócitos mononucleares e de granulomas na doença de Crohn, sugerem à primeira vista a lesão da tuberculose. Acresce ainda que, muitos dos modelos animais da doença inflamatória intestinal, são causados por agentes microbianos (164). As investigações iniciais para identificação de micobactérias na doença de Crohn, deram lugar recentemente a estudos de culturas celulares e de inoculação animal, para pesquisa sobretudo, dos organismos propostos como culpados, principalmente, bactérias não capsuladas e vírus (8, 165-168). Este conceito de que agentes bacterianos entéricos podem ser causadores da doença inflamatória intestinal é antigo e foi reforçado pela descrição de que a colite ulcerosa surge em 10 a 15 %

dos doentes após desenteria por *Shigela* (163). Igualmente, foi referido um aumento de susceptibilidade à infecção por *Salmonella* nos doentes com doença inflamatória intestinal (169-170). Outros microorganismos, tais como *Clostridium difficile*, *Yersinia enterocolitica* e *Campylobacter fetus*, podem causar enterite e simular a doença inflamatória do intestino (160, 171-174). A incidência de super-infecção provocada por estes microorganismos na doença inflamatória intestinal não é conhecida, todavia, as enterites produzidas por estas bactérias podem complicar-se com artrite e eritema nodoso (19, 22, 156, 175). Assim, estes agentes bacterianos podem estar implicados na patogénese de algumas das complicações extra intestinais da doença inflamatória intestinal. Estas complicações, verificam-se, também, em doentes submetidos a derivação jejuno-ileal para tratamento da obesidade, em consequência da absorção sistémica de antígenos bacterianos (176-178). Na maioria dos doentes com doença de Whipple ocorre artrite. O seu mecanismo patogénico não é conhecido. Todavia, apesar do «bacilo de Whipple» não estar identificado, sabe-se que apresenta constituição antigénica semelhante à *Shigella flexneri* e ao *Streptococcus*, agentes susceptíveis de provocar artrite reactiva (58-60, 179, 180). Estas observações sugerem que a microflora intestinal é, provavelmente, a fonte de algumas das complicações sistémicas da doença inflamatória intestinal. De facto, um aumento da absorção de antígenos através do epitélio intestinal, parece ocorrer na doença inflamatória do intestino, conforme é sugerido pela demonstração de endotoxinas e pelo aumento do título de anticorpos para antígenos bacterianos e alimentares no sangue (34-38, 181-186).

Uma das primeiras teorias propostas para a patogénese da colite ulcerosa, foi a alergia alimentar (187). A hipótese de uma resposta imunológica anormal, foi depois impulsionada com a demonstração de anticorpos anti-colon no soro dos doentes com doença de Crohn e com colite ulcerosa (188, 189). Estes anticorpos reagem com antígenos de células epiteliais do colon e da mucosa bucal e têm reacção cruzada com lipossacarídeos extraídos da *Escherichia Coli*, comuns a muitas *Enterobacteriaceae* (antígeno de Kunin) (190-193). O significado destes anticorpos não é conhecido, sendo contudo, possível que participem na reacção tecidular como constituintes de complexos imunológicos ou que actuem em reacções de citotoxicidade celular (194).

A presença de anticorpos anti-bacterianos verifica-se, nestes doentes, para um grande número de agentes bacterianos, o que pode

reflectir a sua presença dentro dos tecidos lesados (184-186). Com efeito estes anticorpos foram demonstrados na mucosa rectal e cólica de doentes com colite ulcerosa (50). Os anticorpos anti-bacterianos poderiam determinar a formação de complexos imunológicos, os quais por sua vez poderiam ser responsabilizados pelas complicações extra-intestinais. Efectivamente, estas complicações são clinicamente semelhantes às que ocorrem em doenças, reconhecidamente, provocadas por complexos imunológicos (34-38). Acresce ainda que, também na doença de Whipple, nas enterites bacterianas e na «enteropatia de derivação» complicadas de artrite, foram observados complexos imunológicos circulantes (23, 40, 41, 175, 178). Na doença inflamatória do intestino têm sido descritas numerosas alterações da imunidade, entre as quais figuram os complexos imunológicos, que podem, eventualmente, participar na imunopatogénese das complicações extra-intestinais (34-39). São numerosos os trabalhos publicados na literatura sobre este assunto, verificando-se, todavia, alguma confusão motivada pela grande variabilidade dos resultados. Este facto, deve-se em grande parte a diferenças nos métodos de investigação utilizados, a numerosas dificuldades tecnológicas e a estudos realizados em pequeno número de doentes, incompletamente caracterizados.

A formação de anticorpos contra antígenos do lume intestinal, deve estar aumentada na doença inflamatória do intestino como consequência lógica do aumento da permeabilidade da mucosa (195). Assim, a estimulação da formação de anticorpos deve reflectir-se nos níveis séricos das imunoglobulinas, que são sintetizadas pelos plasmócitos e representam o produto final do sistema da imunidade humoral. Com efeito, em diversos trabalhos, têm sido descritas concentrações elevadas das imunoglobulinas na doença de Crohn e na colite ulcerosa (196-198). No estudo que realizamos sobre as determinações séricas das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM, confirmamos a existência de aumento significativo da IgG, em ambas as doenças. Além disso, verificamos que este aumento, foi mais acentuado nos doentes com complicações extra-intestinais, especialmente, nos que apresentaram artrite e eritema nodoso (47). Estas observações podem relacionar-se com estimulação antigénica mais intensa ou mais prolongada nos doentes com complicações extra-intestinais, assim como com a presença de complexos imunológicos contendo IgG, nestes doentes (39, 199).

Nenhum dos nossos doentes apresentou imunodeficiência, embora tal situação possa ocorrer, excepcionalmente, associada com a doença de Crohn e com a colite ulcerosa (200-202). Tivemos, no entanto, oportunidade de estudar um doente com hipogamaglobulinemia comum variável que apresentava lesões histológicas na mucosa rectal de rectite com microabcessos crípticos (203).

Realizamos determinações dos linfócitos circulantes, sendo referidos, particularmente, os linfócitos B, que são precursores das células formadoras de anticorpos e portanto da imunidade humoral. Confirmamos resultados referidos por outros autores, evidenciando linfocitose B na doença de Crohn e na colite ulcerosa (204-207). O aumento dos linfócitos B, observados para os três tipos de células estudadas, IgA, IgG e IgM, pode resultar da migração do intestino para o sangue de grande quantidade de células, devido à actividade imunológica contínua na mucosa intestinal, desencadeada pela estimulação antigénica (181). Num trabalho publicado, foi demonstrado que as células mononucleares do sangue de doentes com doença inflamatória intestinal, apresentam aumento da síntese espontânea e da secreção de imunoglobulinas, particularmente da IgA, ao contrário das células mononucleares intestinais, sugerindo a possibilidade de imunodeficiência primária na mucosa intestinal destes doentes (208). Todavia, noutro trabalho foi descrito aumento do número de linfócitos B monoclonais, no sangue de alguns doentes com doença inflamatória intestinal e referida a possibilidade de alteração da regulação imunológica (209). No entanto, são necessários estudos adicionais para esclarecimento deste aspecto importante da actividade celular imuno-reguladora (194, 210).

O sistema do complemento é o mecanismo principal pelo qual o processo imunológico conduz à inflamação e à lesão tecidular. Este sistema consiste numa série de proteínas que quando activadas podem determinar as seguintes consequências: aumento da permeabilidade capilar, anafilaxia, lesão tecidular, quimiotaxia, fagocitose, regulação da resposta imunológica e de alguns aspectos da memória imunológica (211, 212).

Os níveis séricos das fracções do complemento representam o balanço entre a sua síntese e a sua utilização. Elevações do complemento sérico, especialmente de CH_{50} , C_3 e C_4 , reflectem geralmente uma reacção

da fase aguda da inflamação. Todavia, podem observar-se valores normais de complemento apesar da sua activação. Depressões isoladas de componentes séricos do complemento, podem reflectir deficiência congénita ou de utilização (212). Vários estudos foram realizados para definir qual a participação do complemento na doença inflamatória intestinal (212-214). Contudo, determinações estáticas de quaisquer proteínas séricas, são afectadas por muitos factores, incluindo volume plasmático, distribuição extravascular, catabolismo fraccional e síntese (215). Apesar de muitos dos estudos realizados não considerarem a actividade da doença inflamatória intestinal, a evidência é sugestiva de um aumento de catabolismo de C_3 , da circulação de produtos da conversão de C_3 e da deposição de C_3 em áreas de inflamação (216-218). O envolvimento da via alterna do complemento, foi também sugerido pela observação de níveis séricos elevados de factor B e da circulação de produtos da degradação desta proteína (211, 212, 219).

Não é conhecido, se o aumento da activação do complemento ocorre unicamente como resultado de reacções prolongadas de antigénio-anticorpo ou se há um defeito de modulação da cascata do complemento. Todavia, a determinação de imuncongulininas, que são anticorpos para componentes do complemento activado, sugere que na doença inflamatória intestinal se observa activação do complemento (220). Não se sabe contudo, se esta activação é essencial para a patogénese da doença ou se reflecte meramente a amplificação da resposta inflamatória.

Os resultados do nosso estudo evidenciaram, na doença de Crohn e na colite ulcerosa, aumentos significativos de CH_{50} e de C_4 . O facto da concentração de CH_{50} na doença de Crohn ter sido superior à observada na colite ulcerosa, pode ser devido à percentagem mais elevada daqueles doentes em actividade, no momento do estudo. Efectivamente, em diversos trabalhos foi evidenciado que os níveis séricos do complemento, tendem a ser mais elevados quando a doença está mais activa, o que pode reflectir, activação pela via clássica (205, 207, 212).

A fracção C_3 constitui a placa giratória da activação do sistema do complemento pela via clássica e alterna. A sua depressão, que observamos na colite ulcerosa, pode reflectir aumento de catabolismo assim como o seu depósito em áreas inflamadas, devido a interacções antigénio-anticorpo dentro da mucosa lesada (221). Nos doentes que apresentaram complicações extra-intestinais, os níveis séricos do complemento não foram significativamente diferentes dos observados nos outros doentes.

A mesma conclusão foi referida por Hodgson (212). Níveis séricos normais de complemento podem, também, ocorrer na artrite reumatóide (222), doença em que a patogénese por complexos imunológicos é altamente provável, todavia, o valor do complemento no líquido sinovial encontra-se diminuído relativamente ao de espondiloartropatias sero-negativas (223). Em seis doentes com doença de Crohn e sinovite aguda efectuamos determinações de CH_{50} no sangue e líquido sinovial, observando-se valores elevados no sangue simultâneamente com valores normais ou baixos no líquido sinovial. Esta diminuição do valor do complemento no líquido sinovial é menos acentuada do que a descrita na artrite reumatóide (223), o que pode constituir uma explicação para a evolução clínica da artrite enteropática, que é benigna, comparativamente, à da artrite reumatóide (48).

A presença de complexos imunológicos circulantes foi demonstrada, recentemente, em grande número de doenças, entre as quais, se incluem a doença de Crohn e a colite ulcerosa (34, 45, 199, 212, 215, 221, 224-226). Nos últimos anos verificou-se um recrudescimento de interesse pelos complexos imunológicos solúveis, que se reflectiu no crescimento das publicações referentes a este assunto. A designação de complexos imunológicos, refere-se ao produto resultante da ligação do antígeno com o anticorpo específico. O antígeno pode ser de origem extrínseca tal como uma proteína da dieta ou um agente infeccioso, assim como pode ter origem intrínseca resultante de um constituinte normal do organismo ou de um produto alterado por processo patológico. O anticorpo pode, teoricamente, ser formado por quaisquer das imunoglobulinas conhecidas. Os complexos resultam da união de uma ou mais moléculas de antígeno com uma ou mais moléculas de anticorpo e uma vez formados podem activar os sistemas de imunidade humoral e celular, desencadeando lesão tecidular, que pode ocorrer quer, localmente, no órgão em que o antígeno está presente, quer em órgãos com circulação especializada, tais como os rins, as paredes das artérias, a pele, os pulmões, as articulações e os plexos coróideus. A quantidade e o tamanho dos complexos antígeno-anticorpo, são alguns dos múltiplos factores que condicionam a sua capacidade para se depositarem à distância (42, 44, 227).

A pesquisa dos complexos imunológicos circulantes, pode realizar-se com diversos métodos, que diferem, consideravelmente, na complexidade,

sensibilidade e reprodutibilidade (44). Nenhum dos métodos, correntemente, em uso é absolutamente específico (228). O método que utilizamos foi o da precipitação do polietilenogicol, que apresenta tècnicamente menor complexidade, mas que tem a desvantagem de ser menos sensível e específico (85). Para além das diferenças entre os métodos utilizados, há outras variáveis que condicionam a sua quantificação. Assim, a concentração sérica dos complexos imunológicos está dependente do equilíbrio dinâmico entre os antígenios e os anticorpos, da sua formação e eliminação contínuas bem como da ligação secundária a outras proteínas. A estes factores somam-se ainda, as alterações provocadas pelas diferentes terapêuticas instituídas (42, 44, 226). Apesar destas condicionantes, a utilidade clínica da quantificação dos complexos imunológicos na doença inflamatória intestinal é sugerida por alguns trabalhos, que mostram relação entre as concentrações séricas, a actividade da doença e a presença de manifestações extra-intestinais (212, 224, 229, 230).

A composição antigénica dos complexos imunológicos evidenciados na doença inflamatória intestinal, não é conhecida (194). Todavia, estes complexos resultam, provavelmente, da lesão intestinal, uma vez que são encontrados com maior frequência nos doentes com colite ulcerosa em actividade e que não estão presentes nos doentes com doença de Crohn submetidos a ressecção cirúrgica do intestino (229). Os complexos imunológicos secundários à lesão intestinal poderiam contribuir para a citotoxicidade dos linfócitos «K» contra as células epiteliais do colon (194, 231-233).

A acção patogénica dos complexos imunológicos a nível intestinal foi evidenciada num modelo experimental prèviamente sensibilizado a antígenios de enterobacteriáceos. Assim a injeccção endovenosa de complexos imunológicos em coelhos com hipersensibilidade ao antígeno de Kunin e com a mucosa do colon irritada pela instilação de formaldeído diluído, provoca lesões sobreponíveis às da colite ulcerosa (234). Independentemente do aspecto de se saber se os complexos imunológicos estão envolvidos na patogénese das lesões intestinais ou se são produtos resultantes desse processo, permanece a hipótese, já referida, de serem os responsáveis pelas lesões extra-intestinais (221, 235-239). Esta hipótese atraente, necessita da demonstração dos complexos imunológicos ao nível das lesões sistémicas, o que continua por realizar (2).

No estudo que efectuamos, verificamos que os níveis séricos dos complexos imunológicos observados nos doentes com doença inflamatória

intestinal foram superiores aos dos indivíduos normais. Este aumento foi ainda mais acentuado considerando apenas os doentes que tiveram manifestações extras-intestinais. Todavia, a diferença entre as médias dos doentes e normais não teve significado estatístico. Contudo, na maioria dos doentes estudados as determinações séricas não foram efectuadas, concomitantemente, com a presença das manifestações sistémicas.

Os factores que influenciam a intensidade da resposta imunológica, que pode ser determinada geneticamente, revestem-se de grande importância nas doenças com participação de complexos imunológicos.

A doença de Crohn e a colite ulcerosa não são doenças genéticas clássicas, porém, verifica-se a ocorrência familiar destas doenças em 15 a 40 % dos doentes (240-241). A interpenetração das duas doenças surge em 25 % das famílias afectadas (194). Verifica-se, também, uma associação estatisticamente significativa destas doenças com a espondilite anquilosante, quer a nível individual, quer a nível familiar (26-33, 108, 112-114, 242). Estes estudos epidemiológicos sugerem a participação de mecanismos genéticos na etiologia da doença inflamatória intestinal.

Após a descoberta de que na espondilite anquilosante há uma frequência muito elevada do antígeno HLA B₂₇ (243, 244), foi natural ter-se procurado saber o que se passava com o sistema de histocompatibilidade em doenças que ocorrem associadas à espondilite anquilosante. Assim, a distribuição dos antígenos dos «loci» A e B, tem sido estudada na doença inflamatória intestinal, no entanto, sem que tivessem sido identificadas associações importantes (32, 33, 245, 251). De facto, com excepção da associação do antígeno B₂₇ com a espondilite anquilosante e com a irite observadas na doença inflamatória intestinal, a pesquisa dos marcadores de susceptibilidade HLA, continua não concludente (32, 33).

No estudo que fizemos sobre a frequência do fenótipo HLA em doentes com doença inflamatória do intestino e manifestações reumáticas, confirmamos a frequência elevada do antígeno B₂₇ nos doentes com espondilite anquilosante (49, 252).

O complexo de histocompatibilidade major, forma um sistema imunogenético e contém genes que regulam as funções de células linfóides e genes que controlam alguns dos componentes do complemento (254, 255). O estudo de antígenos de histocompatibilidade pertencentes ao

locus HLA-DR, assim como a pesquisa de deficiências isoladas de elementos do complemento, podem vir a fornecer elementos importantes para a compreensão da susceptibilidade combinada a estas doenças.

O facto de se verificar uma identidade do fenótipo HLA em irmãos afectados com doença de Crohn, tal como ocorreu no caso que estudamos, sugere que a contribuição genética é um factor importante na susceptibilidade à doença (258). Aos factores constitucionais associam-se, provavelmente, factores extrínsecos ambientais, como sugere a incidência elevada de anticorpos anti-RNA e linfocitotóxicos no soro de doentes com doença inflamatória intestinal e seus cônjuges (194-258). Assim, na patogénese da doença inflamatória do intestino, parece intervir factores genéticos, provavelmente, em associação com agentes externos e com alteração dos mecanismos de defesa imunológicos (157, 161, 194, 260).

A importância dos mecanismos imunológicos na doença inflamatória intestinal deve ser considerada à luz da fisiologia normal da imunidade, tendo em conta que o intestino é um importante órgão linfóide. As características imunológicas do intestino relacionam-se com o facto de estabelecer contacto com grande quantidade de material antigénico que deve ser excluído do meio interior, ao mesmo tempo que deve permitir a absorção selectiva de substâncias necessárias para a vida. O tubo digestivo está bem equipado para exercer esta função importante de homeostase imunológica do corpo, uma vez que cerca de 25 % da mucosa intestinal é constituída por tecido linfóide. Esta população linfocitária apresenta-se, fundamentalmente, sob as seguintes formas: 1 — linfócitos e plasmócitos dispersos na lâmina própria, 2 — linfócitos entre as células epiteliais (linfócitos intraepiteliais), 3 — nódulos linfáticos organizados (placas de Peyer e apêndice), 4 — folículos linfóides solitários (261-264).

O epitélio intestinal constitui uma barreira entre as células linfóides intestinais e o conteúdo do intestino. No entanto, esta barreira não é cem por cento eficiente, pelo que a população linfóide encontra-se em constante estimulação pelo material antigénico luminal. As células linfóides sensíveis aos antigénios são deste modo induzidas a exprimir uma variedade de funções efectoras destinadas a beneficiar o hospedeiro, mas que podem causar inflamação e lesão tecidular, (43, 195, 265-270). Assim as células B proliferam e diferenciam-se em células formadoras de

anticorpos. A última fase, na diferenciação das células B, é constituída pelo plasmócito, que sintetiza e segrega imunoglobulinas (anticorpos) (271-273). As cinco classes principais de imunoglobulinas IgA, IgG, IgM, IgD e IgE foram identificadas no citoplasma das células linfóides da mucosa intestinal normal (274). Alterações destas populações celulares responsáveis pelo sistema imunológico secretor podem ter implicações na patogénese de muitas doenças do aparelho digestivo (275-276).

Estudos imunohistoquímicos referentes à distribuição de imunoglobulinas e das células linfóides que contêm imunoglobulinas na mucosa do colon, de doentes com doença inflamatória intestinal, apresentam resultados controversos (37). Assim, no primeiro trabalho realizado em doentes com colite ulcerosa, foi descrito um número reduzido de células contendo IgA (277). Todavia, estes resultados que foram obtidos em material congelado, pecam por defeito, em virtude de apresentarem IgA no interstício extracelular o que reduz o número de células evidenciáveis. Estudos mais recentes, utilizando cortes de material incluído em parafina, o que permite melhor preservação morfológica e realizados com métodos de imunofluorescência e imunoenzimáticos, revelaram que nas lesões intestinais provocadas pela doença inflamatória intestinal, a população de células B está aumentada (93, 278-289). Na colite ulcerosa em fase aguda foi demonstrado aumento, sobretudo, das células com IgG (282-286). O mesmo facto foi verificado na doença de Crohn, particularmente, nas áreas com inflamação acentuada (287-289).

O desenvolvimento de métodos para isolamento e caracterização das células linfóides da mucosa intestinal, permitiu que se estudassem estes elementos celulares a nível regional. Deste modo, foi demonstrado linfocitose B na lâmina própria de segmentos do intestino ressecado cirurgicamente, em doentes com doença inflamatória intestinal (208, 290-292). Além disso foi evidenciado aumento da capacidade secretora de IgG e síntese normal ou diminuída de IgA. A hipótese, de nestas doenças ocorrer deficiência secretora de IgA, motivada por anormalidade na síntese epitelial do componente secretor, permitindo assim aos antígenos bacterianos penetrar mais profundamente na mucosa, foi proposto por Tomasi (293). Todavia, apenas num trabalho de imunofluorescência, efectuado em doentes com proctite ulcerosa, foi descrito diminuição do componente de secreção (294). O aumento da população de células IgG,

observado na mucosa intestinal dos doentes com doença inflamatória intestinal, pode estar relacionado com uma tentativa de estabelecimento de uma segunda linha de defesa contra antigénios exógenos, após ter sido vencida a primeira linha de defesa constituída, principalmente, pela IgA e IgM poliméricas, que actuam na superfície da mucosa, após atravessarem o epitélio ligadas ao factor de secreção (296). O estudo destes aspectos da biologia do sistema imunológico intestinal, particularmente, ligada com a imuno-regulação, pode vir a ajudar na compreensão da patogénese destas doenças (194, 295).

No estudo que realizamos, efectuamos determinações das células que contêm imunoglobulinas nos doentes com doença inflamatória do intestino e em normais. As biópsias rectais dos doentes com doença de Crohn e com colite ulcerosa, foram classificadas de acordo com a actividade histológica, para se apreciar se o número de imunócitos varia com o grau de lesão. Parece verosímil que em áreas com ulceração da mucosa ocorra uma maior penetração antigénica, ocasionando consequente aumento, na produção de anticorpos.

Para quantificarmos a população de células encarregadas da produção de anticorpos utilizamos uma técnica de imunofluorescência, que por ser efectuada em cortes desparafinados, permite boa definição estrutural e estudo retrospectivo de material histológico.

As células que contêm imunoglobulinas dos tipos IgA, IgG e IgM, foram contadas em número absoluto e em percentagem, em unidades de mucosa. Este método de avaliação evita a introdução de factores de erro, como os dependentes do facto do número de células poder variar em diferentes biópsias do mesmo indivíduo e em diferentes zonas da mesma biópsia. Além disso, é menos influenciável por factores como o grau de infiltração e de edema e por artefactos devidos à contração ou estiramento dos tecidos. A referência à área da mucosa estudada é fundamental, quando se efectuam contagens celulares. Tal não se verifica nas determinações realizadas por densidades celulares, em que não há indicação da localização morfológica e do número total de imunócitos, criando dificuldade na comparação de resultados obtidos em diferentes trabalhos (93).

Os estudos imunohistológicos que realizamos, evidenciaram que na doença inflamatória do intestino, ocorre uma resposta acentuada das células produtoras de anticorpos na mucosa inflamada. De facto, nos doentes com doença de Crohn e com alterações inflamatórias mínimas

da mucosa rectal, verificamos que o número de imunócitos IgA, IgM e IgG aumentou quase duas vezes em relação aos normais, sobretudo à custa das células que contêm IgG, cujo número aumentou cerca de 5 vezes. Estas alterações ocorreram nos doentes com lesões de ileíte ou colite proximal, portanto com lesão distante do local da colheita das biópsias. Todavia, nos doentes com sinais histológicos de inflamação acentuada, o número total de células triplicou, sendo o aumento devido, principalmente, às células dos tipos IgM e IgG que aumentaram 7 e 15 vezes, respectivamente. Assim, o quociente das células IgA: IgG baixou do valor normal de 16,6 para 1,7 devido ao grande aumento de células IgG (53).

Nos doentes com colite ulcerosa as alterações quantitativas dos imunócitos variaram também, com o grau histopatológico da inflamação. Enquanto nos doentes com lesões inflamatórias discretas, o número destes elementos celulares triplicou em relação aos normais, nos doentes com lesões graves sextuplicou. Verificamos um aumento acentuado, especialmente, das células que contêm IgM e IgG. Este aumento, nos doentes com lesões inflamatórias acentuadas, foi de 12 vezes para as células IgM e de 34 vezes para as células IgG. O quociente das células IgA: IgG baixou do valor normal de 16,6 para 1,8 devido ao supercrescimento do número das células IgG.

Os resultados do estudo efectuado confirmam que na doença inflamatória do intestino, ocorre uma activação local do sistema de células B e evidenciam um desvio na proporção dos diferentes tipos celulares especialmente, devido ao aumento das células que contêm IgG.

Os estudos efectuados sobre a população de células IgE, na mucosa rectal dos doentes com doença inflamatória crónica do intestino, apresentam grande variabilidade de resultados (37). Enquanto num trabalho se observou diminuição do seu número (297), outros autores referem valores normais (282, 298) e ainda outros descrevem valores elevados (299-301). Pensamos assim, ser necessário efectuar estudos adicionais, correlacionando o número de células IgE com a actividade clínica da doença bem como efectuar identificação cuidadosa das células com fluorescência positiva para a IgE, uma vez que os mastócitos e os eosinófilos têm grande afinidade para os conjugados de IgE com fluoresceína (302, 303). O processo inflamatório da mucosa intestinal, parece relacio-

nado com a penetração de antígenos através da barreira epitelial alterada. Assim, é provável que o sistema mastócito/IgE/eosinófilo, seja activado na defesa contra antígenos bacterianos, uma vez que muitos destes antígenos são comuns aos existentes nos helmintas (56). Efectivamente, verifica-se um certo consenso na literatura de que o número de mastócitos na mucosa do colon, está aumentado na colite ulcerosa (297, 305) e o mesmo facto é sugerido pelo alto conteúdo de histamina verificado nesse local (306). Por outro lado, os agravamentos da colite ulcerosa acompanham-se frequentemente de eosinofilia (307) e o número de eosinófilos na mucosa rectal aumenta, concomitantemente, com o agravamento da actividade da doença (308, 309). O padrão de resposta do eixo mastócito/IgE/eosinófilo pode, portanto, ser diferente nas diferentes fases de actividade da doença inflamatória intestinal (310), explicando de certo modo os diferentes resultados conseguidos com o emprego terapêutico de cromoglicato de sódio (311).

Com métodos de imunofluorescência e de histoquímica, estudamos a população de células IgE na mucosa rectal dos doentes com colite ulcerosa e doença de Crohn, em diferentes estados de actividade. Confirmamos que os mastócitos apresentam grande afinidade para IgE, por conterem provavelmente IgE intracitoplasmática e na membrana superficial (303) e que os eosinófilos apresentaram fluorescência com imunossoro anti-IgE. Estes factos permitiram-nos estudar, em conjunto e em diferentes fases de actividade inflamatória, mastócitos, eosinófilos e plasmócitos, contendo IgE.

Verificamos que há um aumento significativo das células IgE nos doentes com recidiva de colite ulcerosa e que o número destas células diminui, paralelamente, com a diminuição da actividade da doença. Nos doentes em remissão completa o número das células IgE não diferiu do observado nos normais (54).

Nos doentes com doença de Crohn, a quantidade de células IgE no grupo com lesões inflamatórias acentuadas foi significativamente superior ao observado nos casos com lesões mínimas da mucosa.

Na proximidade da zona de ulceração verificamos grande quantidade de células com fluorescência positiva para a imunoglobulina E, facto também já referido em estudos com imunoperoxidase (289). Concluimos do estudo realizado que há diferenças significativas na população de células IgE, em diferentes fases de actividade da doença inflamatória intestinal. Este facto pode explicar a grande discrepância de resultados

nos trabalhos, previamente, publicados, em que não foi considerado este aspecto.

Nos doentes em fase aguda de colite ulcerosa e nos casos de doença de Crohn em que se observaram sinais inflamatórios acentuados da mucosa, ocorreu, portanto, estimulação do sistema mastócito/IgE/eosinófilo. Esta reacção local de hipersensibilidade tipo I, pode ser necessária para criar condições apropriadas ao ulterior desenvolvimento de outros tipos de hipersensibilidade envolvendo imuno-complexos ou células (2,57).

Embora a superprodução de IgG, verificada na mucosa intestinal em doentes com doença inflamatória do intestino, desempenhe uma função protectora, pode, no entanto, originar reacções deletérias que contribuam para o agravamento da inflamação (295). Com efeito, a degradação da IgG pode originar um produto quimiotático específico para os neutrófilos e a formação local de complexos antigénio-anticorpo (282, 285, 289, 312). Este tipo de lesão tecidular foi sugerido pela demonstração de depósitos de IgG e C₃ na lâmina própria da mucosa do colon em doentes com doença inflamatória intestinal (218, 312, 313), bem como pela demonstração da presença de anticorpos para bactérias anaeróbias fecais em extractos da mucosa do colon, na ausência de anticorpos circulantes (50). A formação na mucosa de anticorpos anticolon, com reacção cruzada para E. Coli, foi igualmente sugerida pela demonstração de IgA secretor com tal actividade no soro de doentes com colite ulcerosa (314).

A intensidade e a duração da exposição antigénica e a quantidade de anticorpos formados, condicionam a quantidade de complexos imunológicos lesivos, potencialmente formados (315). É possível que o mesmo mecanismo patogénico possa ser responsável pelos aspectos patológicos quer da colite ulcerosa, quer da doença de Crohn. Assim, a hiperprodução de IgG poderá ser responsável pela formação de granulomas, uma vez que a resposta tecidular que determina a formação destes, está, por vezes, dependente da presença de complexos imunológicos com excesso de anticorpo (260, 315-318). Pelo contrário, quando os complexos imunológicos formados, têm pequenas dimensões e excesso de antigénio, pode ocorrer uma resposta do tipo Arthus, caracterizada por marcado componente polimorfonuclear, tal como se verifica na colite ulcerosa (267, 279, 319).

Nos doentes com lesões inflamatórias acentuadas da mucosa, observamos, por vezes, depósitos extra-celulares de imunoglobulinas IgG e IgM, bem como da fracção C₃ do complemento. Estes depósitos tecidulares da lâmina própria foram mais evidentes em zonas de fronteira, ou seja próximo do epitélio de revestimento, das criptas glandulares e dos vasos sanguíneos. Nos folículos linfóides, confirmamos que, por vezes, ocorrem nos centros germinativos depósitos de IgM com distribuição reticular (287, 295). A retenção preferencial de IgM nestas estruturas, pode reflectir a localização de complexos antigénio-anticorpo na superfície das células reticulares dendríticas, conforme foi demonstrado (320). Nos granulomas, apenas observamos, fluorescência extra-celular pela IgG, (287, 289). Em algumas células do infiltrado inflamatório, verificamos simultaneidade de fluorescência com IgG e C₃, utilizando a dupla marcação pela fluoresceína e rodamina. Com a mesma técnica, documentamos em cortes seriados, macrófagos e leucócitos polimorfonucleados com fluorescência simultânea pelos imuno soros anti IgG, anti-E. Coli e anti C₃. Tais observações sugerem a fagocitose de complexos imunológicos por estas células (287).

A observação ultrastrutural nas biópsias rectais, foi dirigida, essencialmente, para o estudo dos elementos celulares do epitélio e da lâmina própria. A principal alteração observada no epitélio de revestimento, consistiu na separação dos enterócitos, provocada pelo edema (321). Verificamos que as microvilosidades são, geralmente, de pequenas dimensões, conforme tem sido referido noutros trabalhos (322, 323). Contudo, num doente com colite ulcerosa em actividade, encontramos em várias células contíguas, microvilosidades fundidas, formando evaginações pleomórficas do citoplasma (63). Aspectos semelhantes foram apenas registados em estudos experimentais sobre infecção intestinal e parecem estar relacionados com a captação de bactérias pelo enterócito (324).

Os linfócitos intraepiteliais apresentaram, frequentemente, aspecto de células activas, isto é de grande dimensão celular e nuclear e de citoplasma com muitos lisosomas e ribosomas (325). A população de linfócitos intraepiteliais tem sido estimada em cerca de 10 % do número total de células epiteliais. Estudos funcionais e morfológicos sugerem que estas células são imunocompetentes (264, 326-328). A migração das células linfóides para o lume intestinal pode ocorrer

nas placas de Peyer e no apêndice, sendo, contudo controverso se o mesmo fenómeno ocorre através da superfície epitelial (327). Apresentamos, no entanto, evidência morfológica de que na doença de Crohn, pode verificar-se tal mecanismo de migração (Fig. 78). Além disso, as células linfóides no lume intestinal têm sido observadas, frequentemente, em contacto íntimo com microorganismos intestinais, o que pode significar que têm uma função imunológica importante na superfície da mucosa intestinal (328).

Em biópsias realizadas em fase activa da doença, observamos leucócitos intraepiteliais em desgranulação, o que pode ser uma consequência da fagocitose de complexos antígeno-anticorpo (285, 289). Em estudos de ultracitoquímica foi evidenciado que os granulócitos intraepiteliais em desgranulação libertam enzimas lisossómicas no interstício epitelial, participando no processo de lesão tecidual, (312, 329, 330).

O estudo da resposta imunológica local ao nível da mucosa rectal, compreendeu a observação das células que sintetizam anticorpos (plasmócitos) e de células directamente envolvidas no processo de lesão tecidual mediada por anticorpos. Estudamos, particularmente, os mastócitos e os eosinófilos que estão implicados nos fenómenos de hipersensibilidade dos tipos I e III bem como os neutrófilos que participam com o complemento, nos mecanismos de lesão relacionada com depósito tecidual de complexos imunológicos (tipo III), e na lesão resultante da reacção de anticorpos com antígenos ligados à membrana celular (tipo II) (4).

Nos plasmócitos encontramos importantes alterações morfológicas (52, 53). Estas células apresentaram grande heterogeneidade, traduzida especialmente, por diferentes graus de dilatação do retículo endoplasmático rugoso. Verificamos a presença de células com morfologia que variou entre o aspecto clássico de «chama de vela» ao de «células de depósito». Nestes plasmócitos pode observar-se um grau extremo na dilatação do retículo endoplasmático rugoso, originando a formação de lagos ou cisternas, em cujo interior se deposita por vezes material floculado «plasmócitos obstruídos» (331, 332). As cisternas encontram-se, frequentemente, destacadas dos plasmócitos e acumulam-se próximo da membrana basal, dando expressão morfológica à barreira de anticorpos anteriormente mencionada (333). Descrevemos, também, em alguns plasmócitos, vacúolos intracitoplasmáticos contendo restos de membrana, aspecto que foi descrito em doenças de cadeias pesadas e que parece indicar uma secreção muito

activa de imunoglobulinas (334-336). Estas alterações qualitativas foram sobretudo evidentes nas biópsias com sinais inflamatórios acentuados e indicam uma perturbação funcional associada com a hipersecreção de imunoglobulinas (337). O estudo ultrastrutural confirma a impressão obtida com o estudo imunohistoquímico de que na doença inflamatória do intestino, se verifica estimulação do sistema de células B. Efectivamente, verificamos importantes alterações quantitativas nas células que contêm imunoglobulinas, expressando o aumento da produção local de anticorpos (52-55).

No estudo ultrastrutural que efectuamos sobre o aspecto morfológico dos mastócitos, confirmamos que estas células se apresentam frequentemente, em estado de desgranulação (338-340). Este fenómeno pode estar intimamente relacionado com reacções de antígeno-anticorpo.

A evidência morfológica de desgranulação dos mastócitos na doença inflamatória intestinal, sugere um papel para os mediadores libertados dos grânulos (histamina, serotonina, factor de activação plaquetária, factor quimiotático dos eosinófilos, etc.), na patogénese e sintomatologia da doença (341-343).

No infiltrado inflamatório da lâmina própria, observamos também leucócitos granulócitos parcialmente desgranulados. A desgranulação observada nestas células, pode ser resultante da fagocitose de complexos imunológicos, conforme já referimos.

Em 17 % dos doentes registamos a presença na lâmina própria de bactérias que apresentavam forma e dimensão variáveis. Estes microorganismos foram ocasionalmente observados fagocitados no interior de neutrófilos. As biópsias dos doentes em que observamos bactérias apresentavam sinais de necrose focal, pelo que não confirmamos a sua existência em zonas com lesões inflamatórias mínimas (52, 344 345). As nossas observações são semelhantes às descritas, posteriormente, por Tytgat, o qual encontrou em 13 % dos doentes com doença de Crohn, bactérias em áreas com fissuras ou necrose (346). A invasão microbiana, parece, portanto, ser consequente à ruptura do epitélio, pelo que aparece especialmente, nos casos com doença inflamatória em actividade.

Um passo importante, para a responsabilização dos complexos imunológicos na patogénese das complicações extra-intestinais, pode ser fornecido pela demonstração nestas lesões de depósitos de proteínas

com capacidade imunológica (2). De facto, nos doentes com artrite sero-negativa que acompanha a doença de Reiter e a psoríase, foram descritos depósitos de imunoglobulinas e de complemento na sinovial, que sugere a participação de mecanismos imunológicos na patogénese da artrite (347-348). Em doentes com doença de Crohn e artrite, verificamos a existência de depósitos extra-celulares de IgG e de C_3 em 29 % dos casos, em que realizamos estudo da sinovial (48). O facto destes depósitos não atingiram a frequência e a intensidade dos descritos na artrite reumatóide (349), pode explicar a maior benignidade das características clínicas da artrite da doença inflamatória intestinal (48). Com efeito, as características clínicas, os valores quase normais do complemento no líquido sinovial e a escassez de alterações morfológicas, contrastam com as descritas na artrite reumatóide e reforçam a interpretação de que a artrite da doença inflamatória intestinal seja desencadeada por um mecanismo do tipo da artrite reactiva.

As lesões de estomatite ulcerosa, observadas nestes doentes podem ser desencadeadas por uma reacção imunológica (125, 350). Com efeito, no exame histológico destas lesões verifica-se infiltração de linfócitos e histiócitos na lâmina própria e submucosa. Observam-se também, frequentemente, lesões de angeíte, apresentando-se os vasos atingidos com fluorescência pela fracção C_3 do complemento (124). Nos casos que estudamos, não verificamos, no entanto, estes depósitos na parede dos vasos.

O estudo histológico das lesões cutâneas de eritema nodoso e de pyoderma gangrenosum, efectuados nos nossos doentes, evidenciou infiltração de linfócitos, de plasmócitos e de células mononucleadas associadas a lesões de vasculite, sugerindo uma reacção imunológica. O estudo por imunofluorescência de lesões de eritema nodoso revelou depósitos de IgG e de C_3 na derme e na camada lúcida da epiderme e num dos casos de pyoderma gangrenosum, verificamos a presença na derme de intensos depósitos de imunoglobulina e de complemento. Contudo, outros autores que estudaram dois casos de «pyoderma gangrenosum» antes da fase de ulceração, não encontraram depósitos por imunofluorescência (352).

As observações que descrevemos referentes ao estudo histológico e imunohistoquímico das lesões intestinais e extra-intestinais, nas articulações, pele e mucosas reforçam a indicação fornecida pelo estudo clínico e imunológico da possibilidade de um mecanismo reactivo (complexos imunológicos), estar implicado na imunopatogénese destas expressões clínicas da doença.

CONCLUSÃO

O trabalho que efectuamos, foi baseado no estudo prospectivo de 100 doentes com doença inflamatória do intestino, observados consecutivamente, durante um período de 7 anos.

O objectivo principal do estudo, foi o esclarecimento do significado clínico e imunopatológico das manifestações sistémicas no contexto da doença inflamatória do intestino. O trabalho consistiu, fundamentalmente, no estudo das manifestações sistémicas com expressão nas articulações, pele, boca e olhos e compreendeu 3 partes: 1 — estudo clínico; 2 — estudo imunológico; 3 — estudo histopatológico.

1. *Estudo Clínico*

Foram estudados 100 doentes (40 com doença de Crohn e 60 com colite ulcerosa), dos quais 34 % apresentaram pelo menos uma complicação extra-intestinal. A artrite periférica surgiu em 21 %, a espondilite anquilosante em 6 %, o eritema nodoso em 11 %, o «pyoderma gangrenosum» em 3 %, a estomatite aftosa em 29 % e as complicações oculares em 12 % dos doentes.

Estas complicações extra-intestinais, podem ser secundárias à doença inflamatória do intestino, conforme é sugerido pelas seguintes observações:

a) A frequência e as características clínicas destas complicações, são semelhantes na doença de Crohn e na colite ulcerosa. A hipótese de que as manifestações sistémicas resultam de uma reacção não específica ao intestino doente, é reforçada pela ocorrência de manifestações semelhantes na doença de Whipple e em infecções intestinais associadas com artrite reactiva.

b) As manifestações sistémicas surgiram durante ou após o início dos sintomas intestinais. Verificamos, também, que a actividade clínica das complicações extra-intestinais tende a ser paralela à da doença inflamatória intestinal e que estas complicações são mais frequentes nos doentes com lesões mais extensas. Estes factos sugerem que a lesão intestinal é, provavelmente, a fonte das complicações à distância.

c) As complicações extra-intestinais, surgiram significativamente associadas entre si. O aumento da frequência de combinações de complicações extra-intestinais, observadas no mesmo doente, sugere um mecanismo patogénico comum para estas complicações.

2. *Estudo Imunológico*

Uma grande variedade de alterações imunológicas, tem sido descrita nos doentes com doença inflamatória do intestino. Algumas destas alterações, apesar de poderem ser epifenómenos, podem ter importância patogénica nas complicações sistémicas, provavelmente, relacionadas com um estado de «hipersensibilidade». As principais conclusões do estudo que realizamos são:

a) Em 36 doentes com doença de Crohn e em 36 doentes com colite ulcerosa, efectuamos determinações séricas das imunoglobulinas IgG, IgA e IgM. Em 70 % destes doentes realizamos, também, determinações da IgE. Verificamos aumento significativo da IgG em ambos os grupos, em relação aos normais. Este aumento foi mais acentuado nos doentes com complicações extra-intestinais, especialmente, nos que apresentaram artrite aguda e eritema nodoso, e pode reflectir estimulação da formação de anticorpos.

b) Verificamos aumento significativo do número total de linfócitos B no sangue, em 20 doentes com doença de Crohn e em 20 doentes com colite ulcerosa. A linfocitose verificada deveu-se a aumentos significativos nos três tipos celulares estudados — IgA, IgG e IgM.

c) Em 36 doentes com doença de Crohn e em 36 doentes com colite ulcerosa estudamos no sangue, o complemento total (CH_{50}) e as

fracções do complemento C_4 e C_3 . Verificamos aumentos significativos de CH_{50} e C_4 na doença de Crohn, podendo reflectir a actividade da doença. Na colite ulcerosa observamos diminuição significativa de C_3 , o que pode estar relacionado com o seu depósito tecidular em áreas inflamadas. Em 6 doentes com doença de Crohn e artrite aguda em que fizemos o estudo simultâneo no sangue e no líquido sinovial, verificamos valores elevados de CH_{50} no sangue, simultaneamente com valores normais ou baixos no líquido sinovial, conforme se observa na artrite reactiva.

d) As determinações de complexos imunológicos circulantes que efectuamos em 20 doentes com doença de Crohn e em 20 doentes com colite ulcerosa, forneceram-nos valores superiores aos do grupo normal. Nos doentes que tiveram complicações extra-intestinais, observaram-se valores ainda mais elevados, todavia, as diferenças não apresentaram significado estatístico.

e) O estudo do antígeno de histocompatibilidade, foi realizado em 36 doentes. Verificamos aumento significativo do antígeno B_{27} , nos doentes que apresentavam associadamente espondilite anquilosante, tal como acontece nas espondiloartropatias sero-negativas.

Em dois irmãos, de sexo diferente e com doença de Crohn, registamos identidade dos antígenos do locus A e B. Esta observação evidencia a importância da hereditariedade como um dos vários factores possíveis para o desenvolvimento da doença.

3. *Estudo Histopatológico*

Na mucosa rectal pesquisamos alterações da resposta inflamatória relacionadas com uma possível penetração de material antigénico, através da barreira epitelial lesada, e nas biópsias tecidulares extra-intestinais procuramos a existência de alterações morfológicas que traduzem reacção ao depósito de complexos de antígeno-anticorpo. As principais conclusões desta parte do trabalho foram:

a) O estudo por imunofluorescência das populações celulares que contêm imunoglobulinas IgA, IgG e IgM, foi realizado em biópsias rectais de 24 doentes com doença de Crohn, em 36 doentes com colite

ulcerosa e num grupo de individuos normais. Nas biópsias com lesões mínimas verificaram-se aumentos significativos destas células. Este aumento foi mais acentuado nos doentes com inflamação activa. Nestes casos verificaram-se desvios percentuais importantes, devido ao maior crescimento das células IgG.

Nos plasmócitos descrevemos alterações morfológicas ultraestruturais que traduzem perturbação funcional associada com hipersecreção de imunoglobulinas. Nestas células demonstramos, portanto, alterações quantitativas e qualitativas, que indicam estimulação da produção de anticorpos.

b) No estudo por imunofluorescência das células IgE positivas, (mastócitos, eosinófilos e plasmócitos), verificamos diferenças quantitativas significativas, na mucosa rectal de doentes em diferentes fases de actividade clínica. Assim, demonstramos que há aumento destas células durante a fase de lesão inflamatória activa e que o seu número diminui, paralelamente com a diminuição da actividade da doença. Este fenómeno pode estar relacionado com uma reacção de hipersensibilidade imediata, devida à penetração na mucosa de antígenos bacterianos.

A estimulação do sistema mastócito/IgE/eosinófilo, foi também sugerida pela observação em ultraestrutura de numerosos mastócitos e eosinófilos desgranulados na lâmina própria, em doentes na fase aguda. Estas alterações podem estar relacionadas com reacção de antígeno-anticorpo.

c) Em doentes com lesões inflamatórias acentuadas da mucosa rectal, observamos depósitos tecidulares das imunoglobulinas IgG e IgM e da fracção C₃ do complemento. Estes depósitos tecidulares da lâmina própria foram mais evidentes em zonas de fronteira, ou seja próximo do epitélio de revestimento, das criptas glandulares e dos vasos sanguíneos, bem como em folículos linfóides e granulomas. Em algumas células do infiltrado inflamatório verificamos simultaneidade de fluorescência com IgG, C₃ e antígenos da E. Coli, utilizando dupla marcação, com fluoresceína e rodamina. Estas observações são compatíveis com a presença de complexos imunológicos locais. O estudo ultraestrutural reforça esta interpretação, uma vez que documentamos no infiltrado inflamatório leucócitos polimorfonucleados desgranulados.

d) Em 17% das biópsias rectais estudadas por microscopia electrónica, demonstramos a presença na lâmina própria de bactérias. Este facto documenta que antigénios bacterianos penetram na mucosa lesada. É possível que alguns destes antigénios sejam susceptíveis de desencadear complicações extra-intestinais, tal como acontece em certas enterites bacterianas. Na doença de Whipple, demonstramos nos grânulos dos macrófagos, antigénios bacterianos comuns aos de agentes infecciosos reconhecidamente associados com artrite reactiva.

e) Foram realizadas biópsias da sinovial em 7 doentes com artrite, tendo sido observados depósitos de IgG e C₃ em 29% dos casos.

No estudo por microscopia óptica das biópsias de «pyoderma gangrenosum», de eritema nodoso e de estomatite aftosa, observamos alterações inflamatórias não específicas e em algumas destas lesões foram demonstrados depósitos extra-celulares de imunoglobulinas e de complemento, nas mesmas zonas. Estes aspectos patológicos são sugestivos de doença por complexos imunológicos.

Os estudos clínicos, imunológicos e histopatológicos realizados, fornecem a indicação de que na doença inflamatória intestinal o intestino lesado é a causa provável de algumas complicações extra-intestinais. Estas manifestações sistémicas parecem resultantes do depósito à distância de complexos imunológicos solúveis formados no intestino. A natureza do antigénio responsável permanece «terra incógnita», mas por analogia com outras espondiloartropatias sero-negativas associadas com lesão intestinal, é possível que esteja relacionada com a penetração na mucosa intestinal de antigénios bacterianos.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The data for this study were obtained from the 100 patients with inflammatory bowel disease seen consecutively, during the period 1975-1981, inclusive. There were 40 patients with Crohn's disease and 60 patients with ulcerative colitis.

The purpose of this dissertation, is to provide a comprehensive understanding of some systemic complications, probably related to an «hypersensitivity» disease state-joint, eye, skin and oral complications.

An analysis of the possibility that immunological mechanisms may be implicated in the pathogenesis of the systemic complications must be based on clinical immunological and morphological observations.

Clinical study

Of the 100 patients studied, 34 % had at least one extraintestinal manifestation. Arthritis occurred in 21 %, ankylosing spondylitis in 6 %, erythema nodosum in 11 %, «pyoderma gangrenosum» in 3 %, aphthous stomatitis in 29 % and eye manifestations in 12 %. Twenty-two patients had more than one extraintestinal manifestations.

These complications may be secondary to the diseased intestine as it is suggested by the following observations: a) the clinical findings and the frequency of the extraintestinal complications were similar in Crohn's disease and in ulcerative colitis, suggesting that they are a nonspecific response to inflammatory bowel disease—a possibility strengthened by the remarkably similar complications described in Whipple's disease, in intestinal infections associated with reactive arthritis and in patients with complications of jejunoileal bypass for treatment of obesity; b) the clinical activity of these extraintestinal complications tends to parallel that of the inflammatory bowel disease. In most instances, the systemic complications follow rather than precede

the inflammatory bowel and they were more common with extensive intestinal disease; c) the significantly increased frequency of combinations of extraintestinal manifestations observed in the same patient, suggests a pathogenic mechanism common to all of the manifestations (Fig. 32).

Immunological study

A variety of immunological abnormalities have been described in patients with inflammatory bowel disease, that could be secondary or epiphenomena. Even so, immunological mechanisms may be important in some of the manifestations of disease, as systemic complications. There is evidence to suggest that immune complexes account for at least some of the peripheral phenomena. The present study will therefore discuss the eventual role of immune complexes in this condition.

a) Serum immunoglobulin levels of IgG, IgA and IgM, were estimated in 36 patients with Crohn's disease and in 36 patients with ulcerative colitis. Serum IgE was also measured in 70% of these patients. Significantly elevated serum IgG levels were found in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. The serum IgG levels in the group of patients with acute arthritis and erythema nodosum were higher than in the group of patients without systemic complications (Table VI).

b) Absolute number of peripheral blood lymphocytes was significantly elevated in 20 patients with Crohn's disease and in 20 patients with ulcerative colitis. Proportions of B cells bearing surface immunoglobulin A, G or M were significantly increased in both Crohn's disease and ulcerative colitis (Table IX).

c) The serum complement levels were measured in 36 patients with Crohn's disease and in 36 patients with ulcerative colitis (Fig. 51). The total haemolytic activity of the serum CH_{50} and the C_4 component were increased in both group of patients. Low levels of C_3 component were observed in patients with ulcerative colitis, what may be related to tecdular deposition in inflammed areas. The CH_{50} levels of synovial liquid determined in six patients with Crohn's disease and synovitis were normal or decreased (Table VIII).

d) Circulating immune complexes were determined in the serum of 20 patients with Crohn's disease and of 20 patients with ulcerative colitis. The mean circulating immune complexes levels in the group of patients with extraintestinal complications was above that of the healthy controls, however did not reach statistical significance.

e) The frequency of the HLA antigen was carried out in 36 patients with inflammatory bowel disease. The occurrence of B₂₇ antigen was significantly increased only, in patients with associated ankylosing spondylitis (Table X).

Two brothers of different sexes, and with Crohn's disease, have the same phenotype of HLA antigens. These observations confirms the importance of hereditary as one of several possible factors in the development of inflammatory bowe disease.

Morphological study

It is likely that in any situation where the intestinal tract is «leaky» microbial antigens cross the mucosal barrier and form immune complexes with the appropriate antibodies. From time to time these immune complexes could be deposited in the tissues and to cause extra-intestinal complications.

We have studied the local inflammatory process in rectal biopsies and correlated our findings with disease activity. Immunological and ultrastructural investigations were done on the same material, looking for the degree and patterns of the local B-cell response, the functional activities of granulocytes and mast cells and for indications of local involvement of the complement. This was an attempt to characterise the local immune phenomena connected with the inflammatory response.

a) The local response pattern of immunoglobulins-containing cells was studied on specimens of rectal mucosa of 24 patients with Crohn's disease and in 36 patients with ulcerative colitis. In biopsies with inactive inflammation the total number of plasma cells in the lamina propria was significantly increased as compared with that of the normal control group. In specimens with active inflammation there were a higher increase in numbers of plasma cells and particullary a disproportional increases of

IgG and IgM were observed. Our observations indicated, that there is a quantitative change in local immunocyte populations, in these conditions (Figs. 54-65).

Different plasma cells were described by electron microscopy in the content of the rough endoplasmic reticulum — necrobiotic, constipated and vacuolated plasma cells were frequently seen (Figs. 96-99).

The quantitative change in the local plasma cell population appears to indicate a functional disturbance associated with prolonged or hyperactive secretion of immunoglobulin. Our observations indicated that the inflammatory process in inflammatory bowel disease is dominated by an overstimulation of the B-cell system (Tables XI, XII).

b) Our results of the study of IgE positive cells, by immunofluorescence (mast cells, plasma cells and eosinophils) show a large number of these in the rectal mucosa of patients with inflammatory bowel disease. There are significant differences between the range of IgE cells, in rectal mucosa of patients with different stages of activity. The number of these cells decreases with decreasing clinical activity of the disease (Figs. 66-68).

We conclude that the study of IgE cells in the colonic mucosa in inflammatory bowel disease requires correlation with disease activity and careful identification of positive fluorescent cells (Fig. 52).

Our observations by electron microscopy of numerous eosinophils, mast cells and neutrophils both non-degranulated and degranulated in the lamina propria in patients with acute stage may be related with the presence of immune complexes in this condition (Figs. 100-104).

c) Deposits of both antibody and complement in the mucosa were demonstrated in the same locations, what may reflect the presence of immune-complexes. In some cases with an active state of the disease, IgG and IgM were bound to the basement membrane of the surface epithelium together with C_3 . In addition free IgG was seen sometimes around vessels of the lamina propria, and in granulomas IgM was observed deposited in a reticular distribution in the germinal centres of the lymphoid follicles (Figs. 70-73).

We observed the simultaneous occurrence of IgG, C_3 and coliform-antigen in the same multinuclear cells providing evidence for the phagocytosis of immune complexes.

d) Microorganisms, of variable size and shape, were observed in 17% of the rectal biopsies studied by electron microscopy (Figs. 86-89). Different types were detected, suggesting that microbial invasion was almost certainly the result of epithelium disruption. Microorganisms were found along intramural fissures and areas of focal tissue necrosis. Absorption of bacterial antigen could explain some of the extra-enteric manifestations of inflammatory bowel disease. Analogy with Whipple's disease, intestinal bypass and some intestinal infections, supports a role for the normal or an abnormal intestinal flora in some of these complications. In four patients with Whipple's disease, we also observed the bacterial antigens in the granules of macrophages. A striking feature is the similarity of these bacterial antigens with infective agents known to be associated with reactive arthritis.

e) Routine light microscopical examination from synovial tissue, pyoderma gangrenosum, erythema nodosum and aphthous ulcers demonstrate inflammatory changes.

Synovial tissues of seven patients were investigated with direct immunofluorescence staining for immunoglobulins IgG, IgA and IgM, and for complement-C₃. In two cases extracellular immunoglobulins and complement could be found (Figs. 74-76).

The histologic studies of pyoderm lesions have shown only chronic ulceration with the nonspecific histopathologic attributes of necrosis, exudative inflammatory reaction and endarteritic changes of small vessels (Figs. 46, 48). Histopathologic examination of erythema nodosum was affected in one case and revealed intense perivascular inflammatory infiltrate (Figs. 47, 49). In some of these complications, direct immunofluorescence for immunoglobulins and complement, show extracellular deposition (Fig. 77).

The clinical, immunological and morphological observations support the interpretation that the diseased gut is a likely source of some of the systemic complications of inflammatory bowel disease, that may be caused by soluble immune complexes, formed because of systemically absorbed bacterial antigens.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — Kirsner J B. Inflammatory bowel disease: considerations of etiology and pathogenesis. *American Journal of Gastroenterology* 1978; 69: 253-71.
- 2 — Strickland R G, Sachar D B. The immunology of inflammatory bowel disease. In Glass G B J, ed. *Progress in Gastroenterology*, Vol III. New York. Grune & Stratton. 1977: 821-38.
- 3 — Greenstein A J, Janowitz H D, Sachar D B. The extra-intestinal complications of Crohn's disease and ulcerative colitis: A study of 700 patients. *Medicine* 1976; 55: 401-12.
- 4 — Price A B: Overlap in the spectrum of non-specific inflammatory bowel disease — colitis indeterminate. *Journal of Clinical Pathology* 1978; 31: 567-77.
- 5 — Edwards F C, Truelove S C. The course and prognosis of ulcerative colitis. III. Complications. *Gut* 1964; 5: 1-15.
- 6 — Kern F. Extraintestinal complications of chronic ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. In Kirsner J B, Shorter R G, eds. *Inflammatory Bowel disease*. Philadelphia. Lea & Febiger. 1980: 217-40.
- 7 — Goodman M J, Sparberg M. *Ulcerative colitis*. New York. John Wiley. 1978: 50-63.
- 8 — Crohn B B, Ginzburg L, Oppenheimer G D. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *Journal of American Medical Association* 1932; 99: 1323-9.
- 9 — Schachter H, Kirsner J B. *Crohn's disease of the gastrointestinal tract*. New York. John Wiley. 1980: 12-6.
- 10 — Sachar D B, Auslander M D, Walfish J S. Aetiological theories of inflammatory bowel disease. *Clinics in Gastroenterology* 1980; 9: 231-57.
- 11 — Korelitz B I. Therapy of inflammatory bowel disease, including use of immunosuppressive agents. *Clinics in Gastroenterology* 1980; 9: 331-49.

- 12 — Lewin K, Swales J D. Granulomatous colitis and atypical ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1966; 50: 211-23.
- 13 — Glotzer D J, Gardner R C, Goldman H, Hinrichs H R, Rosen H, Zetzel L. Comparative features and course of ulcerative colitis and granulomatous colitis. *New England Journal of Medicine* 1970; 282: 582-7.
- 14 — Lockhart-Mummery H E, Morson B C. Crohn's disease (regional enteritis) of the large intestine and its distinction from ulcerative colitis. *Gut* 1960; 1: 87-105.
- 15 — Lennard-Jones J E. Differentiation between Crohn's disease, ulcerative colitis and diverticulitis. *Clinics in Gastroenterology* 1972; 1: 367-75.
- 16 — Palumbo P J, Ward L E, Sauer W G, Scudamore H H. Musculoskeletal manifestations of inflammatory bowel disease. *Mayo Clinics Proceedings* 1973; 48: 411-6.
- 17 — Tavarela Veloso F, Saleiro J V, Baptista F, Ribeiro E. Whipple's disease: Report of a case with clinical immunological studies. *American Journal of Gastroenterology* 1981; 75: 419-25.
- 18 — Maizel H, Ruffin J M, Dobbins W D III. Whipple's disease: a review of 19 patients from one hospital and a review of the literature since 1950. *Medicine* 1970; 49: 175-205.
- 19 — Lassus L, Karvonen J. Reactive arthritis, Reiter's disease and psoriatic arthritis. *Clinics in Rheumatic Diseases* 1977; 3: 281-98.
- 20 — Ahvonen P, Sievers K, Aho A. Arthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection. *Acta Rheumatologica Scandinavica* 1969; 15: 232-53.
- 21 — Wimblad S. Erythema nodosum associated with infection with *Yersinia enterocolitica*. *Scandinavian Journal Infectious Disease* 1969; 1: 11-6.
- 22 — Berden J H M, Muytjens H L, Van de Putte L B A. Reactive arthritis associated with *Campylobacter jejuni* enteritis. *British Medical Journal* 1979; 1: 380-1.
- 23 — Wands J R, La Mont J T, Mann E, Isselbacher K. Arthritis associated with intestinal bypass procedure for morbid obesity. *New England Journal of Medicine* 1976; 294: 121-4.
- 24 — Bluestone R. Immunogenetics and ankylosing spondylitis. *Clinics in Rheumatic Diseases* 1977; 3: 255-64.

- 25 — Milazzo S C. Seronegative peripheral arthritis. *Clinics in Rheumatic Diseases* 1977; 3: 345-63.
- 26 — Macrae I, Wright V. A family study of ulcerative colitis: with particular reference to ankylosing spondylitis and sacroileitis. *Annals of Rheumatic Diseases* 1973; 32: 16-20.
- 27 — Haslock I, Wright V. The musculo-skeletal complications of Crohn's disease. *Medicine* 1973; 52: 217-25.
- 28 — Wright V, Watkinson G. Sacro-ileitis and ulcerative colitis. *British Medical Journal* 1965; 2: 675-80.
- 29 — Wright V. The arthritis of ulcerative colitis, Reiter's disease and Behcet's syndrome. In *Modern Trends in Rheumatology*, A G S Hill, ed. Butterworth, London, 1966.
- 30 — Mc Ewen C, Di Tata, Lingg D, Porini C, Good A, Rankin T. Ankylosing spondylitis and spondylitis accompanying ulcerative colitis, regional enteritis, psoriasis and Reiter's diseases. A comparative study. *Arthritis Rheumatology* 1971; 14: 291-318.
- 31 — Moll J M H, Haslock I, Macrae I F, Wright V. Associations between ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, Reiter's disease, the intestinal arthropathies, and Behcet's syndrome. *Medicine* 1974; 53: 343-64.
- 32 — Morris R I, Metzger Al, Bluestone R, Terasaki P I. HL-A-W27 — a useful discriminator in the arthropathies of inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine* 1974; 290: 1117-19.
- 33 — Nicholls A. Histocompatibility antigens and the arthritis of chronic inflammatory bowel disease. *Clinics in Rheumatic Diseases* 1977; 3: 265-80.
- 34 — Pepys M B, Druguet M, Klass H J, Dash A C, Mirjah D D, Aviva Ptrie. Immunological studies in inflammatory bowel disease. In *Immunology of the Gut*. Ciba Foundation Symposium, 46. Amsterdam, Elsevier, 1977: 283-304.
- 35 — Whorwell P J, Wright R. Immunological aspects of inflammatory bowel disease. *Clinics in Gastroenterology* 1976; 5: 303-21.
- 36 — Wright R. *Immunology of Gastrointestinal and Liver Disease*. London: Arnold. 1977: 45-60.
- 37 — Kraft S C. Inflammatory bowel disease (ulcerative colitis and Crohn's disease). In: *Immunology of the Gastrointestinal Tract*. Asquith P, ed. Churchill Livingstone, London, 1979: 95-128.

- 38 — Kraft S C, Kirsner J B. The Immunology of ulcerative colitis and Crohn's disease: clinical and humoral aspects in inflammatory Bowel disease, ed. Kirsner J B & Shorter R G Philadelphia: Lea and Febiger 1980: 86-120.
- 39 — Hodgson H J F, Potter B J, Jewell D P. Immune complexes in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clinical Experimental Immunology* 1977; 29: 187-196.
- 40 — Kwitko A O, Shearman D J L, McKenzie P E, La Brooy J T, Rowland R Woodroffe A J. Whipple's Disease: A case with circulating immune complexes. *Gastroenterology* 1980; 79: 1318-23.
- 41 — Julkunen H. Reactive arthritis. *Bulletin Rheumatic Disease* 1979; 29: 1002-5.
- 42 — Wiggins R C, Cochrane L G. Immune-complex-mediated biologic effects. *New England Journal of Medicine* 1981; 304: 518-20.
- 43 — Ferguson A. Models of Intestinal Hypersensitivity. *Clinics in Gastroenterology* 1976; 5: 271-88.
- 44 — Levinsky R J. The measurement of immune complexes. Is it clinically useful? *Immunology today* 1981; 2: 94-7.
- 45 — Kemler B J, Alpert E. Inflammatory bowel disease associated circulating immune complexes. *Gut* 1980; 21: 195-201.
- 46 — Gell P G H, Coombs R R A, Lachmann P J. Clinical aspects of immunology. Oxford: Blackwell. 1975.
- 47 — Tavela Veloso F, Torrinha J F, Tomé Ribeiro A.: Imunoglobulinas séricas na colite ulcerosa e doença de Crohn. *Acta Médica Portuguesa* 1981; 3: 37-42.
- 48 — Tavela Veloso F, Lopes Vaz A. The arthritis associated with inflammatory bowel disease. *Proc. VII World Congress of Gastroenterology, Stockholm, 1982.*
- 49 — Tavela Veloso F, Lopes Vaz A, Tomé Ribeiro A, Mendes A: HLA and complement in the arthritis of inflammatory bowel disease. *Proc. VI World Congress of Gastroenterology, Madrid 1978; 234.*
- 50 — Monteiro E, Fossey J. Shiner M, Drasar B S, Allison A C. Antibacterial antibodies in rectal and colonic mucosa in ulcerative colitis. *Lancet* 1971; 1: 249-51.
- 51 — Thomas H L, Jewel D P. Clinical Gastrointestinal Immunology. Oxford: Blackwell, 1979: 20.
- 52 — Tavela Veloso F, Saleiro J V. Heterogeneity of plasma cells in Crohn's disease — An electron microscopic analysis. *Journal Submicroscopic Cytology* 1981; 13: 57-62.

- 53 — Tavarela Veloso F, Saleiro J V. Immunocytes in Crohn's disease — Immunohistochemical and electronmicroscopy studies. Proc. VII World Congress of Gastroenterology. Stockolm. 1982; 446.
- 54 — Tavarela Veloso F. Imunoglobulina E (IgE) na mucosa rectal de doentes com colite ulcerosa, Journal da Sociedade das Ciências Médicas de Lisboa 1981; 8: 533-8.
- 55 — Tavarela Veloso F, Saleiro J V. Mast cell/IgE/eosinophils in ulcerative colitis. Proc. VII World Congress of Gastroenterology. Stockolm, 1982; 350.
- 56 — Kay A B. The role of the eosinophil. Journal of Allergy and Clinical Immunology 1979; 64: 90-104.
- 57 — Kraft S C, Kirsner J B. Mast cells and the gastrointestinal tract. Gastroenterology 1960; 39: 764-70.
- 58 — Keren D F, Weisburger W R, Yardley J H, Salyer W R, Arthur R R, Lharach P. Whipple's disease: Demonstration by immunofluorescence of similar bacterial antigens in macrophages from three cases. Johns Hopkins Medical Journal 1976; 139: 51-9.
- 59 — Tavarela Veloso F, Saleiro J V. Whipple's disease: Antibacterial immunofluorescence reactions in macrophages. Archives of Pathology and Laboratory Medicine 1982; 106: 153.
- 60 — Tavarela Veloso F. Whipple's bacillus. Digestive Disease and Sciences 1982; 27: 283.
- 61 — Tavarela Veloso F, Saleiro J V. Whipple's disease: antibacterial immunofluorescence studies of four cases. Proc. VII World Congress. Stockolm, 1982; 438.
- 62 — Tavarela Veloso F, Saleiro J V. Mast cells in Whipple's disease. Journal Submicroscopic Citology 1982; 14: 515-20.
- 63 — Saleiro J V, Tavarela Veloso F. Blebs involving the microvillous border in ulcerative colitis. Journal Submicroscopic Citology 1980; 12: 687-9.
- 64 — Kirsner J B. The local and systemic complications of inflammatory bowel disease. Journal of American Medical Association 1979; 242: 1177-83.
- 65 — Winship D H, Summers R W, Singleton J W, Best W R, Becketl J M, Lenk L F, Kern F. National Cooperative Crohn's Disease Study: study design and conduct of the study. Gastroenterology 1979; 77: 829-42.

- 66 — Marshak R H, Wolf B S. The roentgen findings in regional enteritis. *Journal Mount Sinai Hospital* 1955; 22: 192-214.
- 67 — Lockhart-Mummery H E, Morson B C. Crohn's disease of the large intestine. *Gut* 1964; 5: 493-509.
- 68 — Marshak R H, Lindner A E. Radiologic diagnosis of chronic ulcerative colitis and Crohn's disease in inflammatory bowel disease, ed. Kirsner J B & Shorter R G. Philadelphia: Lea and Febiger, 1980: 341-409.
- 69 — Wolf B S, Marshak R H. Granulomatous colitis (Crohn's disease of the colon): roentgen features. *American Journal Roentgenology* 1962; 88: 662-70.
- 70 — Morson B C, Dawson I M P. *Gastrointestinal Pathology*. Blackwell, Oxford, 1972.
- 71 — Greenstein A J, Kark A E, Dreiling D A. Crohn's disease of the colon: I. Fistula in Crohn's disease of the colon. Presenting features and management in 63 patients. *American Journal of Gastroenterology* 1974; 62: 419-29.
- 72 — Schachter H, Kirsner J. Definitions of inflammatory bowel disease of unknown etiology. *Gastroenterology* 1975; 68: 591-600.
- 73 — Marcussen H. Anti-colon antibodies in ulcerative colitis. A clinical study. *Scandinavian Journal Gastroenterology* 1976; 11: 763-7.
- 74 — Truelove S C, Richards W C D. Biopsy studies in ulcerative colitis. *British Medical Journal* 1956; 2: 1315-18.
- 75 — Rankin G B, Watts H D, Melnky C S, Kelly M L. National Cooperative Crohn's Disease Study: extraintestinal manifestations and perianal complications. *Gastroenterology* 1979; 77: 914-20.
- 76 — Bennett P H, Burch T A. New York symposium on population studies in rheumatic diseases. New diagnostic criteria. *Bulletin Rheumatic Diseases*. 1967; 17: 453.
- 77 — Mancini G, Carbonara A O, Heremans J F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry* 1965; 2: 235-54.
- 78 — Walton K W, Ellis H A. A method for serial determinations of serum complement. *Immunology* 1958; 1: 224-33.
- 79 — Kabat E, Mayer M. *Experimental immunochemistry*. Charles C Thomas, Illinois 1964.

- 80 — Nagaya H, Buckley C E, Sieker H O. Positive antinuclear factor in patients with unexplained pulmonary fibrosis. *Annals Internal Medicine* 1969; 1135-45.
- 81 — Roit I M, Doniach D. Complement fixation test for thyroid, stomach, adrenal, mitochondrial and other non-organ-specific cytoplasmic antibodies. *Bulletin World Health Organization* 1969; 41: 13-9.
- 82 — Anderson S G, Bentzon M W, Houba V, Krag P. International reference preparation of rheumatoid arthritis serum. *Bulletin World Health Organization* 1970; 42: 311.
- 83 — Jondal M, Holm G, Wigzell H. Surface markers on human T and B lymphocytes in a large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *Journal Experimental Medicine* 1972; 136: 207-15.
- 84 — Chao W, Yokoyama M. Determination of B Lymphocyte population using antibody-coated polyacrylamide beads. *Clinica Chimica Acta* 1977; 78-79.
- 88 — Teresaki P I, Mc Clelland J D. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. techniques utilisant le polyéthylène glycol. *Novelle Press Medicale* 1977; 43: 4031.
- 86 — Soborg M, Bendixen G. Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity. *Acta Medica Scandinavica* 1967; 81: 247-56.
- 87 — De Moura M C. Resposta imunológica ao antígeno da hepatite B. Tese de doutoramento. Lisboa 1974.
- 88 — Teresaki P I, Mc Clelland J D. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; 204: 998-1000.
- 89 — Rolla B H, Kent T H, Hansen R N. Clinical usefulness of rectal biopsy in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1979; 77: 938-44.
- 90 — Dorsett B H, Ioachin H L. A method for the use of immunofluorescence on paraffin-embedded tissues. *American Journal of Clinical Pathology* 1978; 69: 66-72.
- 91 — Closs O, Aarli J A. Evans blue as counterstain in the demonstration of muscle antibodies by immunofluorescence in myasthenia gravis. *Journal of Clinical Pathology* 1973; 27: 162-7.
- 92 — Nairn R C. Fluorescent protein tracing. Churchill Livinstone, Edinburg 1976; 125-69.

- 93 — Brandtzaeg P, Balkien K, Fansa O, Hoel P S. Immunohistochemical characterization of local immunoglobulin formation in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1974; 66: 1123-36.
- 94 — Dunill M S. Quantitative methods in histology. *Recent Advances Clinical Pathology* 1968; Series VI: 401-16.
- 95 — Saleiro J V. Cancerização cutânea experimental. Aspectos ultrastruturais. Tese de doutoramento. Porto, 1977.
- 96 — Rentz T W, Warden S, Garcia F J, Kovalcik P J. Crohn's disease with spontaneous ileoumbilical and ileovesical fistulae. *Digestive Diseases and Sciences* 1979; 24: 316-8.
- 97 — Hiley P C, Cohen N, Present D H. Spontaneous umbilical fistula in granulomatous (Crohn's) disease of the bowel. *Gastroenterology* 1971; 60: 103-7.
- 98 — Goldberg H I, Caruthers S B, Nelson J A, Singleton J W. Radiographic findings of the National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1979; 77: 925-37.
- 99 — Tavarela Veloso F, Gouveia de Almeida, Saleiro J V, Lopes Vaz A. Colite ulcerosa e artrite — estudo clínico e imunológico. *Reumatologia Multidisciplinar* 1981; 1: 23-5.
- 100 — Korelitz B I, Sommers S C. Pyoderma Gangrenosum complicating Crohn's disease. *American Journal Gastroenterology* 1977; 68: 171-6.
- 101 — Holt P J A, Davies M G, Saunders K C, Nuki G. Pyoderma Gangrenosum. Clinical and laboratory findings in 15 patients with special reference to polyarthritis. *Medicine* 1980; 57: 114-33.
- 102 — White W H. Colitis. *Lancet* 1895; 1: 537-8.
- 103 — Bagen J A. Complications and sequelae of chronic ulcerative colitis. *Annals of Internal Medicine* 1929; 3: 335-52.
- 104 — Hammer B, Ashurst P, Naish J. Diseases associated with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 1968; 9: 17-21.
- 105 — Ansell B M, Wigley R A D. Arthritic manifestations in regional enteritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1964; 23: 64-72.
- 106 — Bywaters E G L, Ansell B M. Arthritis associated with ulcerative colitis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1958; 17: 169-83.

- 107 — Cornes J S, Stecher M. Primary Crohn's disease of the colon and rectum. *Gut* 1961; 2: 189-201.
- 108 — Haslock I. The arthritis associated with Crohn's disease — a family study. *Annals of Rheumatic Diseases* 1973; 32: 479-86.
- 109 — Fernandez-Herlihy L. The articular manifestations of chronic ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine* 1959; 261: 259-63.
- 110 — Bowen G E, Kirsner J B. The arthritis of ulcerative colitis and regional enteritis («Intestinal Arthritis»). *Medical Clinics of North America* 1965; 49: 17-30.
- 111 — Jalan K N, Prescott R J, Walker R J, Sircus W, Mc. Manus J P A, Lard W I. Arthropathy, ankylosing spondylitis and clubbing of the fingers in ulcerative colitis. *Gut* 1970; 11: 748-54.
- 112 — Jayson M I V, Salmon P R, Harrison W J. Inflammatory bowel disease in ankylosing spondylitis. *Gut* 1970; 11: 506-11.
- 113 — Lewkonja R M, McConnell R B. Familial inflammatory bowel disease — heredity or environment. *Gut* 1976; 17: 235-43.
- 114 — McBride J A, King M J, Baikie A G, Crean G P, Sircus W. Ankylosing spondylitis and chronic inflammatory diseases of the intestines. *British Medical Journal* 1963; 2: 483-6.
- 115 — Basler R S W. Ulcerative colitis and the skin. *Medical Clinics of North America* 1980; 64: 941-54.
- 116 — Lever W F, Schaumburg-lever G. *Histopathology of the skin*. 5th Ed., J B Lippincott Co., Philadelphia, 1975.
- 117 — Finkel S I, Janowitz H D. Trauma and the pyoderma gangrenosum of inflammatory bowel disease. *Gut* 1981; 22: 410-2.
- 118 — Lazarus G S, Goldsmith L A, Rocklin R E, Pinals R S, de Buisseret J P, David J R, Draper W. Pyoderma gangrenosum altered delayed hypersensitivity and polyarthritis. *Archives of Dermatology* 1972; 105: 46-51.
- 119 — Struthers G R. Pyoderma gangrenosum, seronegative polyarthropathy and inflammatory bowel disease. *Journal Royal Society of Medicine* 1979; 72: 284-6.
- 120 — Perry H D, Brunsting L A. Pyoderma Gangrenosum. A clinical study of 19 cases. *Archives of Dermatology* 1957; 75: 380-6.

- 121 — Stathers G M, Abbott L G, Mc Guinness A E. Pyoderma Gangrenosum in association with regional enteritis. *Archives of Dermatology* 1967; 95: 375-80.
- 122 — Azevedo C, Oliveira M C. Lesões cutâneas do tipo «metastático» na doença de Crohn. *Journal do Médico* 1979; 1831: 414-5.
- 123 — Thornton J R, Teague R H, Low-Beer T S, Read A E. Pyoderma gangrenosum and ulcerative colitis. *Gut* 1980; 21: 247-8.
- 124 — Basu M K, Asquith P. Oral manifestations of inflammatory bowel disease. *Clinics in Gastroenterology* 1980; 9: 307-21.
- 125 — Jacobs A, Cavil I. The oral lesions of iron deficiency anaemia: pyridoxime and riboflovin status. *British Journal Haematology* 1968; 14: 291-5.
- 126 — Lehner T. Oral ulceration and Behcet's syndrome. *Gut* 1977; 18: 491-511.
- 127 — Basu M K, Asquith P. Immunological aspects of the mouth. *Immunology of the gastrointestinal tract* (Asquith P, ed) Edinburgh, Churchill Livingstone 1979; 37-54.
- 128 — Basu M K, Asquith P, Thompson R A, Cooke W T. Oral manifestations of Crohn's disease. *Gut* 1975; 16: 249-54.
- 129 — James G. Acute anterior uveitis. *Clinics in Rheumatic Diseases* 1977; 3: 299-313.
- 130 — Eade M N. Liver disease in ulcerative colitis, I. Analysis of operative liver biopsy in 138 consecutive patients having colectomy. *Annals of Internal Medicine* 1970; 72: 475-87.
- 131 — Eade M N, Cooke W T, Williams J A. Liver disease in Crohn's disease — a study of 100 consecutive patients. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1971; 6: 199-204.
- 132 — Dordal E, Glagov S, Kirsner J B. Hepatic lesions in chronic inflammatory bowel disease. Clinical correlations with liver biopsy diagnoses in 103 patients. *Gastroenterology* 1967; 52: 239-53.
- 133 — Esteves A V, Areias M E, Pinto Correia J. Colite ulcerosa: História natural (Análise de 70 casos). *Medicina Universal* 1978; 21: 5-10.
- 134 — Brooke B N, Slaney G. Portal bacteraemia in ulcerative colitis. *Lancet* 1958; 1: 1206-7.
- 135 — Eade M N, Brooke B N. Portal bacteraemia in cases of ulcerative colitis. submitted to colectomy. *Lancet* 1969; 1: 1008-9.

- 136 — Juhlin L, Krause V, Shelley W B. Endotoxin-induced microclots in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1980; 15: 311-4.
- 137 — Talstad I, Rootwelt K, Gjone E. Thrombocytosis in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1973; 8: 135-8.
- 138 — Lake A M, Stanffer J Q, Stuart M J. Coagulation and platelet abnormalities in acute, untreated inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1975; 64: A-47/905.
- 139 — Grossman M S, Nugent F W. Urolithiasis as a complication of chronic diarrheal disease. *American Journal Digestive Disease* 1967; 12: 491-8.
- 140 — Gelzayd E A, Brener R I, Kirsner J B. Nephrolithiasis in inflammatory bowel disease. *American Journal Digestive Disease* 1968; 13: 1027-34.
- 141 — Smith L H, Fromm H, Hofman A F. Acquired hyperoxaluria, nephrolithiasis and intestinal disease: Description of a syndrome. *New England Journal of Medicine* 1972; 286: 1371-5.
- 142 — Shashaty G G. Hemolytic anemia and ulcerative colitis. *Digestive Diseases and Science* 1980; 25: 154.
- 143 — Balint J A, Hammack W J, Patton T B. Association of ulcerative colitis and red blood cells coated with autoimmune antibody. *American Journal Digestive Disease* 1963; 8: 537-44.
- 144 — Halsted C H, Gandhi G, Tamura T. Sulfasalazine inhibits the absorption of folates in ulcerative colitis. *New England Journal of Medicine* 1981; 305: 1513-6.
- 145 — Ball G V, Goldman L N. Chronic ulcerative colitis, skin necrosis, and cryofibrinogenemia. *Annals of Internal Medicine* 1976; 85: 464-6.
- 146 — Solley G O, Winkelmann R K, Rovelstad R A. Correlation between regional enterocolitis and cutaneous polyarthritis nodosa. Two case reports and review of the literature. *Gastroenterology* 1975; 69: 235-9.
- 147 — Goodman M J, Moir D J, Truelove S C. Pericarditis associated with ulcerative colitis and Crohn's disease. *American Journal Digestive Disease* 1976; 21: 98-102.
- 148 — Mukhopadhyay D, Nasr K, Grossman B J, Kirsner J B. Pericarditis associated with inflammatory bowel disease. *Journal American Medical Association* 1970; 211: 1540-2.

- 149 — Ménard D B, Haddad H, Blain J G, Beaundry R, Devroed G, Massé S. Granulomatous myositis and myopathy associated with Crohn's colitis. *New England Journal of Medicine* 1976; 295: 818-9.
- 150 — Lindström C, Wramsby H, Östberg G. Granulomatous arthritis in Crohn's disease. *Gut* 1972; 13: 257-9.
- 151 — Stokke K T. Nephrotic syndrome in ulcerative colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1976; 11, 571-6.
- 152 — Järnerot G. The thyroid in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Acta Medica Scandinavica* 1975; 197: 77-81.
- 153 — Eade O E, Smith C L, Whorwell P J. Pulmonary function in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1977; 18: A 423.
- 154 — Fausa O, Nygaard K, Elgjo K. Amyloidosis and Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1977; 12: 657-62.
- 155 — Shorvon P J. Amyloidosis and inflammatory bowel disease. *American Journal of Digestive Disease* 1977; 22: 209-13.
- 156 — Kosunen T V, Kauranen O, Martio J. Reactive arthritis after *Campylobacter jejuni* enteritis in patients with HLA-B₂₇. *Lancet* 1980; 280: 984-5.
- 157 — Thayer W R. Inflammatory bowel disease: Where are the frontiers? *Medical Clinics of North America* 1980; 64: 1221-31.
- 158 — Whorwell P J. Infection agents in Crohn's disease — fact or artifact? *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1981; 16: 161-6.
- 159 — Tedesco F J. Differential diagnosis of ulcerative colitis and Crohn's ileocolitis and other specific inflammatory disease of the bowel. *Medical Clinics of North America* 1980; 64: 1173-83.
- 160 — Kirsner J B, Shorter R G. Recent developments in «nonspecific» inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine* 1982; 306: 775-84.
- 161 — Sachar D B, Auslander M O, Walfish J S. Aetiological theories of inflammatory bowel disease. *Clinics in Gastroenterology* 1980; 9: 231-57.
- 162 — Beeken W L. Transmissible agents in inflammatory bowel disease. *Medical Clinics of North America* 1980; 64: 1021-35.
- 163 — Felsen J. The relationship of bacillary dysentery to distal ileitis, chronic ulcerative colitis, and nonspecific intestinal granuloma. *Annual Review of Medicine* 1936; 10: 645-69.

- 164 — Mayberry J F, Rhodes J, Heatley R V. Infections which cause ileocolic disease in animals: Are they relevant to Crohn's disease? *Gastroenterology* 1980; 78: 1080-4.
- 165 — Parent K, Mitchell P D. Cell wall-defective variants of pseudomonas-like (Group Va) bacteria in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1978; 75: 368-72.
- 166 — Aronson M D, Phillips C A, Beeken W L, Forsyth B R. Isolation and characterization of a viral agent from intestinal tissue of patients with Crohn's disease and other intestinal disorders. *Progress in Medical Virology* 1975; 21: 165-76.
- 167 — Gitnick G L, Arthur M H, Shibata I. Cultivation of viral agents from Crohn's disease. A new sensitive system. *Lancet* 1976; 2: 215-7.
- 168 — Strickland R G, Volpicelli N A, Roninson J M, Greenlee L S, McLaren L C. Isolation of infectious agents from patients with inflammatory bowel disease (abstract). *Clinical Research* 1979; 27: 29.
- 169 — Lindeman R J, Weinstein L, Leitan R. Ulcerative colitis and intestinal salmonellosis. *American Journal Medicine Science* 1967; 254: 855-61.
- 170 — Dickinson R B, Gilmour H M, McClelland B L. Rectal biopsy in patients presenting to an infectious disease unit with diarrhoeal disease. *Gut* 1979; 20: 141-8.
- 171 — Bolton R P, Sherriff R J, Read A E. *Clostridium difficile* associated diarrhea: A role in inflammatory bowel disease? *Lancet* 1980; 1: 383-4.
- 172 — Trnk Y M, LaMont J T. Association of *clostridium difficile* toxin with symptomatic relapse of chronic inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1981; 80: 693-6.
- 173 — Vantrappen G, Agg H O, Ponette E, Geboes K, Bertrand P. *Yersinia enterocolitidis* and enterocolitis: gastroenterological aspects. *Gastroenterology* 1977; 72: 220-7.
- 174 — Blaser M J, Reller L B. *Campylobacter enteritis*. *New England Journal of Medicine* 1981; 305: 1444-52.
- 175 — Fairweather S D, Youngs D, George R H, Burdon D W, Keighley M R B. Arthritis in pseudomembranous colitis associated with an antibody to *clostridium difficile* toxin. *Journal Royal Society Medicine* 1980; 73: 524-5.
- 176 — Thayer W R. Enteric and extra-enteric complications of intestinal bypass and inflammatory bowel disease. Are there some clues? *Gastroenterology* 1980; 78: 1097-9.

- 177 — Drenick E J, Ament M E, Finegold S M. Bypass enteropathy, intestinal and systemic manifestations following small-bowel bypass. *Journal American Medical Association* 1976; 236: 269-72.
- 178 — Rose E, Espinoza L R, Osterland K. Intestinal bypass arthritis: association with circulating immune complexes and HLA-B₂₇. *Journal Rheumatology* 1974; 4: 129-34.
- 179 — Kent S P, Kirkpatrick P M. Whipple's disease. Immunological and histochemical studies of eight cases. *Archives Pathology Laboratory Medicine* 1980; 104: 544-7.
- 180 — Bhagavan B, Hofkin G A, Cochran B A. Whipple's disease: morphologic and immunofluorescence characterization of bacterial antigens. *Human Pathology* 1981; 12: 930-6.
- 181 — Auer I O, Wechster W, Ziener E, Malchow H, Sommer H. Immune status in Crohn's disease. I. Leucocyte and lymphocyte subpopulations in peripheral blood. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1978; 13: 561-71.
- 182 — Bowen G E, Kirsner J B. Positive epinephrine skin test for «circulating endotoxin» in inflammatory disease of the intestine. *American Journal of Clinical Pathology* 1965; 44: 642-7.
- 183 — Thayer W R, Brown M, Sangree M H, Katz J, Hersht. *Escherichia coli* O: 14 and colon hemagglutinating antibodies in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1969; 57: 311-8.
- 184 — Tabaqchali S, O'Donoghue D P, Bettelheim K A. *Escherichia coli* antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1978; 19: 108-13.
- 185 — Mathews N, Mayberry J F, Rhodes J, Neale L, Munro J, Lawson G, Rowland A, Berkhoff G, Barthold S. Agglutinins to bacteria in Crohn's disease. *Gut* 1980; 21: 376-80.
- 186 — Helphingstine C J, Hentges D J, Campbell B J, Butt J, Barret T. Antibodies detectable by counter-immunoelectrophoresis against bacteroides antigens in serum of patients with inflammatory bowel disease. *Journal of Clinical Microbiology* 1979; 9: 373-8.
- 187 — Anderson A F R. Ulcerative colitis — an allergic phenomenon. *American Journal of Digestive Disease* 1942; 9: 91-8.
- 188 — Broberger O, Perlmann P. Autoantibodies in human ulcerative colitis. *Journal of Experimental Medicine* 1959; 110: 657-74.

- 189 — Wright R, Truelove S C. Autoimmune reactions in ulcerative colitis. *Gut* 1966; 7: 32-40.
- 190 — Walker J E G. Possible diagnostic test for Crohn's disease by use of buccal mucosa. *Lancet* 1978; 2: 759-60.
- 191 — Broberger O. Immunological studies in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1974; 47: 229-40.
- 192 — Marcussen H. Fluorescent anti-colonic and *E. Coli* antibodies in ulcerative colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1978; 14: 277-81.
- 193 — Kunin C M. Separation, characterization, and biological significance of a common antigen in Enterobacteriaceae. *Journal Experimental Medicine* 1963; 118: 565-86.
- 194 — Kirsner J B, Shorter R G. Recent developments in nonspecific inflammatory bowel disease. *New England Journal of Medicine* 1982; 306: 837-48.
- 195 — Walker W A. Antigen uptake in the gut: immunologic implications. *Immunology today* 1981; 2: 30-34.
- 196 — Hodgson H J F, Jewell D P. The humoral immune system in inflammatory bowel disease. II. Immunoglobulin levels. *American Journal of Digestive Disease* 1978; 23: 123-8.
- 197 — Kraft S C, Ford H E, McCleery H L, Kirsner J B. Serum immunoglobulin levels in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterology* 1968; 54: 1251.
- 198 — Weeke B, Bendixen G. Serum immunoglobulins and organ-specific cellular hypersensitivity in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Acta Medica Scandinavica* 1969; 186: 87-91.
- 199 — Neilsen H, Binder V, Dougharty H, Svehag-A-E. Circulating immune-complexes in ulcerative colitis I. Correlation to disease activity. *Clinical Experimental Immunology* 1978; 31: 72-80.
- 200 — Strauss R G, Ghishan F, Mitros F, Ebensberger J R, Kirsner T, Tannous R, Younoszai K. Rectosigmoidal colitis in common variable immunodeficiency disease. *Digestive Disease Sciences* 1980; 25: 798-801.
- 201 — Fillit H, Bernstein L, Davidson M, Brandt L, Bezahler G, Cohen M. Primary acquired hypogammaglobulinemia and regional enteritis. *Archives Internal Medicine* 1977; 137: 1252-4.

- 202 — Ross I N, Asquith P. Primary immune deficiency. In: Immunology of the Gastrointestinal Tract, Asquith P., Ed. Churchill Livingstone. Lond, 1979: 152-82.
- 203 — Saleiro J V, Carneiro Chaves F J Z, Tavarela Veloso F. Ultrastructural aspects of macrophage infiltration of the small bowel in common variable hypogammaglobulinemia. Acta Medica Portuguesa, in press.
- 204 — Strickland R G, Korsmeyer S, Soltis R D, Wilson I D, Williams C R. Peripheral blood T and B cells in chronic inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1974; 67: 659-77.
- 205 — Strickland R G, Husby G, Black W C, Williams R C. Peripheral blood and intestinal lymphocyte sub-populations in Crohn's disease. Gut 1975; 16: 847-853.
- 206 — Auer I O, Gotz S, Ziemer E, Malchow H, Ehms H. Immune status in Crohn's disease. 3. Peripheral blood B lymphocytes, enumerated by means of F (ab)₂ — antibody fragments, null and T lymphocytes. Gut 1979; 20: 261-268.
- 207 — Meuwissen S G M, Feltkamp T M, Brutel de la Rivière A, von den Borne A E G, Tytgat G N. Analysis of the lympho-plasmacytic infiltrate in Crohn's disease with special reference to identification of lymphocyte-subpopulations. Gut 1976; 17: 770-80.
- 208 — MacDermott R P, Nash G S, Bertovish M J, Seiden M V, Bragdon M J, Beale M G. Alterations of IgM, IgG, and IgA synthesis and secretion by peripheral blood and intestinal mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. Gastroenterology 1981; 81: 884-52.
- 209 — Ginsburg C H, Ault K A, Falchuk ZM. Monoclonal B Lymphocytes in the peripheral blood of patients with inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1981; 81: 1111-4.
- 210 — Victorino R M M, Hodgson H J F. Spontaneous suppressor cell function in inflammatory bowel disease. Digestive Diseases and Sciences 1981; 26: 801-6.
- 211 — Lake A M, Stitzel A E, Urmson J R, Walker W A, Spitzer R E. Complement alterations in inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1979; 76: 1374-9.
- 212 — Hodgson H J F, Potter B J, Jewel D P. Humoral immune system in inflammatory bowel disease: I. Complement levels. Gut 1977; 18: 749-53.
- 213 — Fletcher J. Serum complement levels in active ulcerative colitis. Gut 1965; 6: 172-5.

- 214 — Ward M, Eastwood M A. Serum C₃ and C₄ complement components in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Digestion* 1975; 13: 100-3.
- 215 — Richens E R, Thorp C M, Bland P W, Hall N D. Circulating immune complexes in Crohn's disease: Their characterization and interrelationship with components of the complement system. *Digestive Diseases Sciences* 1982; 27: 129-38.
- 216 — Hodgson H J F, Potter B J, Jewell D P. C₃ metabolism in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clinical Experimental Immunology* 1977; 29: 490-5.
- 217 — Teisberg P, Gjone E. Humoral immune system activity in inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1975; 7: 545-9.
- 218 — Ballard J, Shiner M. Evidence of cytotoxicity in ulcerative colitis from immunofluorescent staining of the rectal mucosa. *Lancet* 1974; 1: 1014-7.
- 219 — Feinstein P A, Kaplan S R, Thayer W R. The alternative complement pathway in inflammatory bowel disease: quantitation of the C₃ proactivator (Factor B) protein. *Gastroenterology* 1976; 70: 181-5.
- 220 — Potter B J, Brown D J C, Watson A, Jewell D P. Complement inhibitors and immunoconglutinin in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 1980; 21: 1030-4.
- 221 — Doe W F, Booth CC, Brown D L. Evidence for complement binding immune complexes in adult celiac disease, Crohn's disease, and ulcerative colitis. *Lancet* 1973; 1: 402-3.
- 222 — Höyraal H M, Mellbye O J. High levels of serum complement factors in juvenile rheumatoid arthritis. *Annals of Rheumatic Diseases* 1974; 33: 243-7.
- 223 — Lopes Vaz A. Membrana e liquido sinoviais nas afecções reumáticas. Tese de doutoramento. Porto. 1971.
- 224 — Jewell D P, MacLennan I C M. Circulating immune complexes in inflammatory bowel disease. *Clinical Experimental Immunology* 1973; 14: 219-26.
- 225 — Fiasse R, Lurhuma A Z, Masson P L, Dive C. Signification clinique des complexes immunes circulants dans la maladie de Crohn. *Acta Gastro-Enterologica Belgica* 1978; 41: 319-28.
- 226 — Lawley T J, James S P, Jones E A. Circulating immune complexes: Their detection and potential significance in some hepatobiliary and intestinal diseases. *Gastroenterology* 1980; 78: 626-41.
- 227 — McCluskey R T, Hall C L, Colvin R B. Immune complex mediated diseases. *Human Pathology* 1978; 9: 71-84.

- 228 — Agnello V. Immune complex assays: The first ten years. *Annals of Internal Medicine* 1981; 94: 266-7.
- 229 — Fiasse R, Lurhuma A Z, Cambiasso C L, Masson P L, Dive C. Circulating immune complexes and disease activity in Crohn's disease. *Gut* 1978; 19: 611-7.
- 230 — Jewell D P. In *Topics in Gastroenterology* 6 ed. Truelove S C & Jewell D P. Blackwell. Oxford 1978; 311-25.
- 231 — Shorter R G, Cardoza M, Spencer R J, Huizenga K A. Further studies of in vitro cytotoxicity of lymphocytes from patients with ulcerative colitis and granulomatous colitis for allogenic colonic epithelial cells, including the effects of colectomy. *Gastroenterology* 1969; 56: 304-9.
- 232 — Shorter R G, Huizenga K A, Spencer R J, Aas J, Guy S K. Inflammatory bowel disease: cytophilic antibody and the cytotoxicity of lymphocytes for colonic cells in vitro. *American Journal Digestive Disease* 1971; 16: 673-80.
- 233 — Kemler B J, Alpert E. Inflammatory bowel disease: study of cell mediated cytotoxicity for isolated human colonic epithelial cells. *Gut* 1980; 21: 353-9.
- 234 — Mee A S, McLaughlin J E, Hodgson H J F, Jewell D P. Chronic immune colitis in rabbits. *Gut* 1979; 20: 1-5.
- 235 — Thayer W R. Are the inflammatory bowel diseases immune complex diseases? *Gastroenterology* 1976; 70: 136-7.
- 236 — Williams R C Jr. Immune complexes: a clinical perspective. *American Journal of Medicine* 1981; 71: 743-5.
- 237 — Soltis R D, Harz D, Morris M J, Wilson I D. Evidence against the presence of circulating immune complexes in chronic inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1979; 76: 1380-5.
- 238 — McDuffie F C. Immune complexes in the rheumatic diseases. *Journal Allergy Clinical Immunology* 1978; 62: 37-43.
- 239 — Levinsky R J, Lehner T. Circulating soluble immune complexes in recurrent oral ulceration and Behçet's syndrome. *Clinical Experimental Immunology* 1978; 32: 193-8.
- 240 — Farmer R G, Michener W M, Mortimer E A. Studies of family history among patients with inflammatory bowel disease. *Clinics in Gastroenterology* 1980; 9: 271-8.
- 241 — McConnell R B. Genetics of gastrointestinal disorders. *Clinics in Gastroenterology* 1973; 2: 489-520.

- 242 — Dassei P M. A familial pattern in inflammatory disease of the bowel (Crohn's disease and ulcerative colitis). *Diseases of Colon and Rectum* 1977; 20: 669-71.
- 243 — Brewerton D A, Caffrey M, Hart F D, James D, Nicholls A, Sturrock R. A B Ankylosing spondylitis and HLA B₂₇. *Lancet* 1973; 1: 904-7.
- 244 — Schlosstein L, Terasaki P I, Blueslone R, Pearson C M. High association of an HL-A antigen, W₂₇, with ankylosing spondylitis. *New England Journal of Medicine* 1973; 2: 704-6.
- 245 — Lewkonja R M, Woodrow J C, McConnell R B, Price Evans D A. HL-A antigens in inflammatory bowel disease. *Lancet* 1974; 1: 574-5.
- 246 — Asquith P, Mackintosh P, Stokes P L, Holmes G, Cooke W T. Histocompatibility antigens in patients with inflammatory bowel disease. *Lancet* 1974; 1: 113-5.
- 247 — Mallas E G, Mackintosh P, Asquith P, Cooke W T. Histocompatibility antigens in inflammatory bowel disease. *Gut* 1976; 17: 906-10.
- 248 — Schwartz S E, Siegelbaum S P, Fazio T L, Hubbell C, Henry J B. Regional enteritis: evidence for genetic transmission by HLA typing. *Annals of Internal Medicine* 1980; 93: 424-7.
- 249 — Smolen J S, Gangl A, Polterauer P, Menzel E J, Mayer W R. HLA antigens in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1982; 82: 34-8.
- 250 — Delpre G, Kadish V, Gazit E, Joshua H, Zamir R. HLA antigens in ulcerative colitis and Crohn's disease in Israel. *Gastroenterology* 1980; 78: 1452-7.
- 251 — Tsuchiya M, Yoshida T, Asakura H, Hibi T, Ono A, Mizuno Y, Tsuji K. HLA antigens and ulcerative colitis in Japan. *Digestion* 1977; 15: 286-94.
- 252 — Tavarela Veloso F, Lopes Vaz A. Les arthritides de la rectocolite ulcero-hémorragique et de la maladie de Crohn: étude clinique et immunologique. IV Congrès Latin de Rhumatologie, Liège, 1980; 25.
- 253 — Albert E D. The major histocompatibility complex (MHC) in man. *Clinics in Rheumatic Diseases* 1977; 3: 215-37.
- 254 — Bach F H, van Rood J J. The major histocompatibility complex-genetics and biology. *New England Journal of Medicine* 1976; 295: 806-13.
- 255 — Slade J D, Luskin A T, Gewurz H, Kraft S C, Kirsner J B, Zeitz H J. Inherited deficiency of second component of complement and HLA haplotype A₁₀ B₁₈ associated with inflammatory bowel disease. *Annals of Internal Medicine* 1978; 88: 796-8.

- 256 — Delpre G, Kadish V, Gazit E. HLA typing: an indicator of severity of disease? *Gastroenterology* 1981; 80: 1083-4.
- 257 — Dewolf W C, BoDupont, Yunis E J. HLA and disease: current concepts. *Human Pathology* 1980; 11: 332-6.
- 258 — Siegelbaum S P, Fazio T L, Schwartz S E, Hubbell C, Henry J B. Evidence supporting a genetic pathogenesis for regional enteritis — a prospective familial study (abstract). *Gastroenterology* 1979; 76: 1247.
- 259 — Korsemeyer S J, Williams R C, Wilson I D, Strickland R G. Lymphocytotoxic antibody in inflammatory bowel disease. A family study. *New England Journal of Medicine* 1975; 293: 1117-20.
- 260 — Lennard-Jones J E. Crohn's disease: definition, pathogenesis and aetiology. *Clinics in Gastroenterology* 1980; Suppl 1: 173-89.
- 261 — Kagnoff M F. The gut-associated lymphoid tissue. In *Inflammatory Bowel Disease*, ed. Kirsner J B & Shorter R G. Philadelphia: Lea & Febiger 1980: 71-85.
- 262 — Parrot D M. The gut-associated lymphoid tissues and gastrointestinal immunity. In *Immunological Aspects of the Liver and Gastrointestinal Tract*, ed. Ferguson A & Mac Sween R N. Baltimore, University Park Press 1976: 1-32.
- 263 — Parrot D M. The gut as a lymphoid organ. *Clinics in Gastroenterology* 1976; 5: 211-28.
- 264 — Ferguson A. Progress report. Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. *Gut* 1977; 18: 291-37.
- 265 — Thompson R A. Immunological mechanisms. In *Immunology of the Gastrointestinal Tract*, ed. Asquith P. London, Churchill Livingstone 1979: 14-22.
- 266 — Bienstock J. The physiology of the local immune response. In *Immunology of the Gastrointestinal Tract*, ed. Asquith P. London, Churchill Livingstone 1979: 3-13.
- 267 — Whitehead R, Skinner J M. Morphology of the gut associated lymphoid system in health and disease: a review. *Pathology* 1978; 10: 3-16.
- 268 — Thomas H C, Jewel D P. *Clinical Gastrointestinal Immunology*, Oxford. Blackwell Scientific Publications 1979: 20-37.
- 269 — Clancy R L, Bienstock J. Enteric infection and immunization. In *Immunological Aspects of the Liver and Gastrointestinal Tract*, ed. Ferguson A & MacSween R N, Baltimore, University Park Press 1976: 122-152.

- 270 — Wright R. Immunology of Gastrointestinal and Liver Disease, London. Arnold 1977: 1-15.
- 271 — Walker W, Isselbacher K. Intestinal antibodies. New England Journal of Medicine 1977; 297: 767-73.
- 272 — Nieuwenhuis P. B-cell differentiation in vivo. Immunology today 1981; 104-10.
- 273 — Clancy R, Bienenstock J. Secretion immunoglobulins. Clinics in Gastroenterology 1976; 2: 229-49.
- 274 — Crabbé P A, Heremans J F. The distribution of immunoglobulin-containing cells along the human gastrointestinal tract. Gastroenterology 1966; 51: 305-16.
- 275 — Brandtzaeg, P, Balkien K. Immunoglobulin-producing cells in the intestine in health and disease. Clinics in Gastroenterology 1976; 2: 251-69.
- 276 — Kraft S C, Kirsner J B. Immunological apparatus of the gut and inflammatory bowel disease. Gastroenterology 1971; 60: 922-43.
- 277 — Gelzayd E A, Kraft S C, Fitch F W, Kirsner J B. Distribution of immunoglobulins in human rectal mucosa. II. Ulcerative colitis and abnormal mucosal control subjects. Gastroenterology 1968; 54: 341-7.
- 278 — Brandtzaeg P. Mucosal and glandular distribution of immunoglobulin components. Immunohistochemistry with a cold ethanol-fixation technique. Immunology 1974; 26: 1101-14.
- 279 — Skinner J M, Whitehead. The plasma cells in inflammatory disease of the colon: A quantitative study. Journal of Clinical Pathology 1974; 27: 643-6.
- 280 — Strickland R G, Husby G, Black W C, William R C. Peripheral blood and intestinal lymphocyte sub-populations in Crohn's disease. Gut 1975; 16: 847-53.
- 281 — Crabbé P. Signification du tissu lymphoïde des muqueuses digestives. Bruxelles, Arscia S A, 1967.
- 282 — Balkien K, Brandtzaeg P. Comparative mapping of the local distribution of immunoglobulin-containing cells in ulcerative colitis and Crohn's disease of the colon. Clinical Experimental Immunology 1975; 22: 197-209.
- 283 — Rosekrans P C, Meijer C J, van der Wal A M, Cornelisse C J, Lindeman J. Immunoglobulin containing cells in inflammatory bowel disease of the colon: a morphometric and immunohistochemical study. Gut 1980; 21: 941-7.
- 284 — Soltoft J, Blinder V, Gudmand-Høyer E. Intestinal immunoglobulin in ulcerative colitis. Scandinavian Journal of Gastroenterology 1973; 8: 293-300.

- 285 — Otto H F, Gebbers J O. The local immune response in ulcerative colitis. *Pathology Research Practicien* 1979; 165: 349-64.
- 286 — Mevwissen S G, Feltkamp-Vroom Thea M, Brutel de la Rivière, von den Borne, Tytgat G N. Analysis of the lympho-plasmacytic infiltrate in Crohn's disease with special reference to indentification of lymphocyte-subpopulations. *Gut* 1976; 17: 770-80.
- 287 — Balkien K, Brandtzaeg P. Immunohistochemical characterization of local immunoglobulin formation in Crohn's disease of the ileum. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1976; 11: 447-57.
- 288 — Meijer C J, Bosman F T, Lindeman J. Evidence for predominant involvement of the B-cell system in the inflammatory process in Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1979; 14: 21-32.
- 289 — Otto H F, Gebbers J O. Electron microscopic, ultracytochemical and immunohistological observations in Crohn's disease of the ileum and colon. *Virchows Archives of Pathological Anatomy* 1981; 391: 189-205.
- 290 — Bookman M A, Bull D M. Characteristics of isolated intestinal mucosal lymphoid cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1979; 77: 503-10.
- 291 — Fiocchi C, Battisto J R, Farmer R G. Gut mucosal lymphocytes in inflammatory bowel disease. Isolation and preliminary functional characterization. *Digestive Diseases and Sciences* 1979; 77: 503-10.
- 292 — Eade O F, Andre-Ukena S, Moulton C, Macpherson B, Beeken W L. Lymphocyte subpopulations of intestinal mucosa in inflammatory bowel disease. *Gut* 1980; 21: 675-82.
- 293 — Tomasi T B. Secretory immunoglobulins. *New England Journal of Medicine* 1972; 287: 500-6.
- 294 — Das K M, Erber W F, Rubinstein A. Immunohistochemical changes in morphologically involved and uninvolved colonic mucosa of patients with idiopathic proctitis. *Journal of Clinical Investigations* 1977; 59: 379-85.
- 295 — Brandtzaeg P, Balkien K. Immunohistochemical studies of the formation and epithelial transport of immunoglobulins in normal and diseased human intestinal mucosa. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1976; 11 (suppl 36): 1-45.
- 296 — Strober W, Richman L K, Elson C O. The regulation of gastrointestinal immune response. *Immunology today* 1981; 2: 146-62.
- 297 — Lloyd G, Green F H Y, Fox H, Mani V, Turnberg L A. Mast cells and immunoglobulin E in inflammatory bowel disease. *Gut* 1975; 16: 861-6.

- 298 — Green F H Y, Fox H. The distribution of mucosal antibodies in the bowel of patients with Crohn's disease. *Gut* 1975; 16: 125-31.
- 299 — Brown W R, Borthistle B K, Chen S T. Immunoglobulin E (IgE) and IgE-containing cells in human gastrointestinal fluids and tissues. *Clinical Experimental Immunology* 1975; 20: 227-37.
- 300 — Rosekrans P C M, Meijer C M, van der Wal A M, Linderman J. Allergic proctitis, a clinical and immunopathological entity. *Gut* 1980; 21: 1017-23.
- 301 — O'Donoghue D P, Kumar P. Rectal IgE cells in inflammatory bowel disease. *Gut* 1979; 20: 149-53.
- 302 — Capron M, Capron A, Dessaint J-P, Torpier G, Johansson S G O, Prin L. Fc receptors for IgE on human and rat eosinophils. *Journal of Immunology* 1981; 126: 2087-92.
- 303 — Maryhofer G, Bazin H, Gowan J L. Nature of cells binding anti-IgE in rats immunized with *Nippostrongylus brasiliensis*: IgE in regional nodes and concentration in mucosal mast cells. *European Journal Immunology* 1976; 6: 537-45.
- 304 — Sommers S C. Mast cells and Paneth cells in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1966; 51: 841-51.
- 305 — Sommers S C, Korelitz B I. Mucosal-cell counts in ulcerative colitis and granulomatous colitis. *American Journal of Pathology* 1975; 63: 359-65.
- 306 — Binder V, Hvidberg E. Histamine content of rectal mucosa in ulcerative colitis. *Gut* 1967; 8: 24-8.
- 307 — Wright R, Truelove S C. Circulating and tissue eosinophils in ulcerative colitis. *American Journal of Digestive Disease* 1966; 11: 834-46.
- 308 — Willoughby C P, Piris J, Truelove S C. Tissue eosinophils in ulcerative colitis. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1979; 14: 395-99.
- 309 — Heatley R V, James P D. Eosinophils in the rectal mucosa. *Gut* 1978; 20: 181-91.
- 310 — Heatley R V, Rhodes J, Calcraft B J, Whithead R H, Fifield R, Newcombe R G. Immunoglobulin E in rectal mucosa of patients with proctitis. *Lancet* 1975; 2: 1010-12.
- 311 — Allan R N. Sodium cromoglycate in proctitis and ulcerative colitis. *British Medical Journal* 1982; 284: 70-1.

- 312 — Gebbers J-O, Otto J F. Evidence for local immune complexes in ulcerative colitis. *Acta Gastroenterologica Belgique* 1978; 41: 329-50.
- 313 — Koffer D, Minkowitz S, Rothman W, Garlock J. Immunocytochemical studies in ulcerative colitis and regional ileitis. *American Journal of Pathology* 1962; 41: 733-45.
- 314 — Zeroni J, Perlmann P, Lagercrantz R, Hammarstrom S, Gustaffson R E. Immunological studies in ulcerative colitis. VII. Anticolon antibodies of different immunoglobulin classes. *Clinical and Experimental Immunology* 1970; 7: 469-475.
- 315 — Kohler P F. Clinical immune complex disease. *Medicine* 1973; 52: 419-29.
- 316 — Spector W G, Heesen N. The production of granulomata by antigen-antibody complexes. *Journal of Pathology* 1969; 98: 31-8.
- 317 — Germuth F G, Follack A D. Immune complex disease. III. The granulomatous manifestations. *Johns Hopkins Medical Journal* 1967; 121: 254-62.
- 318 — Chambers T J, Morson B C. The granuloma in Crohn's disease. *Gut* 1979; 20: 269-74.
- 319 — Accinni L, Brentejs J R, Albini B, Ossi E, O'Connell D W, Pawlowski I, Andres G. Deposition of circulating antigen-antibody complexes in the gastrointestinal tract of rabbits with chronic serum sickness. *American Journal of Digestive Diseases* 1978; 23: 1098-106.
- 320 — Weissman I L, Gutman C A, Friedberg S H. Tissue localization of lymphoid cells. *Series Haematologica* 1974; 7: 482-504.
- 321 — Shiner M. Ultrastructural changes suggestive of immune reactions in the jejunal mucosa of coeliac children following gluten challenge. *Gut* 1973; 14: 1-12.
- 322 — Donnellan W L. Early histological changes in ulcerative colitis. A light and electron microscopic study. *Gastroenterology* 1966; 50: 519-40.
- 323 — Dvorak A M, Dickersin G. R. Crohn's disease: transmission electron microscopic studies. I. Barrier function. Possible changes related to alterations of cell coat, mucous coat, epithelial cells, and Paneth cells. *Human Pathology* 1980; 11: 561-71.
- 324 — Turnbull PCB, Richmond J E. A model of salmonella enteritidis in chick intestine studied by light and electron microscopy. *British Journal Experimental Pathology* 1978; 59: 64-75.

- 325 — Austin L L, Dobbins W O III. Intraepithelial leucocytes of the intestinal mucosa in normal man and in Whipple's disease: A light and electron-microscopic study. *Digestive Disease and Sciences* 1982; 27: 311-20.
- 326 — Marsh M N. Studies of intestinal lymphoid tissue. *Gastroenterology* 1980; 79: 481-92.
- 327 — Heatley R V, Bienstock J. Luminal lymphoid cells in the rabbit intestine. *Gastroenterology* 1982; 82: 268-75.
- 328 — Davies M D J, Parrott D M V. Heterogeneity of mucosal cytotoxic T-cell activity. *Immunology* 1981; 44: 367-71.
- 329 — Gebbers J O, Otto H F. Immunohistochemical and electronmicroscopic observations on the local immune response in ulcerative colitis. *Virchows Archives of Pathological Anatomy* 1977; 374: 271-3.
- 330 — Dobbins W O III. Colonic epithelial cells and polymorphonuclear leucocytes in ulcerative colitis. An electron microscopic study. *American Journal of Digestive Diseases* 1975; 20: 236-52.
- 331 — Gebbers J O, Otto H F. Plasma cell alteration in ulcerative colitis. An electron microscopic study. *Pathology European* 1976; 11: 271-9.
- 332 — Lough J, Shuster J. Constipated plasma cells associated with monomeric macroglobulinemia. *Human Pathology* 1975; 6: 251-5.
- 333 — Brown W R. Relationships between immunoglobulins and the intestinal epithelium. *Gastroenterology* 1979; 75: 129-38.
- 334 — Feremans W, Candron M, Bieva C. A case of 3 heavy chain disease with vacuolated plasma cells: a clinical, immunological, and ultrastructural study. *Journal of Clinical Pathology* 1979; 32: 334-43.
- 335 — Shiner M. Malignant potential of intestinal plasma cells in alpha-chain disease. *Lancet* 1979; 1: 156-7.
- 336 — Tavela Veloso F, Saleiro J V. Atypical plasma cells in alpha-chain disease. *Cancer*, in press.
- 337 — Ghadially F N. Ultrastructural pathology of the cell. Butterworths, London. 1977: 222-54.
- 338 — Dvorak A M, Monahan R A, Osage J E, Dickersin G R. Mast cell degranulation in Crohn's disease. *Lancet* 1978; 1: 498.

- 339 — Levo K, Livini N. Mast-cell degranulation in Crohn's disease. *Lancet* 1978; 2: 1262.
- 340 — Dvorak A M, Monahan R A, Osage J E, Dickersin G R. Crohn's disease: Transmission electron microscopic studies. II Immunologic inflammatory response. Alterations of mast cells, basophils, eosinophils, and the microvasculature. *Human Pathology* 1980; 11: 606-19.
- 341 — Kraft S C, Kirsner J B. Mast cells and the gastrointestinal tract. *Gastroenterology* 1960; 39: 764-70.
- 342 — Rånlöf P, Nielson M H, Wanstrup J. Ultrastructure of the ileum in Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1972; 7: 471-76.
- 343 — Rao S N. Mast cells as a component of the granuloma in Crohn's disease. *Journal of Pathology* 1973; 109: 79-82.
- 344 — Alvwihare A P R. Electron microscopy in Crohn's disease. *Gut* 1971; 12: 509-18.
- 345 — Alvwihare A P R. The electron microscope and Crohn's disease. *Clinics in Gastroenterology* 1972; 1: 279-294.
- 346 — Tytgat G N. Electronmicroscopy in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1981; 80: 1306.
- 347 — Bladassare A R, Weiss T D, Tsai C C. Immunoprotein deposition in synovial tissue in Reiter's syndrome. *Annals of Rheumatic Diseases*. 1981; 40/3: 281-5.
- 348 — Fyrand O, Mellbye O J, Natvig J B. Immunofluorescence studies for immunoglobulins and complement C₃ in synovial joint membranes in psoriatic arthritis. *Clinical Experimental Immunology* 1977; 29: 422-7.
- 349 — Bronomo L, Tursi A, Gillardi V, Dammasco F. Études de l'immunofluorescence des immunocomplexes dans la synovite rhumatoïde. In: *Proceedings of the International Symposium on Immune Complex Diseases* (Bronomo L, Turk J L, Ed). Carlo Erba Foundation, Milan 1970; 81-7.
- 350 — Crama-Bohbouth G, Bosman F T, Weterman F T, Weterman I T, van der Wal A M, Peña A S. Immunoglobulin-containing plasma cells in lip biopsy specimens of patients with Crohn's disease and controls. *Proceeding VII World Congress of Gastroenterology*. Stockholm 1982; 446.
- 351 — Harrist T J, Milm M C. Cutaneous immunopathology. The diagnostic use of direct and indirect immunofluorescence techniques in dermatologic disease. *Human Pathology* 1979; 10: 625-53.
- 352 — Dantzig P I. Pyoderma gangrenosum. *New England Journal of Medicine* 1975; 292: 47-8.

ÍNDICE

	Págs.
INTRODUÇÃO	13
MATERIAL E MÉTODOS	21
<i>Crítérios de diagnóstico clínico</i>	23
Doença de Crohn	23
Colite ulcerosa	24
Manifestações sistêmicas	24
<i>Estudo analítico</i>	25
<i>Estudo morfológico</i>	25
Imunofluorescência	26
Ultrastrutura	27
RESULTADOS	29
<i>Estudo clínico</i>	31
Doentes com doença de Crohn	31
Doentes com colite ulcerosa	37
Doentes com complicações extra-intestinais	41
<i>Estudo Imunológico</i>	51
Imunoglobulinas séricas	51
Linfócitos B no sangue	55
Complemento no sangue e líquido sinovial	53
Complexos imunológicos circulantes	56
Antígeno de histocompatibilidade	56

	Págs.
<i>Estudo morfológico</i>	59
Contagem de células que contêm IgA, IgM e IgG na mucosa rectal	59
Contagem de células IgE na mucosa rectal	62
Depósitos de imunoglobulinas e complemento na mucosa rectal	65
Depósitos de imunoglobulinas e complemento nas lesões extra-intestinais	65
Estudo ultrastrutural na mucosa rectal	65
 DISCUSSÃO	 69
<i>Manifestações sistêmicas</i>	71
<i>Imunopatogénese das manifestações extra-intestinais</i>	79
 CONCLUSÃO	 99
 SUMMARY AND CONCLUSIONS	 107
 BIBLIOGRAFIA	 115

Composição e impressão de
Rocha / Artes Gráficas
Vila Nova de Gaia