

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIA APARECIDA ALVES LEITE DOS SANTOS ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA CALPROTECTINA E DOS ANTICORPOS ANTI-CITOPLASMA  
DE NEUTRÓFILOS COMO MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E  
AUTOIMUNIDADE NAS DIFERENTES FASES DA DOENÇA DE KAWASAKI**

BRASÍLIA

2017

MARIA APARECIDA ALVES LEITE DOS SANTOS ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DA CALPROTECTINA E DOS ANTICORPOS ANTI-CITOPLASMA DE  
NEUTRÓFILOS COMO MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E AUTOIMUNIDADE  
NAS DIFERENTES FASES DA DOENÇA DE KAWASAKI.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega  
Co-orientador: Prof. Dr. Riccardo Pratesi

BRASÍLIA

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

#### Catálogo da Publicação

Aa            Alves Leite dos Santos Almeida, Maria Aparecida  
                 AVALIAÇÃO DA CALPROTECTINA E DOS ANTICORPOS ANTI  
                 CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS COMO MARCADORES DE  
                 INFLAMAÇÃO E AUTOIMUNIDADE NAS DIFERENTES FASES DA  
                 DOENÇA DE KAWASAKI / Maria Aparecida Alves Leite dos  
                 Santos Almeida; orientador Yanna Karla de Medeiros  
                 Nóbrega; co-orientador Riccardo Pratesi. -- Brasília,  
                 2017.  
                 p.

                 Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências  
                 Farmacêuticas) -- Universidade de Brasília, 2017.

                 1. Doença de Kawasaki. 2. Calprotectina. 3.  
                 Biomarcador. 4. Anticorpos anti-citoplasma de  
                 neutrófilo. I. de Medeiros Nóbrega, Yanna Karla,  
                 orient. II. Pratesi, Riccardo, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente, com dados  
fornecidos pelo autor.

**MARIA APARECIDA ALVES LEITE DOS SANTOS ALMEIDA**

**AVALIAÇÃO DA CALPROTECTINA E DOS ANTICORPOS ANTI-CITOPLASMA  
DE NEUTRÓFILOS COMO MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E  
AUTOIMUNIDADE NAS DIFERENTES FASES DA DOENÇA DE KAWASAKI**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 20 de Fevereiro de 2017

**BANCA EXAMINADORA**

PRESIDENTE:

---

Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega  
Membro Interno do Programa Universidade de Brasília

MEMBROS:

---

Profa. Dra. Cristina Medeiros Ribeiro de Magalhães  
Membro Externo do Programa Universidade de Brasília

---

Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello  
Membro Interno do Programa Universidade de Brasília

SUPLENTE:

---

Prof. Dr. Luiz Cláudio Gonçalves de Castro  
Membro Interno do Programa Universidade de Brasília

*Dedico este trabalho a Deus, meus familiares e aos meus amigos, cujo apoio reflete em cada uma das minhas realizações.*

## AGRADECIMENTOS

Foi um longo caminho percorrido. Nada foi fácil, nem tampouco tranquilo. “A sola do pé conhece toda a sujeira da estrada” (provérbio africano). Quero agradecer a todos aqueles que sempre confiaram em mim, desde sempre.

A Deus por ter me dado forças, sabedoria e ter colocado em meu caminho pessoas essenciais para que eu superasse os obstáculos e chegasse até aqui.

A minha família, especialmente meu esposo Alexandre e minha filha Maria Eduarda, por me apoiarem e serem sempre meu porto seguro. Meus pais por me apoiarem em minhas decisões, mesmo não entendendo algumas delas.

A minha amiga e orientadora Profa. Dra. Yanna, exemplo profissional, obrigada por acreditar em mim e ter me permitido fazer parte da sua família. Por não ter permitido que eu interrompesse o mestrado, essa história não teria o mesmo fim se eu não a tivesse encontrado. Obrigada pelo aprendizado de todos os dias, isto é realmente intangível. Quando ‘crescer’, eu quero ser como você.

Ao Prof. Dr. Pratesi, que sem dúvida alguma, já é parte da minha família também. Obrigada pelo apoio incondicional sempre. Por todo ensinamento, paciência e compreensão. Pela dedicação em me ajudar com este trabalho. Eu tenho grandes exemplos de vida, ele com certeza é um deles. Obrigada professor!

Aos professores Lenora e Luiz Cláudio, por todo apoio.

As minhas amigas Adriana e Cristina, por estarem sempre ao meu lado em todas as circunstâncias durante esta jornada na UnB.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório Interdisciplinar de Biociências, especialmente Zita, Isabela e Nicole, que acompanharam de perto este trabalho. Obrigado pela colaboração e paciência.

E a CAPES, pela o suporte técnico e financeiro, o qual proporcionou a realização deste trabalho

“E aprendi que se depende sempre  
De tanta, muita, diferente gente  
Toda pessoa sempre é as marcas  
das lições diárias de outras tantas pessoas.  
É tão bonito quando a gente entende  
Que a gente é tanta gente  
Onde quer que a gente vá.  
É tão bonito quando a gente sente  
Que nunca está sozinho  
Por mais que pense estar...”  
(Caminhos do coração – Gonzaguinha.)

## RESUMO

**ALMEIDA, Maria Aparecida Alves Leite dos Santos.** AVALIAÇÃO DA CALPROTECTINA E DOS ANTICORPOS ANTI-CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS COMO MARCADORES DE INFLAMAÇÃO E AUTOIMUNIDADE NAS DIFERENTES FASES DA DOENÇA DE KAWASAKI. Brasília, 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

A Doença de Kawasaki (DK) é uma vasculite sistêmica e autolimitada de etiologia ainda desconhecida que incide predominantemente em lactentes e crianças. Seu principal alvo são as artérias coronárias e outras estruturas cardiovasculares sendo que 20-25 % dos pacientes não tratados desenvolvem alterações dessas artérias que evoluem para dilatações e aneurismas. Pacientes que apresentaram anormalidades coronarianas podem apresentar anormalidades vasculares meses ou anos após o início da doença o que leva a pressupor possível continuidade do processo inflamatório. Como marcadores de inflamação são pouco estudados na DK, o objetivo da pesquisa foi determinar os níveis séricos de um biomarcador de inflamação, a calprotectina e a presença de anticorpos anti-citoplasma de neutrófilo, marcador de autoimunidade, em crianças com história de doença de Kawasaki, nas diferentes fases da doença (aguda, de convalescença e crônica). A calprotectina sérica foi analisada pelo método de ELISA, utilizando dois diferentes ensaios comerciais e a presença de anticorpos anti-citoplasma de neutrófilo foi detectada pelo método de imunofluorescência indireta. Os níveis de calprotectina sérica mostram-se aumentados nas três diferentes fases da DK, quando comparados aos controles. Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilo estavam presentes em 25 % das crianças na fase aguda. Nas fases de convalescença e crônica sua presença variou entre 45 e 50 %. A calprotectina revelou-se um bom marcador de inflamação nas diferentes fases da DK, confirmando a persistência do processo inflamatório por longo período após o evento agudo inicial, e a presença de anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos sugerem um possível mecanismo autoimune ambos influenciados pela participação dos neutrófilos na doença.

**Palavras-chave:** Doença de Kawasaki, Calprotectina, Biomarcador, Anticorpos Anti-Citoplasma de Neutrófilos

## ABSTRACT

**ALMEIDA, Maria Aparecida Alves Leite dos Santos.** EVALUATION OF CALPROTECTIN AND ANTIBODIES ANTICITOPLASMA OF NEUTROPHILS AS INFLAMMATION AND AUTOIMUNITY MARKERS IN THE DIFFERENT PHASES OF KAWASAKI DISEASE. Brasília, 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

Kawasaki disease (DK) is a systemic, self-limiting vasculitis of unknown etiology that predominantly affects infants and children. Its main targets are the coronary arteries and other cardiovascular structures. It is said that 20-25 % of untreated patients develop coronary artery abnormalities, mainly dilations and aneurysms. These patients may still show vascular abnormalities several months or even years after the onset of the disease which leads to the assumption of a possible persistence of the inflammatory process. As markers of inflammation are poorly studied in DK, the objective of this study was to determine the serum levels of a biomarker of inflammation, calprotectin and the presence of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies, a marker of autoimmunity, in children with a history of Kawasaki disease and additionally, investigate for the possible presence of anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. Results: Serum calprotectin levels were increased in the three different phases of DK in all patients when compared to controls. Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies were present in 25 % of children in the acute phase. In the convalescence and chronic phases its presence varied between 45 and 50 %. Calprotectin proved to be a good marker of inflammation in the different phases of DK, confirming the persistence of the inflammatory process for a long period after the initial acute event.

**Key-words:** Kawasaki disease, calprotectin, biomarker, anti-neutrophil cytoplasmic antibodies

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1- Desenho esquemático da estrutura da parede vascular normal.....</b>	<b>4</b>
<b>Figura 2 – Principais manifestações clínicas da DK (a) descamação periungueal dos dedos das mãos (b) Exantema polimorfo (c) Alterações em lábios e cavidade bucal (d) língua em framboesa (e) rachaduras em lábios .....</b>	<b>6</b>
<b>Figura 3 – Aneurisma da artéria coronária esquerda em paciente com doença de Kawasaki. Cx: artéria circunflexa, Di: artéria diagonal, IVA: anterior Artéria INTERVENTRICULAR.....</b>	<b>7</b>
<b>Figura 4 – Padrão de ANCA por imunofluorescência indireta em neutrófilos humanos</b>	<b>19</b>
<b>Figura 5- Resultados da calprotectina com o kit INOVA nas fases aguda, convalescença e crônica da DK e do grupo controle .....</b>	<b>22</b>
<b>Figura 6 - Resultados da calprotectina com o kit Euroimmun nas fases aguda, convalescença e crônica da DK e do grupo controle .....</b>	<b>23</b>
<b>Figura 7 - Resultados da calprotectina com o kit INOVA nas fases aguda, convalescença e crônica da DK e do grupo controle dividido por sexo .....</b>	<b>25</b>
<b>Figura 8 - Resultados da calprotectina com o kit Euroimmun nas fases aguda, convalescença e crônica da DK e do grupo controle dividido por sexo .....</b>	<b>26</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-Resultados da dosagem sérica de Calprotectina (ng/mL) nos grupos portadores de DK e controle através dos kits INOVA e Euroimmun .....</b>	<b>21</b>
<b>Tabela 2 - Características gerais da população que a CP foi quantificada.....</b>	<b>24</b>
<b>Tabela 3 - Presença de Anticorpos Anti-citoplasma de Neutrófilos na fase aguda, convalescença e crônica.....</b>	<b>27</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido Acetilsalicílico
ANCA	Anticorpos Anti-Citoplasma de Neutrófilos
ASO	Antiestreptolisina O
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CKMB	Isoenzima MB da Creatina Quinase
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CPK	Creatina Fosfoquinase
DAMPs	<i>Damage Associated Molecular Patterns</i>
DK	Doença de Kawasaki
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FEPECS	Comitê de Ética da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde
FITC	Isotiociantao de Fluoresceína
HUB	Hospital Universitário de Brasília
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IFI	Imunofluorescência Indireta
IGIV	Imunoglobulina Intravenosa
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PCR	Proteína C Reativa
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation Endproducts</i>
SES-DF	Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TOLL 4	<i>Toll-Like Receptor 4 – TLR4</i>
ULAC	Laboratório de Análises Clínicas
VCAM-1	Molécula de Adesão Celular Vascular-1
VHS	Velocidade de Hemossedimentação

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Epidemiologia</b>	<b>2</b>
<b>1.2 Etiologia</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Patologia</b>	<b>3</b>
<b>1.4 Diagnóstico</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Tratamento</b>	<b>8</b>
<b>1.6 Calprotectina</b>	<b>9</b>
<i>1.6.1. Dosagem sorológica de Calprotectina</i>	<b>11</b>
<b>1.7 Anticorpos Anti-Citoplasma de Neutrófilos (ANCA)</b>	<b>12</b>
<b>2. OBJETIVO</b>	<b>13</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODO</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Pacientes</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Metodologia de ELISA</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Método ELISA direto</b>	<b>15</b>
<i>3.2.1. Dosagem de Calprotectina por ELISA direto</i>	<b>16</b>
<b>3.3 Metodologia de Imunofluorescência</b>	<b>17</b>
<i>3.3.1. Imunofluorescência indireta</i>	<b>18</b>
<i>3.3.2. Pesquisa de Anticorpos Anti-citoplasma de Neutrófilos (ANCA) por Imunofluorescência indireta</i>	<b>18</b>
<b>3.4 Análise estatística</b>	<b>20</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>21</b>
<b>4.1. Dosagem de Calprotectina</b>	<b>21</b>
<b>4.2. Dosagem de CP por fase da DK empregando kit INOVA</b>	<b>21</b>
<b>4.3. Dosagem de CP por fase da DK empregando kit Euroimmun</b>	<b>22</b>
<b>4.4. Distribuição por sexo, faixa etária e fases da DK</b>	<b>23</b>
<b>4.5. Comparação por sexo e fase da DK empregando kit INOVA</b>	<b>24</b>
<b>4.6. Comparação por sexo e fase da DK empregando kit Euroimmun</b>	<b>25</b>
<b>4.7. Resultados da Pesquisa de Anticorpos Anti-citoplasma de Neutrófilos (ANCA)</b>	<b>26</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>28</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>33</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Kawasaki (DK) é uma vasculite sistêmica e autolimitada de etiologia ainda desconhecida que afeta predominantemente lactentes e crianças (NEWBURGER et al., 2016). Esta doença é caracterizada clinicamente por febre alta persistente, hiperemia conjuntival bilateral, alterações na mucosa da orofaringe, exantema eritematoso, inflamação mucocutânea, e linfadenopatia cervical. Apesar do caráter sistêmico da DK o seu principal alvo são as artérias coronárias e outras estruturas cardiovasculares (KAWASAKI, 2006; NEWBURGER et al., 2016).

Conquanto a DK seja autolimitada, aproximadamente 20-25 % dos pacientes não tratados na fase aguda da doença desenvolvem alterações das artérias coronárias, que podem manifestar-se de forma assintomática ou evoluir para dilatações e aneurismas eventualmente associados a trombose, infarto do miocárdio e, mais raramente à morte súbita (KAWASAKI, 2006).

A DK foi relatada pela primeira vez em 1967 por Tomisaku Kawasaki e apesar dos avanços significativos obtidos na caracterização clínica, fisiopatológica e epidemiológica da doença, sua etiologia, fisiopatologia e os mecanismos subjacentes à eficácia terapêutica da gamaglobulina intravenosa na redução da formação de aneurismas das artérias coronárias permanecem infelizmente ainda desconhecidos (BURNS, 2002).

A história natural das lesões coronarianas na DK fornece amplas evidências que um processo patológico ativo contínua após o declínio dos sintomas agudos. De acordo com estudos funcionais e histopatológicos, até uma artéria coronária aparentemente normal sem histórico de dilatações, pode vir a apresentar variável grau de espessamento da túnica íntima da artéria, mesmo anos depois da eclosão da doença. Adicionalmente aneurismas, que regrediram após a fase aguda podem evoluir para expressivo espessamento da íntima associado a estreitamento do lúmen, com ou sem a presença de calcificações (SUZUKI et al., 1996).

Por essas razões, cresce a importância de buscar efetivos marcadores de inflamação e de autoimunidade, que permitam nortear eventuais mecanismos fisiopatológicos desconhecidos da doença, que eventualmente possam melhorar a conduta clínica e o acompanhamento eficaz de crianças com DK tanto na fase aguda e subaguda, convalescente ou crônica, quanto durante os anos seguintes por meio do monitoramento empregando biomarcadores sorológicos.

## **1.1 Epidemiologia**

Esta doença tem uma distribuição mundial, tendo sido observada com padrões epidemiológicos bastante distintos nos vários continentes e grupos étnicos. Nos Estados Unidos, Austrália e Europa, a incidência varia entre 4 e 25/100.000, em crianças com menos de cinco anos, com nítidas diferenças nos vários grupos étnicos. Países do nordeste asiático, notavelmente o Japão, Coreia e Taiwan apresentaram incidência 10 a 20 vezes maior do que à encontrada nos Estados Unidos e Europa, sendo que esta incidência continua em ascensão nesses países (SINGH; VIGNESH; BURGNER, 2015). A incidência anual no Japão em crianças menores de 5 anos é de 265/100.000, com aproximadamente 14.000 casos relatados em 2012 (MAKINO et al., 2015).

É de interesse notar que embora quase todos os estudos relatem a incidência em grupos de crianças menores de cinco anos, ainda há uma parcela significativa de crianças que contrai a doença na idade escolar, sendo conseqüentemente o agravo desta afecção bem maior (MANLHIOT et al., 2009)

No Brasil, como também em outros países em desenvolvimento, a incidência da DK é ainda desconhecida, mas é muito provavelmente subdiagnosticada, sendo frequentemente confundida com outras doenças exantemáticas da infância (MAGALHAES et al., 2009). Nestes países, mesmo um modesto aumento do DK pode ter profundas implicações devido à sobrecarga imposta aos serviços de saúde já assoberbados, tanto pelo atendimento de crianças agudamente doentes como pelo acompanhamento de adultos com sequelas coronarianas secundárias à doença.

Embora dados estatísticos sobre a doença sejam escassos e com poucas publicações científicas disponíveis, sabe-se que a DK está associada a aneurismas das artérias coronárias em cerca de 25 % dos casos, com uma taxa mundial de letalidade entre 0,5 a 2,8 % (FAUCI; LANGFORD, 2014).

## **1.2 Etiologia**

Após 50 anos da primeira descrição da doença, a etiologia da DK ainda permanece desconhecida. As características clínicas e epidemiológicas da DK sugerem uma provável causa infecciosa, que produziria uma intensa ativação do sistema imune em hospedeiros geneticamente predispostos. Apesar de, até o presente momento nenhum agente infeccioso ter

sido identificado, vários fatores apontam para uma provável causa infecciosa da DK (BURNS et al., 2013).

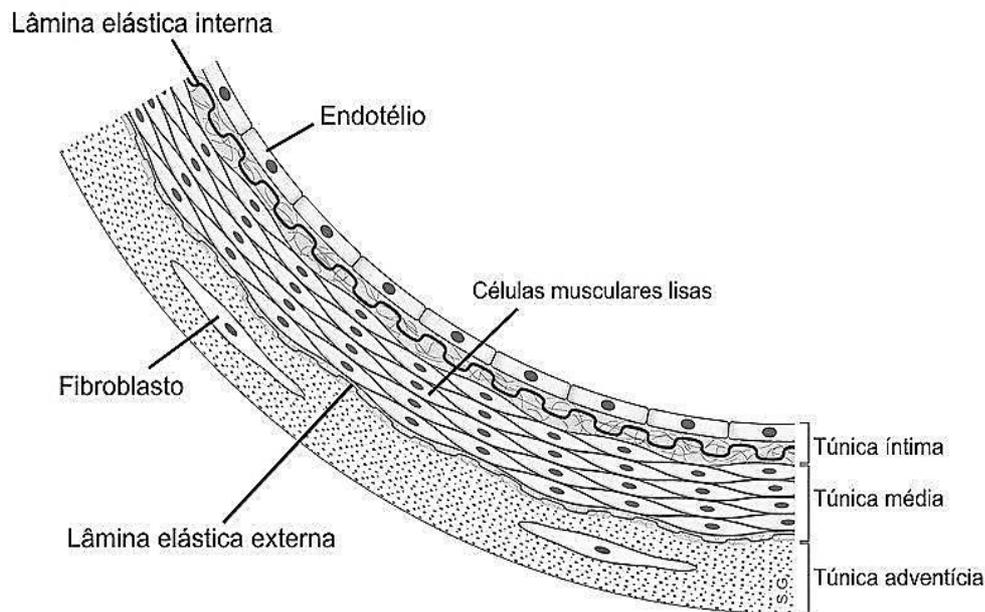
Dentre estes fatores são citados sua característica sazonal, incidindo em países temperados mais frequentemente no inverno e na primavera, (BURNS et al., 2013), a eclosão de eventuais epidemias, tais como as relatadas no Japão, Estados Unidos, Canadá e Finlândia (UEHARA; BELAY, 2012) e finalmente, a baixa incidência durante os três primeiros meses de idade, o que sugere a presença de uma relativa proteção por anticorpos maternos (NOMURA et al., 2002).

Adicionalmente, sua incidência diminuída após os 4 anos de idade sugere que a presença de agente infeccioso para o qual crianças maiores já tenham adquirido resposta imune, sem ter desenvolvido uma afecção sintomática (BURGNER & HARNDEN, 2005). Alguns pesquisadores sugerem ainda a hipótese que agentes microbianos, ou fungos, ou eventualmente toxinas ambientais poderiam ser distribuídos em grandes áreas por ventos troposféricos, o que poderia explicar a flutuação sazonal e a eclosão de endemias da doença em determinadas regiões (RODÓ et al., 2014). Portanto, apesar da similaridade clínica da DK com doenças mediadas por toxinas, tais como a escarlatina e a síndrome do choque tóxico, até o momento não foi possível isolar nenhuma bactéria ou toxina bacteriana, nenhum vírus ou mesmo algum tipo de superantígeno como possível responsável por sua etiologia (MEISSNER, H CODY, LEUNG, 2000).

### **1.3 Patologia**

A DK é uma vasculite sistêmica generalizada e, embora as artérias coronárias sejam preferencialmente afetadas, eventualmente outros vasos sanguíneos podem ser comprometidos em sua estrutura anatômica (Figura 1). Assim sendo, aneurismas podem aparecer não tão somente em artérias coronárias, mas também em outras artérias musculares, como as artérias celíaca, mesentérica, femoral, ilíaca, renal, axilar e braquial (NEWBURGER et al., 2004).

Nos estágios iniciais da arterite a túnica média dos vasos afetados apresentam dissociação edematosa das células da musculatura lisa. Aparece um edema das células endoteliais e subendotelial, mas a lâmina elástica interna permanece intacta. Sete a nove dias após o início do processo há um progressivo influxo de neutrófilos com rápida transição para células mononucleares, em associação com linfócitos e células plasmáticas (NEWBURGER et al., 2004).



**Figura 1- Desenho esquemático da estrutura da parede vascular normal**

Fonte: <http://nutrisdoexercicio.wordpress.com/2013/05/23/aterosclerose-e-funcao-endotelial/>

A enzima elastase liberada pelos neutrófilos, pode contribuir para a fragilização da parede do vasos facilitando a formação de aneurismas (NEWBURGER; TAKAHASHI; BURNS, 2016). Destruição da lâmina elástica interna e progressiva infiltração por miofibroblastos ocorre durante esta fase. Inicia-se a seguir um processo de remodelação, com grande atividade das metaloproteínas. Após semanas ou meses o processo inflamatório ativo atenua-se progressivamente e é substituído por cicatrização e fibrose (NEWBURGER et al., 2004).

A infiltração da túnica íntima por miofibroblastos, possivelmente provenientes de células musculares da túnica média, pode continuar por meses ou anos. Este processo patológico é provavelmente mediado pelo fator de transformação de crescimento beta (TGF $\beta$  - *Transforming Growth Factor Beta*) (SHIMIZU et al., 2013). A infiltração da íntima pelos miofibroblastos pode resultar em processo crônico de estreitamento e recanalização das artérias coronárias, com conseqüente variável grau de isquemia do miocárdio (ORENSTEIN et al., 2012).

É importante notar que a descrição da patologia vascular e miocárdica conseqüente à DK é principalmente baseada na descrição histológica de pacientes mais graves, que foram ao óbito em decorrência das complicações da doença. Pacientes com história de DK, que morreram de causas não relacionada à doença, não tem sido sistematicamente estudados.

Esses dados são importantes para poder prover aconselhamento apropriado aos pacientes quanto às possíveis futuras complicações da doença (NEWBURGER; TAKAHASHI; BURNS, 2016).

#### **1.4 Diagnóstico**

O diagnóstico da DK é basicamente clínico desde que não existe teste ou marcador laboratorial específico para esta doença. O diagnóstico clínico não é fácil, especialmente durante as fases iniciais da doença e frequentemente as crianças são diagnosticadas erroneamente ou tardiamente após terem passado por vários profissionais de saúde. Em estudo efetuado no Brasil somente pouco mais de 20 % das crianças com KD referidas a unidade especializada de hospital terciário tinham sido apropriadamente diagnosticadas (MAGALHAES et al., 2009).

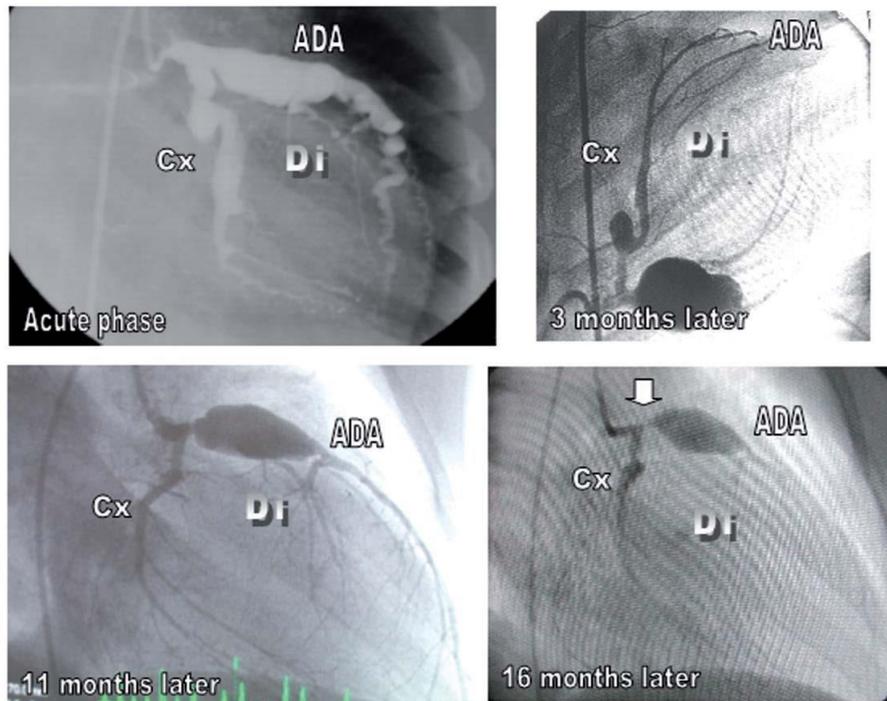
Várias doenças podem eclodir com sintomas e sinais similares e precisam ser consideradas no diagnóstico diferencial. As mais frequentes causas de diagnóstico errôneo são doenças virais exantemáticas da infância, escarlatina, síndrome do choque tóxico, linfadenopatia cervical bacteriana, reações de hipersensibilidade a medicamentos, síndrome de Stevens-Johnson e reação à hipersensibilidade ao mercúrio (acrodinia) (LANG, 2001).

Classicamente o diagnóstico da DK baseia-se na presença de um período  $\geq 5$  dias de febre e pelo menos quatro das principais manifestações clínicas. A febre é geralmente alta e remitente, com picos de temperatura entre 39 e 40 °C. Na ausência de instituição de terapia apropriada a febre persiste por 11 dias em média, usualmente diminuindo após a administração de gamaglobulina intravenosa. As manifestações clínicas principais da DK (Figura 1) são as descritas pela *American Academy of Pediatrics and American Heart Association* : Alterações em extremidades (na fase aguda: eritema das palmas das mãos e da planta dos pés e edema das mãos e pés; na fase subaguda: descamação periungueal dos dedos das mãos e pés que aparece na segunda ou terceira semana de doença); Exantema polimorfo; Conjuntivite bilateral sem exudato; Alterações em lábios e cavidade bucal: eritema e edema da orofaringe, língua em framboesa, fissuras em lábios e linfadenopatia cervical: (com diâmetro  $\geq 1.5$  cm, usualmente unilateral) (NEWBURGER et al., 2004).



**Figura 2 – Principais manifestações clínicas da DK (a) descamação periungueal dos dedos das mãos (b) Exantema polimorfo (c) Alterações em lábios e cavidade bucal (d) língua em framboesa (e) rachaduras em lábios(imagens gentilmente cedidas pela Profª Drª Cristina Magalhães)**

O ecocardiograma é a principal ferramenta de avaliação na fase aguda. No entanto, apesar de que um ecocardiograma anormal ser um suporte importante para o diagnóstico de DK, um exame normal não exclui seu diagnóstico. Um ecocardiograma normal durante a primeira semana não exclui a possibilidade de posterior aparecimento de dilatações ou aneurismas coronarianos (Figura 2). É conseqüentemente importante repetir a ecocardiografia após uma a duas semanas e idealmente após a quarta e sexta semana após o início do tratamento (NEWBURGER; TAKAHASHI; BURNS, 2016).



**Figura 3 – Aneurisma da artéria coronária esquerda em paciente com doença de Kawasaki. Cx: artéria circunflexa, Di: artéria diagonal, IVA: anterior Artéria INTERVENTRICULAR (Fonte: ATIK 2007)**

Legenda: Com redução após 3 meses, mas com aneurisma remanescente na artéria interventricular anterior após 11 e 16 meses

As medidas ecocardiográficas das dimensões internas dos segmentos proximais das coronárias são normatizadas com base em escores Z, ajustados à superfície corporal. Anormalidades das artérias coronárias são consideradas pequenas se os escores Z são  $\geq 2.5$  a  $< 5$ , médias se  $\geq 5$  a  $< 10$  e grandes se  $\geq 10$  (MANLHIOT et al., 2010).

Exames laboratoriais, apesar de não específicos, podem ser usados como auxiliares na suspeita clínica, no diagnóstico diferencial e para avaliar a intensidade do processo inflamatório. Durante a fase aguda o hemograma tipicamente revela leucocitose com predominância de formas maduras e imaturas de granulócitos. Aproximadamente 50 % dos pacientes apresentam leucograma com  $> 15.000$  células, a leucopenia é rara, eventualmente anemia pode estar presente. Elevação da velocidade de hemossedimentação (VHS) e da proteína C reativa (PCR) é praticamente constante, geralmente normalizando-se de 6 a 10 semanas após o início da doença. Trombocitose com contagem plaquetária de  $500.000$  a  $> 1.000.000/\text{mm}^3$ , raramente presente na primeira semana, é característica importante a partir da segunda, retornando ao normal entre a quarta e oitava semana em casos não complicados (NEWBURGER et al., 2004).

A experiência clínica sugere que a DK é improvável se indicadores inflamatórios de fase aguda (VHS e PCR) e contagem plaquetária estão normais após o sétimo dia de doença. Adicionalmente, contagem leucocitária baixa, predominância de linfócitos e plaquetopenia na ausência de coagulação intravascular disseminada sugerem etiologia viral (NEWBURGER et al., 2004).

## **1.5 Tratamento**

### *1.5.1. Gama imunoglobulina intravenosa*

A infusão de uma única dose de 2 g/kg de gama imunoglobulina intravenosa (IGIV) dentro dos 10 primeiros dias de doença continua sendo a principal intervenção terapêutica na DK aguda. Os autores são praticamente unânimes em asseverar que a aplicação da IGIV reduz o risco de lesões das artérias coronárias de 20-25 % para 2-4 % (NEWBURGER, et al., 1991). A IGIV deverá ser administrada mesmo se passados 10 ou mais dias após o início da doença se a febre e sinais de inflamação persistirem, apesar de que o prognóstico será pior com a maior demora na administração da IGIV (BURNS, 2001). O mecanismo de ação da IGIV na DK não foi ainda esclarecido. Possíveis efeitos incluem a neutralização de toxinas bacterianas, atenuação da resposta imune e da ativação endotelial.

Aproximadamente 10-15 % dos pacientes com DK apresentam febre persistente ou recorrente após a infusão inicial de IGIV e requerem tratamento adicional (FREEMAN & SHULMAN, 2004). Vários fatores de risco foram associados à falta de resposta à IGIV, incluindo início de tratamento com IGIV antes do quinto dia de doença, recorrência da DK, sexo masculino, diminuição acentuada do número de plaquetas e aumento significativo da PCR. Paciente não responsivos à primeira infusão de IVIG apresentam risco aumentado de aneurismas de artéria coronária, especialmente de aneurismas gigantes (UEHARA et al, 2008). Nesses pacientes recomenda-se uma dose adicional de 2 g/kg IVIG, embora esta conduta seja mais baseada em recomendações de especialistas do que em dados de ensaios clínicos (NEWBURGER et al., 2004).

### *1.5.2. Ácido Acetilsalicílico*

O ácido acetilsalicílico (AAS) tem sido usado no tratamento coadjuvante da DK por muitos anos. Não obstante suas propriedades anti-inflamatórias (em altas doses) e

antiplaquetárias (em doses baixas), o AAS não parece ter sido capaz de aumentar o número de casos responsivos à infusão de IGIV, diminuir o período de febre ou baixar a frequência de anormalidades coronarianas. Apesar dessas observações o uso da aspirina no tratamento da DK continua sendo uma prática amplamente aceita (DURONGPISITKUL K, GURURAJ VJ, PARK JM, 1995).

### *1.5.3. Esteroides*

Os esteroides têm sido amplamente usados, com bons resultados, no tratamento de vasculites em geral e, conseqüentemente foram também incluídos no tratamento da DK, apesar de seu uso rotineiro ser ainda controverso. Rigoroso ensaio controlado prospectivo, efetuado nos Estados Unidos (NEWBURGER et al., 2007) asseverou que os esteroides não teriam apresentado benefício adicional no tratamento inicial da DK, quando usados como adjuvantes à infusão de IGIV em pacientes não selecionados. No entanto, recente metanálise comprovou que o uso concomitante dos esteroides à infusão de IGIV melhorou a evolução clínica dos pacientes e reduziu a frequência de casos resistentes ao tratamento (ZHU et al., 2012).

### *1.5.4. Bloqueadores do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )*

Anticorpos bloqueadores de fator de necrose tumoral (*tumor necrosis fator alpha* – TNF- $\alpha$ ) tem sido também usados com relativo sucesso no tratamento da DK. Amplo estudo multicêntrico demonstrou que tanto o infliximabe, um anticorpo monoclonal antagonista do TNF- $\alpha$ , como uma segunda infusão de IGIV foram bem tolerados, não apresentando resultados adversos graves (BURNS et al., 2010). Similarmente, etanercepte, um antagonista do receptor de TNF- $\alpha$  reduziu eficientemente a febre em casos resistentes à infusão de IGIV, sem maiores efeitos adversos (CHOUEITER et al., 2010).

## **1.6 Calprotectina**

É um marcador laboratorial amplamente reconhecido para inflamação, seja aguda ou crônica, seja localizada ou sistêmica, que afeta adversamente o estado geral do indivíduo. Além das infecções agudas, a inflamação tem sido frequentemente identificada como sendo uma das causas de uma série de doenças crônicas que afetam a população globalmente.

Conseqüentemente a existência de um biomarcador confiável que pudesse ser detectado no soro, plasma, urina ou mesmo fezes diminuiria a necessidade de procedimentos mais invasivos, utilizados no acompanhamento de pacientes portadores de processos inflamatórios (STRÍŽ; TREBICHAVSKÝ, 2004).

Os marcadores de inflamação sistêmica correntemente usados na prática clínica são principalmente a PCR e a VHS. Presentemente vários estudos estão demonstrando a utilidade da calprotectina (CP) como marcador de inflamação, aumentando a frequência de sua aplicação em doenças tanto agudas como crônicas (STRÍŽ; TREBICHAVSKÝ, 2004).

A CP, inicialmente isolada na década 70, é uma proteína de 36 kDa, constituída por uma cadeia leve e duas cadeias pesadas, presente no fluido citosólico de neutrófilos, monócitos e macrófagos (FAGERHOL, 1996). A CP pertence à família das proteínas S100, uma família multigênicas de proteínas pro-inflamatórias com cerca de 20 membros, que possuem a capacidade de se ligar ao cálcio ( $Ca^{2+}$ ), e que funcionam principalmente como heterodímeros. A CP é formada por um complexo de duas proteínas: a S100A8 (também chamada de calgranulina A ou MRP8) e S100A9 (calgranulina B ou MRP14) (FOELL et al., 2004). Junto com a S100A12 (calgranulina C) forma a família das calgranulinas. Estas três proteínas são secretadas e ativadas pelos granulócitos e monócitos (OESTERLE, A. BOWMAN, 2015).

As células do sistema imune inato são equipadas com receptores que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns* – PAMPs). A ativação desses receptores resulta em secreção de citocinas, com conseqüente iniciação e amplificação da resposta imune. Adicionalmente, a resposta inflamatória inata é também modificada por moléculas de ligação intracelulares constituídas por padrões moleculares associados a lesão (*Damage Associated Molecular Patterns* – DAMPs) (ZHANG; MOSSER, 2008).

Os DAMPs são moléculas intracelulares primariamente relacionadas à homeostase celular, mas podem eventualmente atuar como sinais de perigo quando extravasam para o espaço extracelular ou quando liberadas em decorrência de lesão à célula ou quando secretada por células ativadas. A CP (complexo S100A8 /S100A9) foi identificada como importante DAMP liberada por fagócitos ativados e reconhecida por receptor de tipo TOLL 4 (*Toll-like receptor 4* – TLR4) nos monócitos (VOGL et al., 2007).

Durante os últimos 20 anos a CP progressivamente tornou-se um marcador confiável de inflamação especialmente na artrite reumatoide, na artrite idiopática juvenil e na doença inflamatória intestinal (FOELL et al., 2004). Tem sido também usado como elemento de

avaliação de risco futuro de eventos cardiovasculares em indivíduos saudáveis, na detecção de placas coronarianas não estáveis e na detecção de infarto do miocárdio durante síndrome coronariana aguda (HEALY et al., 2006).

Na DK a CP regula a adesão de neutrófilos e monócitos às células endoteliais e facilita sua transmigração para o interno da parede do vaso. Ao ligar-se às células da microvasculatura endotelial pode participar da gênese de estado pró-inflamatório e pró-trombótico durante a evolução da vasculite sistêmica. O papel proposto para a CP na gênese e manutenção da vasculite depende da ativação do endotélio vascular pelo TNF- $\alpha$  e de outras citocinas pró-inflamatórias, levando à expressão de N-glicanas carboxiladas.

Os neutrófilos e monócitos ativados segregam a CP que a seguir se liga as N-glicanas carboxiladas e ao sulfato de heparina na superfície das células endoteliais. Como anteriormente citado, os leucócitos também secretam a proteína S100A12, que se liga ao receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE - Receptor for advanced glycation endproducts) expressos em células endoteliais, linfócitos e macrófagos. Este receptor sinaliza através da via do factor nuclear-kappa-B e induz a expressão de muitas moléculas pró-inflamatórias. O resultado final da ligação das proteínas S100 é a agregação plaquetária e sua adesão ao endotélio, aumento da expressão da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e da molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), adesão de neutrófilos e monócitos, afrouxamento de junções de células endoteliais e aumento da passagem de células inflamatórias através da barreira celular endotelial (STRÍŽ; TREBICHAVSKÝ, 2004).

#### *1.6.1. Dosagem sorológica de Calprotectina*

As concentrações plasmáticas de calprotectina foram analisadas pela primeira vez em adultos saudáveis em 1980, pelo método de radioimunoensaio. As concentrações plasmáticas de calprotectina foram então consideradas mais elevadas entre os indivíduos do sexo masculino do que os do sexo feminino (DALE, 1990).

Atualmente a calprotectina plasmática é preferencialmente quantificada pelo método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). As amostras devem ser preferencialmente coletadas em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), visto que o EDTA estabiliza as membranas celulares e inibe eficazmente a libertação de calprotectina e outras proteínas dos leucócitos. Adicionalmente o EDTA previne, pelo menos parcialmente, a clivagem proteolítica de proteínas (DALE, 1990; FAGERHOL; DALE; ANDERSSON, 1980). Embora a utilização de anticoagulante EDTA seja sugerida, ensaios de ELISA mais

recentes, como os empregados neste estudo já podem ser dosados em amostras de soro ou plasma (QUANTA Lite Calprotectin ELISA, 2016).

Estima-se que a meia-vida da calprotectina plasmática é de cerca de 5 horas (FAGERHOL et al., 2005). Em doentes com infecções bacterianas graves, os níveis plasmáticos de calprotectina podem aumentar de 40 até 130 vezes o normal, enquanto que nas infecções virais apresentam níveis normais ou apenas ligeiramente elevados de calprotectina (SANDER et al., 1984).

### **1.7 Anticorpos Anti-Citoplasma de Neutrófilos (ANCA)**

Os ANCA são anticorpos conduzidos contra os antígenos existentes nos grânulos dos neutrófilos e monócitos, capazes de ativar as células e induzir lesões necróticas vasculares. São marcadores sorológicos importantes nas vasculites dos pequenos e médios vasos tendo também um valor de diagnóstico importante em outras patologias como na colite ulcerosa e na colangite primária esclerosante (BRÍGIDO, 2014).

As vasculites compõem um grupo heterogêneo de doenças que se caracterizam por uma inflamação da parede do vaso sanguíneo e necrose da parede vascular. A inflamação ocorre devido ao depósito de anticorpos ou imunocomplexos. Podem afetar qualquer tipo de vaso, ter qualquer localização e aparecer de forma isolada ou associadas a outras doenças (BRÍGIDO, 2014).

A razão mais frequente para a solicitação dos ANCA é para o diagnóstico das vasculites dos médios e pequenos vasos. Os ANCA são detectados de uma forma simples e rápida, pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) utilizando como substrato neutrófilos fixados em etanol e/ou formol (BRÍGIDO, 2014).

## **2. OBJETIVO**

Determinar sequencialmente os níveis de calprotectina sérica e de anticorpos anti-citoplasma de neutrófilo, em crianças com história de doença de Kawasaki, nas diferentes fases da doença (aguda, de convalescença e crônica) no intuito de evidenciar a presença e persistência de processo inflamatório e/ou autoimune ativo.

### 3. MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 Pacientes

Este estudo, que é parte de um amplo protocolo de pesquisa que visa investigar as alterações laboratoriais na doença de Kawasaki, foi efetuado de acordo com os princípios que regem a Declaração de Helsinki e foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS), que integra a Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal (SES-DF), sob o número 1.037.234.

Os pais ou responsáveis pelas crianças foram informados a respeito dos objetivos e riscos da pesquisa e concordaram com a utilização de excedentes de amostras de sangue obtidos para exames de rotina, coletados por ocasião do diagnóstico e durante o acompanhamento clínico e assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O estudo foi realizado utilizando 98 amostras de soro coletadas de crianças com diagnóstico confirmado de DK e idade 3,53 em média, admitidas no Hospital da Criança de Brasília José Alencar (Brasília, DF) e posteriormente acompanhadas clinicamente no ambulatório de Reumatologia do mesmo hospital. O diagnóstico da DK foi estabelecido de acordo com os critérios estabelecidos pela *American Academy of Pediatrics and American Heart Association* (NEWBURGER et al., 2004). Foram excluídas do estudo crianças com diagnóstico duvidoso ou com formas incompletas da DK.

O grupo controle foi formado por 100 crianças saudáveis (52 meninos; média de idade  $3,6 \pm 1,8$  anos) atendidas no ambulatório de Crescimento e Desenvolvimento do Hospital Universitário de Brasília (HUB), que foram encaminhadas à Unidade de Laboratório de Análises Clínicas (ULAC) para a realização de exames de rotina.

A coleta do sangue foi realizada conforme preconização da norma H3-A6 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), que estabelece os critérios adequados para a coleta de sangue. O soro foi coletado em tubo sem anticoagulante e posteriormente centrifugado à 5000 rpm por 5 minutos. As amostras foram alíquotadas em microtubos, e armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  até seu uso. De acordo com a fase de doença em que o paciente se encontrava por ocasião da coleta as amostras foram separadas em fase aguda, até 10 dias ( $n = 12$ ), fase de convalescença, até 60 dias ( $n = 46$ ) e fase crônica, mais de 180 dias ( $n = 40$ ).

As seguintes análises laboratoriais foram efetuadas por ocasião do diagnóstico: hemograma completo, contagem de plaquetas, proteína C reativa (PCR), antiestreptolisina O (ASO), velocidade de hemossedimentação (VHS), ureia, dosagem de eletrólitos, Alfa 1

glicoproteína, CPK, CKMB e troponina. Todos os pacientes foram submetidos a exame ecocardiográfico, efetuado utilizando aparelho eco-Doppler (ALOKA SSD 2200, Japão), por ocasião do atendimento inicial. Com poucas exceções em que o tratamento foi retardado devida a transferências de outros hospitais ou postos de saúde todos os pacientes receberam infusão de 2 g de IGIV dentro dos primeiros 15 dias após o início da febre.

As amostras dos pacientes e dos controles foram processadas utilizando o método de ELISA. Adicionalmente as amostras dos pacientes foram também analisadas pelo método de imunofluorescência indireta para pesquisa de ANCA.

### **3.1 Metodologia de ELISA**

A técnica de *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA) é baseada em reações antígeno-anticorpo, na qual um dos reagentes está imobilizado em fase sólida, ao passo que o outro reagente, comumente o anticorpo, pode ser ligado a uma enzima, desde que sejam preservadas as atividades enzimáticas e imunológicas do anticorpo (FERREIRA E MORAES, 2013).

Na fase sólida, o principal suporte empregado são as placas de polietileno de 96 poços, pois possibilitam a adsorção de antígenos e/ou anticorpos. Estas placas são ideais para utilização em equipamentos automatizados, e permitem a realização de múltiplos ensaios (DIAMANDIS; CHRISTOPOULOS, 1996).

Na pesquisa de antígeno, o anticorpo utilizado na sensibilização da placa deve ter boa afinidade, uma vez que a interação altamente específica entre o antígeno e o anticorpo, bem como a curva dose-resposta, são pontos determinantes para obtenção de bons resultados na técnica de ELISA, pois são responsáveis pela especificidade do teste. O inverso deve ocorrer na pesquisa de anticorpo, quando o antígeno deve apresentar afinidade e avidéz ideais (TANIWAKI, 2013; CROWTHER, 1995). O método de ELISA pode ser classificado em: direto, indireto, sanduíche (direto e indireto) e competitivo (CROWTHER, 1995).

### **3.2 Método ELISA direto**

O ELISA direto é uma técnica utilizada para a detecção de antígeno, na qual os anticorpos específicos para a patologia a ser analisada, estão aderidos aos 96 poços da placa

de polietileno que, após bloqueio inespecífico, reage com os antígenos da amostra. O conjugado enzimático, reage com o antígeno capturado pelo anticorpo, o qual catalisa uma reação de cor, que é revelada com a solução cromógena. A reação é interrompida e a intensidade da cor é medida. A intensidade da cor da solução é proporcional à quantidade de antígenos e a leitura pode ser realizada a olho nu ou através de algum sistema espectrofotométrico de placas multicanais (FERREIRA e MOARES, 2013).

### 3.2.1. Dosagem de Calprotectina por ELISA direto

O ensaio de calprotectina pelo método de ELISA direto foi realizado utilizando dois ensaios comerciais: QUANTA Lite<sup>®</sup> código 704770 (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos) e *Calprotectin-ELISA*<sup>®</sup> código EQ 6831 W (EUROIMMUN AG, Lübeck, Alemanha), que foram realizados no analisador de imunoensaio totalmente automatizado Best-2000<sup>®</sup> (INOVA Diagnostics, Inc., San Diego, CA, Estados Unidos), empregando para ambos metodologia de ELISA direto para a pesquisa de anticorpo.

Para a realização dos testes de Calprotectina, todos os reagentes foram colocados a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C). Os poços da microplaca utilizados para a realização do ensaio estavam sensibilizados com anticorpos monoclonais (EUROIMMUN) e policlonais (INOVA) de coelho anti-calprotectina. No início do ensaio, 100 µL de tampão fosfato pH 7,0 foi adicionado em cada um dos dois primeiros poços destinados ao branco da amostra, 100 µL por poço de cada um dos 6 calibradores (0, 15, 60, 240, 960, 2100 ng/mL calprotectina), controle positivo e controle negativo foram adicionados em duplicata nos poços subsequentes da placa sem diluição prévia. Em seguida as amostras de pacientes a serem analisadas foram diluídas 1:50 em solução de tampão fosfato, e foram pipetadas no volume de 100 µL nos poços subsequentes. Após a adição dos calibradores, controles e amostras, a placa foi incubada em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) durante 50 minutos.

Os antígenos presentes nas amostras de soro dos pacientes que reconhecem o anticorpo anti-calprotectina, ligam-se durante essa primeira incubação. Após esse período os poços foram lavados 3 x com 450 µL/poço de tampão de lavagem pronto (fornecido pelo *kit*), e permaneceu em cada poço por 30 a 60 segundos por ciclo de lavagem, em seguida os poços foram esvaziados para a remoção dos anticorpos presentes na amostra que não se ligaram.

Na etapa seguinte, foi adicionado 100 µL do conjugado de anticorpo anti-calprotectina purificado marcado com peroxidase em cada poço da placa, exceto no branco da amostra, e

em seguida a placa foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C). O conjugado não ligado foi removido por uma nova lavagem nas mesmas condições descritas para a primeira lavagem.

Em seguida foi adicionado 100 µL substrato marcado com tetrametilbenzidina (TMB) para a formação de um produto de cor azul, cuja intensidade é proporcional à concentração de antígenos presentes na amostra. A reação foi interrompida pela adição de 100 µL de ácido sulfúrico 0,5 M em cada poço que produziu a formação de uma cor amarela, indicando o fim da reação. A leitura foi realizada empregando um filtro com comprimento de onda de 405 nm e filtro de referência de 620 nm.

Para o cálculo dos resultados, a curva padrão logarítmica foi obtida pela plotagem ponto-a-ponto dos valores medidos dos 6 calibradores pelas unidades correspondentes (linear/log). Neste caso, a diluição da amostra 1:50 foi considerada para o cálculo, para que as concentrações das amostras fossem lidas diretamente na curva. As análises foram realizadas em duplicata, por isso foi calculada a média dos dois valores obtidos. As amostras com resultados abaixo de 50 ng/mL foram consideradas negativas e resultados acima de 50 ng/mL (*cut-off*) consideradas positivas.

### **3.3 Metodologia de Imunofluorescência**

A imunofluorescência é uma técnica utilizada para detectar os imunocomplexos antígeno-anticorpo. Para a determinação de anticorpos são usados, como substratos de antígenos, células, seções de tecidos ou substâncias caracterizadas bioquimicamente, entre outros. Os anticorpos são marcados com moléculas com propriedades fluorescentes. As moléculas fluorescentes absorvem a luz de um determinado comprimento de onda e emitem-na em outro, se a molécula de anticorpo estiver marcada com o corante fluorescente (fluorocromo), estes imunocomplexos podem ser detectados com um microscópio de fluorescência (contendo luz UV) pela emissão de uma luz colorida, quando excitados por uma luz com o comprimento de onda apropriado. Na técnica de imunofluorescência as substâncias fluorescentes mais usadas são o isotiocianato de fluoresceína (FITC) e a rodamina. O FITC absorve a luz azul (490 nm) e emite uma luz fluorescente amarela-verde (517 nm) (KINDT, et al 2013).

### 3.3.1. *Imunofluorescência indireta*

No método de imunofluorescência indireta, se a amostra for positiva, o anticorpo específico presente em uma amostra de soro diluído reage com o antígeno fixado numa fase sólida. Numa segunda fase, o complexo antígeno-anticorpo é corado com um conjugado de anti-imunoglobulina marcado com FITC e visualizado a sua fluorescência no microscópio.

### 3.3.2. *Pesquisa de Anticorpos Anti-citoplasma de Neutrófilos (ANCA) por Imunofluorescência indireta*

A reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) é a técnica mais utilizada para a detecção de autoanticorpos dirigidos contra antígenos encontrados nos grânulos citoplasmáticos de neutrófilos e monócitos, os chamados Anticorpos Anti-citoplasma de Neutrófilos. É um ensaio sensível, reprodutível e simples.

A detecção de ANCA (EUROIMMUN AG, Lübeck, Alemanha) foi realizada utilizando o mosaico de granulócitos, de acordo com as instruções do fabricante. Este mosaico contém três *biochips* como substrato: granulócitos fixados em etanol e em formalina, e células HEp-2 + granulócitos em etanol. Os granulócitos foram isolados a partir de sangue humano por centrifugação em gradiente de densidade e foram colocadas as sobre lâminas. Estes foram fixadas com etanol ou formalina e cortados em fragmentos milimetricamente para a formação dos *biochips*.

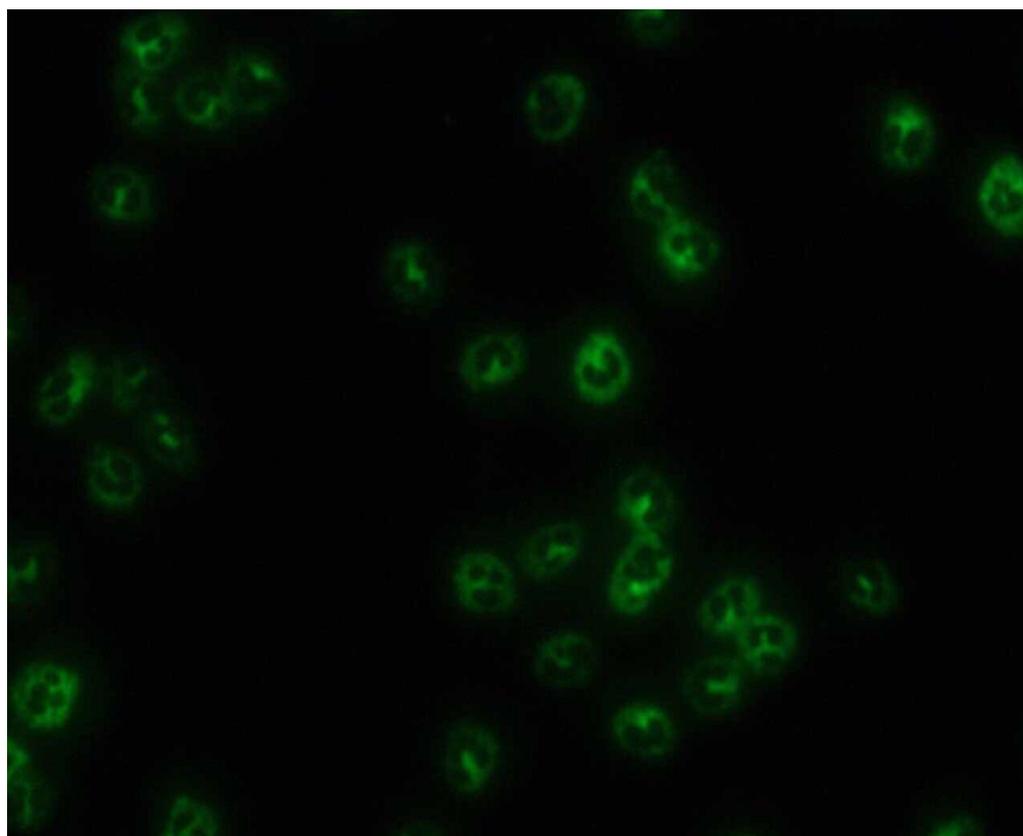
Na etapa inicial as amostras de pacientes a serem analisadas foram diluídas 1:10 em solução de tampão fosfato com *tween* 20 adicionado, e foram pipetadas 30 µL nos poços das lâminas. Após a adição das amostras e controles negativo e positivo, as lâminas de *biochip* foram incubadas em temperatura ambiente (18 °C a 25 °C) durante 30 minutos. Após esse período as lâminas foram lavadas com a solução de tampão fosfato com *tween* 20 adicionado durante 5 minutos.

Na segunda etapa foi adicionado 25 µL do conjugado anti-imunoglobulina marcado com FITC e as lâminas foram incubadas novamente por 30 minutos a temperatura ambiente (18 °C a 25 °C). O conjugado não ligado foi removido por uma nova lavagem nas mesmas condições descritas para a primeira lavagem.

Em seguida, todas as lâminas foram secas, e montadas com 10 µL de glicerina, e para finalizar, receberam lamínulas para proteção. Todas as lâminas foram avaliadas simultaneamente por dois observadores independentes usando microscópio de fluorescência.

Para avaliação foram seguidos os seguintes padrões de fluorescência (reação positiva): No caso de autoanticorpos contra o citoplasma de granulócitos fixados com etanol, dois padrões de fluorescência relevantes foram diferenciados:

Para avaliação foram seguidos os seguintes padrões de fluorescência: No caso de autoanticorpos contra o citoplasma de granulócitos fixados com etanol, o padrão de fluorescência relevante identificado foi uma fluorescência clássica distribuída igualmente em todo o citoplasma dos granulócitos, deixando livre o núcleo da célula (Figura 3). Para a reação negativa, o *biochip* inteiro manteve-se sem fluorescência, as áreas circulares descritas não são detectadas ou dificilmente ocorrem.



**Figura 4 – Padrão de ANCA por imunofluorescência indireta em neutrófilos humanos**

### **3.4 Análise estatística**

Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata e os resultados foram expressos em valor médio  $\pm$  desvio padrão. As análises estatísticas foram feitas utilizando o software estatístico GraphPad prism versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego California USA). Os valores encontrados foram comparados com o controle com o uso da ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. Os testes buscam identificar se as médias encontradas para a amostra e para o controle são significativamente diferentes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Dosagem de Calprotectina

A dosagem de calprotectina foi realizada em 98 amostras séricas de pacientes com DK, a Tabela 1 descreve os valores obtidos no grupo controle e do grupo com DK nas três fases. O estudo realizado com os *kits* INOVA e Euroimmun, demonstraram resultados acima 50 ng/mL com média de 216,5 e 59,2 ng/mL de calprotectina respectivamente. Os níveis séricos de calprotectina também foram observados em um grupo controle contendo 100 amostras de pacientes saudáveis, e demonstrou média de 9,2 e 19,5 ng/mL de calprotectina com os *kits* INOVA e Euroimmun respectivamente. A análise realizada nas mesmas condições das amostras dos pacientes com DK, apresentaram resultado abaixo de 50 ng/mL.

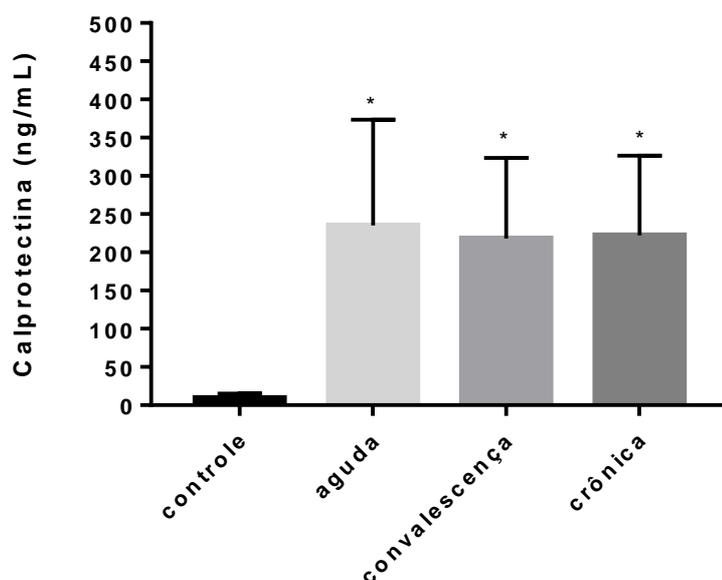
**Tabela 1-Resultados da dosagem sérica de Calprotectina (ng/mL) nos grupos portadores de DK e controle através dos kits INOVA e Euroimmun**

Características	Grupo Controle		Grupo com DK		
			Aguda	Convalescença	Crônica
CP (ng/mL) - INOVA	9,2*			216,5*	
Média ± Desvio Padrão	19,5 ± 8,5	235,4 ± 138,1	218,1 ± 105,3	222,1 ± 104,5	
Mediana	10,1	392,3	261,8	266,1	
CP (ng/mL) - Euroimmun	19,5*			59,2*	
Média ± Desvio Padrão	9,5 ± 5,9	58,5 ± 13,9	57,0 ± 15,9	62,03 ± 17,6	
Mediana	3,4	71,94	44,42	76,8	

\*Média total

### 4.2. Dosagem de CP por fase da DK empregando kit INOVA

A quantificação da Calprotectina nas amostras coletadas durante as três fases da DK, empregando o *kit* INOVA, mostrou resultados positivos e para as amostras controle, resultados negativos, como pode ser observado na Figura 4. Na fase aguda observa-se uma produção superior de calprotectina em comparação com os grupos convalesça e crônica. O perfil obtido na fase aguda foi demonstrou um maior aumento nos níveis de calprotectina, que diminuiu ao longo da fase de convalescença e voltou a aumentar na fase crônica, embora não tenha atingido os mesmos níveis da fase aguda.

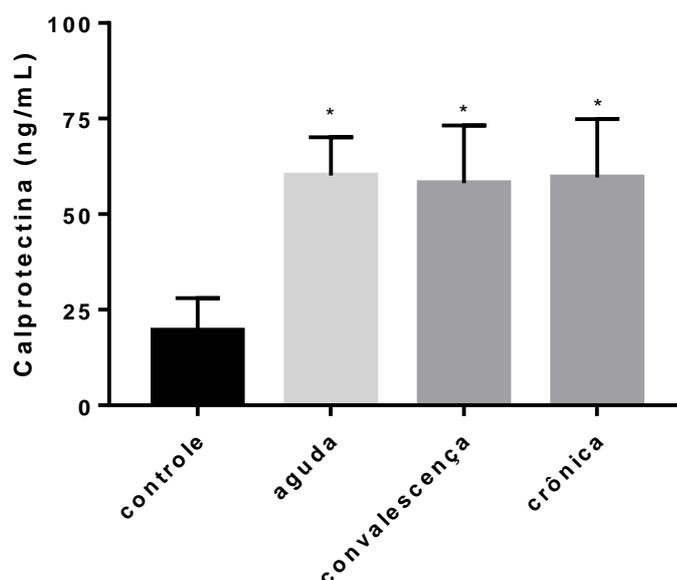


**Figura 5- Resultados da calprotectina com o kit INOVA nas fases aguda, convalescença e crônica da DK e do grupo controle**

Os valores representam média e desvio padrão de calprotectina. Análise estatística com ANOVA de uma via e *post test* de Tukey  $*p < 0,0001$

#### 4.3. Dosagem de CP por fase da DK empregando *kit* Euroimmun

A quantificação de calprotectina, através do *kit* Euroimmun, mostrou que ocorreu a produção desta proteína nas três fases avaliadas (aguda, convalescença e crônica). Observando a Figura 5, nota-se um ligeiro decréscimo na produção de calprotectina entre a fase aguda e a fase convalescença, valor que depois aumenta novamente na fase crônica, embora não volte aos níveis obtidos na fase aguda, no entanto não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com DK, apenas entre o grupo controle e o com DK.



**Figura 6 - Resultados da calprotectina com o kit Euroimmun nas fases aguda, convalescença e crônica da DK e do grupo controle**

Os valores representam média e desvio padrão de calprotectina. Análise estatística com ANOVA de uma via e *post test* de Tukey \* $p < 0,0001$

#### 4.4. Distribuição por sexo, faixa etária e fases da DK

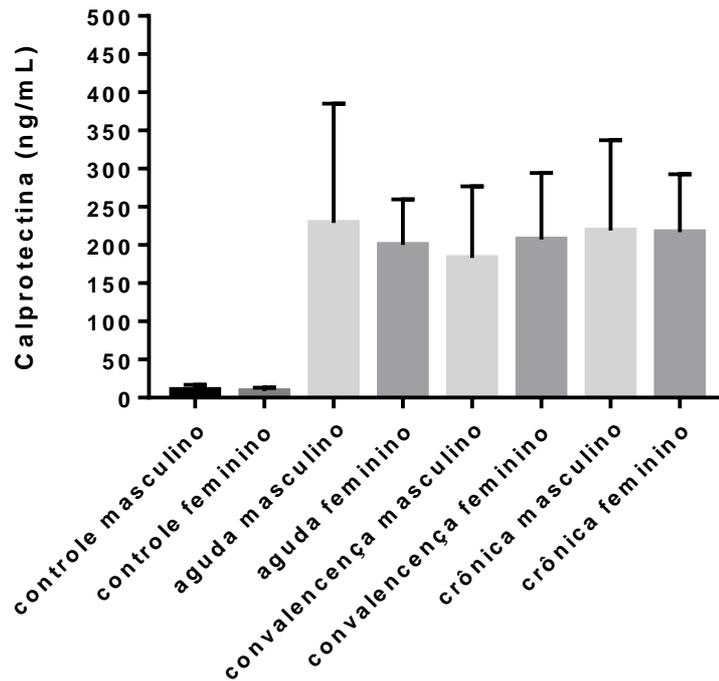
A Tabela 2 apresenta as características da população utilizada neste estudo, separando os dados obtidos por sexo, faixa etária e fases da DK. Observando os resultados, podemos destacar que no grupo DK a fase mais predominante da doença foi a de convalescença, que pode ser ratificada pela dificuldade inicial no diagnóstico. Para a distribuição por sexo, podemos afirmar que não houve predomínio de nenhum dos sexos nos grupos estudados, principalmente o grupo DK. E finalmente em relação à idade, as crianças de 0-3 anos foram mais predominantes com DK.

**Tabela 2 - Características gerais da população que a CP foi quantificada**

Características	Grupo Controle	Grupo com DK		
		Aguda	Convalescença	Crônica
População	100	10	48	40
Sexo (M/F)	52/48	7/3	22/26	26/14
0-3 anos	52	9	34	26
4-7 anos	48	1	14	14

#### **4.5. Comparação por sexo e fase da DK empregando *kit* INOVA**

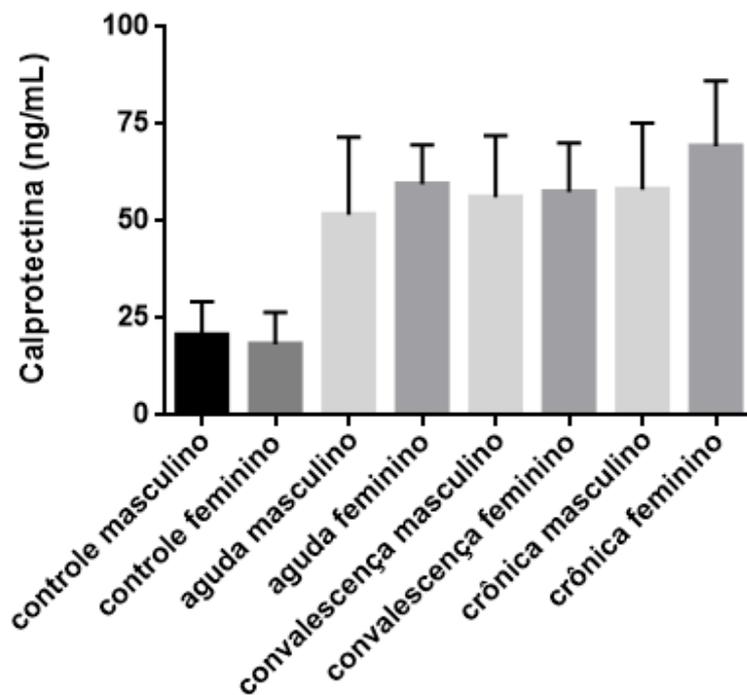
A avaliação dos dados obtidos relacionando os sexos femininos e masculinos através do kit INOVA, permite observar que na fase aguda pacientes do sexo masculino apresentaram concentração de calprotectina sérica superior aos pacientes do sexo feminino. Na fase convalescença, essa tendência alterou-se, mostrando os pacientes do sexo feminino com concentração sérica de calprotectina superior aos do sexo masculino. Na fase crônica, os dois grupos apresentaram valores semelhantes (Figura 6). De maneira geral podemos inferir que não há predominância ou relevância do sexo sobre a dosagem de calprotectina.



**Figura 7 - Resultados da calprotectina com o kit INOVA nas fases aguda, convalescença e crônica da DK e do grupo controle dividido por sexo**

#### **4.6. Comparação por sexo e fase da DK empregando kit Euroimmun**

Os dados obtidos através do kit Euroimmun, mostraram que, tanto na fase aguda quando na fase crônica, a concentração de calprotectina nos pacientes no sexo feminino foi superior aos do sexo masculino. No entanto na fase convalescença a concentração de calprotectina foi semelhante entre os dois grupos (Figura 7).



**Figura 8 - Resultados da calprotectina com o kit Euroimmun nas fases aguda, convalescença e crônica da DK e do grupo controle dividido por sexo**

#### **4.7. Resultados da Pesquisa de Anticorpos Anti-citoplasma de Neutrófilos (ANCA)**

Para avaliar a presença de autoanticorpos em amostras dos pacientes com DK determinou-se a pesquisa de Anticorpos Anti-citoplasma de Neutrófilos nas fases aguda, convalescença e crônica. Na fase aguda, somente 25 % dos pacientes apresentaram presença de Anticorpos Anti-citoplasma de Neutrófilos. Na fase convalescença, a porcentagem de pacientes com presença de Anticorpos Anti-citoplasma de Neutrófilos foi de 45, 7 %, diminuindo a diferença em relação à porcentagem de pacientes com ausência deste tipo de anticorpos. Na fase crônica a porcentagem de pacientes com presença ou ausência de Anticorpos Anti-citoplasma de Neutrófilos foi igual a 50 % (Tabela3). A presença de autoanticorpos sugere que a DK pode ter um componente autoimune relevante, e que esse fator é mais evidente a medida em que a DK cronifica-se.

**Tabela 3 - Presença de Anticorpos Anti-citoplasma de Neutrófilos na fase aguda, convalescença e crônica**

	<b>Negativo (%)</b>	<b>Positivo (%)</b>
<b>Aguda</b>	75,0	25,0
<b>Convalescença</b>	54,3	45,7
<b>Crônica</b>	50,0	50,0

## 5. DISCUSSÃO

A DK é geralmente definida como sendo uma vasculite sistêmica autolimitada. No entanto, uma plethora de estudos prévios revela que evidências clínicas laboratoriais e anatopatológicas indicam que estado inflamatório se mantém por tempo prolongado, podendo ter consequências duradouras e permanentes sobre o organismo das crianças afetadas. A ideia do presente estudo surgiu a partir da possibilidade de usar marcadores de inflamação para seguimento prolongado dos pacientes após o surto inicial de DK.

É fato reconhecido há longa data que a doença de Kawasaki frequentemente resultava em duradouras sequelas para o paciente. O seguimento prolongado de crianças com alterações das coronárias na fase aguda, por meio de estudos angiográficos ou por técnicas ultrassonográficas, revelou que significativa percentagem apresentava progressiva piora das lesões estenóticas das coronárias, meses ou anos após o surto inicial da DK (SUZUKI et al., 1992, 1996).

É importante notar que muitos desses estudos iniciais de seguimento foram principalmente efetuados em pacientes que tinham apresentado lesões das artérias coronárias durante a fase aguda e não em pacientes cujos exames não tinha revelado evidência de comprometimento vascular. Pouco se sabe a respeito daqueles pacientes em que o surto inicial de DK não produziu lesões vasculares evidentes.

A história natural das lesões dos pacientes que apresentaram anormalidades coronarianas evidenciou que em alguns casos os aneurismas persistiram durante a fase de convalescência e que estenoses de maior ou menor grau puderam ser detectadas mesmo meses ou anos após o início da doença (SUZUKI et al., 1996). Adicionalmente foi constatado que, apesar da maioria dos pacientes revelarem diminuição do tamanho dos aneurismas logo após o fim da fase aguda, as lesões eventualmente evoluíram para obstrução, mesmo após uma fase inicial de melhora. Tempo prolongado de seguimento tem revelado que lesões das coronárias incluem progressivas oclusões, extensas recanalizações, e aparecimento de neovascularização colateral. Progressivo aumento no tamanho dos aneurismas ou mesmo o reaparecimento de novos aneurismas fazendo parte das sequelas tardias após a fase inicial da DK (SUZUKI et al., 2000a, 2000b).

Recentemente Orenstein et al (2012) apresentaram importante e extenso estudo histopatológico dos vários estágios da DK pelo exame de casos fatais ou de material provenientes de pacientes submetidos a transplante cardíaco.

Estes autores identificaram três característicos processos vasculopáticos tanto em artérias coronarianas como em artérias não coronarianas. O processo inicial é constituído por uma arterite necrotizante que, iniciando-se no endotélio, destrói progressivamente a camada íntima, a camada média e parte da camada adventícia da artéria, sendo os neutrófilos as principais células inflamatórias implicadas no processo. Nesta fase a conseqüente diminuição da espessura da parede dos vasos facilita o aparecimento de dilatações e aneurismas que põem evoluir para trombose e posterior recanalização ou para ruptura do vaso. Esse processo é essencialmente autolimitado e se completa dentro de duas semanas do início da doença. No segmento afetado do vaso somente a camada adventícia subsiste após a destruição das outras camadas.

A segundo processo é constituído por uma vasculite convallescença/crônica, que pode se iniciar durante as primeiras duas semanas e pode perdurar por meses ou anos após o diagnóstico. A vasculite causa a transição de células musculares lisas para fibroblastos clássicos o que redundam em intensa proliferação de miofibroblastos. Este processo é difuso, estando presente em todo o sistema, afetando todas as artérias de porte média a pequeno, sejam elas de tipo muscular ou elástico. As células inflamatórias predominantes durante a fase convallescença/crônica são pequenos neutrófilos, apesar de que raros neutrófilos e macrófagos também podem ser observados. O grau de inflamação e que acompanha o dano tecidual é variável variando de leve até um processo de peri-arterite/pan-arterite severa e destrutiva que pode evoluir para a formação de anormalidades saculares e trombose dos vasos. A formação de aneurismas saculares durante esta fase ocorre durante o primeiro ou segundo mês de evolução enquanto que a trombose pode ocorrer a qualquer tempo.

Finalmente o terceiro e último processo é caracterizado pela exacerbação da proliferação de miofibroblastos que leva a uma progressiva e assincrônica estenose intraluminal o que frequentemente resulta na redução do lúmen do vaso a uma simples fissura. O miofibroblasto tem as clássicas características da célula presente em tecido de cicatrização. No entanto, contrariamente a esta, o miofibroblasto vascular continua ativado, causando um progressivo estreitamento do lúmen até, eventualmente, a total obstrução sem vir a sofrer o processo de apoptose, diferentemente do miofibroblasto presente em tecido em cicatrização. Como pode ser deduzido pelos estudos histopatológicos acima expostos o processo inflamatório inerente à DK é um processo crônico que perdura mesmo anos depois da eclosão da doença.

Estudos clínicos consubstanciam as evidências de ser a DK um processo inflamatório crônico, com risco cardiológico duradouro para o paciente. Há relato de casos de pacientes que mesmo não tendo apresentado evidências e lesões importantes das coronárias em exames angiográficos após a fase aguda da doença, tendo sido considerados isentos de risco cardiológico, vieram a apresentar infarto miocárdio agudo na sua terceira década de vida devido a lesões estenóticas residuais calcificadas das coronárias (KAWAI et al., 2014).

Estudos utilizando ecocardiografia transtorácica 2D de alta resolução na avaliação de pacientes em quem o diagnóstico de KD tinham sido feito entre três e 22 anos antes do teste, detectaram em todos alterações das artérias coronárias devidas a espessamento da camada íntima, concluindo que pacientes com prévia história de DK apresentam risco cardiológico, independentemente de evidenciarem ou não alterações coronarianas por ocasião do diagnóstico (GIACCHI et al., 2014).

Como anteriormente atestado o objetivo do trabalho era o de evidenciar a continuidade do processo inflamatório da DK, mesmo anos após o episódio inicial da doença por meio de um marcador de inflamação de uso relativamente fácil e sensibilidade apropriada. A presença de níveis aumentados de CP nas diferentes fases da doença foi demonstrada e confirmada pelo uso de dois diferentes kits de quantificação. O aumento dos níveis de CP foi detectado por ambos os testes, tanto pelo que utilizou anticorpos monoclonais, quanto pelo que utilizou anticorpos policlonais. Consequentemente a possibilidade de reação cruzada pelo uso exclusivo de anticorpos policlonais foi eliminada.

A presença de CP fecal tem sido largamente usada como teste relativamente barato e não invasivo para rastreamento preliminar da doença inflamatória intestinal, permitindo identificar os pacientes que deverão ser submetidos a endoscopia intestinal (VAN RHEENEN; VAN DE VIJVER; FIDLER, 2010). Estudos de revisão de seu uso como instrumento preliminar de seleção de pacientes para ulterior exame endoscópico demonstraram que a CP tem uma boa sensibilidade como indicador de presença de processo inflamatório apesar que sua especificidade é bastante modesta, desde que sua presença tem sido detectada em outras entidades patológicas tais quais infecções bacterianas ou parasitárias intestinais, alergias ou intolerâncias alimentares, doenças autoimunes do sistema gastrointestinal e em neoplasias (HENDERSON; ANDERSON; WILSON, 2013).

Situação similar se configura ao testarmos a CP como marcador da DK. A CP não pode evidentemente ser considerada um biomarcador da DK, pois sua presença é comum em muitos processos inflamatórios. No entanto, por ser um marcador sensível da presença de

inflamação crônica, diferentemente de PCR e VHS marcadores de inflamação na fase aguda, o que o torna importante no seguimento de pacientes com DK para evidenciar a continuidade do processo inflamatório nesses pacientes, mesmo anos após uma aparente cura do evento inicial. A causa da continuidade do processo inflamatório é ainda causa de especulação. Possivelmente o agente inicial desencadeie um processo de autoimunidade perpetuando o estado inflamatório. Outra possibilidade é a de uma infecção crônica subclínica. Seja qual for a causa, tanto os estudos histopatológicos com os baseados em marcadores de inflamação, levam a crer que o processo desencadeado pelo evento inicial da DK, seja ele infeccioso ou autoimune, não é autolimitado, perpetuando-se de forma subclínica e por tempo a ser ainda determinado na maior parte dos pacientes.

A presença de ANCA, que evidenciam um progressivo aumento durante as várias fases da doença, estando presentes em cerca de 50 % dos pacientes na fase crônica, sugere que um processo autoimune se inicia e progressivamente consolida durante a evolução da doença.

Este estudo apresenta algumas limitações. Por questões operacionais ligadas ao funcionamento do hospital e ao retorno de pacientes para consultas de seguimento, fatores esses que fugiram ao nosso controle, não foi possível obter amostras sequenciais de todos os pacientes. O número de amostras obtidas na fase aguda é menor das obtidas na fase de convalescência e das obtidas na fase crônica da doença. No entanto, apesar dessas dificuldades os resultados puderam comprovar o objetivo do projeto, ou seja, que o processo inflamatório continua presente por tempo prolongado após o evento aguda da doença.

## 6. CONCLUSÃO

Ao longo do desenvolvimento deste trabalho, foi possível quantificar os níveis de calprotectina nas amostras estudadas, permitindo evidenciar a presença e persistência de processo inflamatório nas diferentes fases da doença (aguda, convalescença e crônica), o que nos proporciona a utilização da calprotectina como um biomarcador sorológico, possibilitando um segmento clínico da cronicidade estabelecida na DK, algo anteriormente não evidente em outros trabalhos da literatura. Por outro lado, a pesquisa de Anticorpos Anti-citoplasma de Neutrófilos indica a presença de um possível processo autoimune que parece consolidar-se durante a evolução da doença, também anteriormente não demonstrada. Com base nestes achados laboratoriais, podemos inferir que a Doença de Kawasaki é portanto mantida por um processo inflamatório crônico e um possível mecanismo autoimune, ambos influenciados principalmente pela participação dos neutrófilos na doença, conforme foi explicado através dos mecanismos fisiológicos que liberam calprotectina e anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos.

## REFERÊNCIAS

- ATIK, E. Kawasaki Disease: Giant coronary arteries aneurisms. Regression and later stenosis. **Arq Bras Cardio**, v. 88, n. 1, p. 21-22, 2007.
- BRÍGIDO, A. M. L. . **Relatório de Estágio Mestrado em Análises Clínicas**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/23389/1/Relatório Mariana Ramos.pdf](https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/23389/1/Relatório%20Mariana%20Ramos.pdf)>.
- BURGNER, D.; HARNDEN, A. Kawasaki disease: What is the epidemiology telling us about the etiology? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 185–194, 2005.
- BURNS, J. C. Kawasaki disease. **Advances in pediatrics**, v. 48, p. 157–177, [s.d.].
- BURNS, J. C. Commentary: translation of Dr. Tomisaku Kawasaki's original report of fifty patients in 1967. **The Pediatric infectious disease journal**, v. 21, n. 11, p. 993–995, 2002.
- BURNS, J. C. et al. Infliximab treatment of intravenous immunoglobulin-resistant Kawasaki disease. **Journal of Pediatrics**, v. 153, n. 6, p. 833–838, 2010.
- BURNS, J. C. et al. Seasonality of Kawasaki Disease: A Global Perspective. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. 1–11, 2013.
- CHOUETER, F.N. OLSON, A. K. SHEN, D.D. PORTMAN, M. A. Therapy for Kawasaki Disease. v. 157, n. 6, p. 960–966, 2010.
- DALE, I. Plasma levels of the calcium-binding L1 leukocyte protein: standardization of blood collection and evaluation of reference intervals in healthy controls. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 50, n. 8, p. 837–41, 1990.
- DIAMANDIS, P. E.; CHRISTOPOULOS, T. K. **Immunoassay**. [s.l: s.n.].
- DURONGPISITKUL K, GURURAJ VJ, PARK JM, M. C. The prevention of coronary artery aneurysm in Kawasaki disease: a meta-analysis on the efficacy of aspirin and immunoglobulin treatment. **Pediatrics**, v. 96, n. 96, p. 1057–1061, 1995.
- FAGERHOL, M. K. Nomenclature for proteins: is calprotectin a proper name for the elusive myelomonocytic protein? **Clinical molecular pathology**, v. 49, n. 2, p. M74-9, 1996.
- FAGERHOL, M. K. et al. Increase in plasma calprotectin during long-distance running. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 65, n. 3, p. 211–220, 2005.
- FAGERHOL, M. K.; DALE, I.; ANDERSSON, T. Release and quantitation of a leukocyte derived protein (L1). **Scandinavian Journal of Haematology**, v. 24, n. 11, p. 393–398, 1980.
- FAUCI, A. S.; LANGFORD, C. A. **Reumatologia de Harrison - 3.ed.**: . [s.l.] AMGH Editora, 2014.
- FOELL, D. et al. Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. **Clinica Chimica Acta**, v. 344, n. 1–2, p. 37–51, 2004.
- FREEMAN, A. F.; SHULMAN, S. T. Refractory Kawasaki Disease. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 23, n. 5, p. 463–464, 2004.
- GIACCHI, V. et al. Assessment of coronary artery intimal thickening in patients with a previous diagnosis of Kawasaki disease by using high resolution transthoracic echocardiography: our experience. **BMC cardiovascular disorders**, v. 14, n. 1, p. 106, 2014.
- HEALY, A. M. et al. Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events. **Circulation**, v. 113, n. 19, p.

2278–2284, 2006.

HENDERSON, P.; ANDERSON, N. H.; WILSON, D. C. The Diagnostic Accuracy of Fecal Calprotectin During the Investigation of Suspected Pediatric Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The American journal of gastroenterology**, v. 107, n. April, p. 1–9, 2013.

KAWAI, H. et al. Two cases with past Kawasaki disease developing acute myocardial infarction in their thirties, despite being regarded as at low risk for coronary events. **Heart and Vessels**, v. 30, n. 4, p. 549–553, 2014.

KAWASAKI, T. Kawasaki disease. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences**, v. 82, n. 2, p. 59–71, 2006.

LANG, B. Recognizing Kawasaki disease. **Paediatrics and Child Health**, v. 6, n. 9, p. 638–643, 2001.

MAGALHAES. C M R, VACONCELOS. P, A C, PEREIRA. M. R, ALVES. N R M, GANDOFI. L, P. R. Short Reports Kawasaki disease : a clinical and epidemiological study. n. April, p. 99–101, 2009.

MAKINO, N. et al. Descriptive epidemiology of Kawasaki disease in Japan, 2011–2012: from the results of the 22nd nationwide survey. **Journal of epidemiology / Japan Epidemiological Association**, v. 25, n. 3, p. 239–45, 2015.

MANLHIOT, C. et al. Kawasaki disease at the extremes of the age spectrum. **Pediatrics**, v. 124, n. 3, p. e410-5, 2009.

MANLHIOT, C. et al. Improved classification of coronary artery abnormalities based only on coronary artery z-scores after kawasaki disease. **Pediatric Cardiology**, v. 31, n. 2, p. 242–249, 2010.

MEISSNER, H CODY, LEUNG, D. Y. M. Superantigens , conventional antigens and the etiology of Kawasaki syndrome. v. 19, n. 2, p. 91–94, 2000.

NEWBURGER, JANE W.TAKASHI, MASATO. ALEXA STEVEN. COLAN, ELISE. DUFFY, FULTON, D. ET AL. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at MOUNT SINAI SCHOOL OF MEDICINE on January 15, 2014. For personal use only. No other uses without permission. Copyright © 1991 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. 1991.

NEWBURGER, J. W. et al. **Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: A statement for health professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association** *Circulation*, 2004.

NEWBURGER, J. W. et al. *New England Journal. Sciences-New York*, p. 557–568, 2007.

NEWBURGER, J. W.; TAKAHASHI, M.; BURNS, J. C. Kawasaki Disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 67, n. 14, p. 1738–1749, 2016.

NOMURA, Y. et al. Maternal antibody against toxic shock syndrome toxin-1 may protect infants younger than 6 months of age from developing Kawasaki syndrome. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 11, p. 1677–80, 2002.

OESTERLE, A. BOWMAN, M. A. *HHS Public Access*. v. 33, n. 4, p. 395–401, 2015.

ORENSTEIN, J. M. et al. Three linked vasculopathic processes characterize Kawasaki disease: A light and transmission electron microscopic study. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

RODÓ, X. et al. Tropospheric winds from northeastern China carry the etiologic agent of

Kawasaki disease from its source to Japan. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 22, p. 7952–7957, 2014.

SANDER, J. et al. Plasma levels of the leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 44, n. 4, p. 357–362, 1984.

SHIMIZU, C. et al. The role of TGF- $\beta$  and myofibroblasts in the arteritis of Kawasaki disease. **Human Pathology**, v. 44, n. 2, p. 189–198, 2013.

SINGH, S.; VIGNESH, P.; BURGNER, D. The epidemiology of Kawasaki disease: a global update. **Archives of disease in childhood**, p. 1–5, 2015.

STRŽÍŽ, I.; TREBICHAŤSKÝ, I. **Calprotectin - A pleiotropic molecule in acute and chronic inflammation** *Physiological Research*, 2004.

SUZUKI, A. et al. Atsuko Suzuki,. p. 5–7, 1992.

SUZUKI, A. et al. Functional behavior and morphology of the coronary artery wall in patients with Kawasaki disease assessed by intravascular ultrasound. **Journal of the American College of Cardiology**, 1996.

SUZUKI, A. et al. Remodeling of Coronary Artery Lesions Due to Kawasaki Disease. **Japanese Heart Journal**, v. 41, p. 245–256, 2000a.

SUZUKI, A. et al. Active remodeling of the coronary arterial lesions in the late phase of Kawasaki disease: immunohistochemical study. **Circulation**, v. 101, n. 25, p. 2935–2941, 2000b.

UEHARA, R.; BELAY, E. D. Epidemiology of Kawasaki Disease in Asia, Europe, and the United States. **J Epidemiol**, v. 22, n. 2, p. 79–85, 2012.

VAN RHEENEN, P. F.; VAN DE VIJVER, E.; FIDLER, V. Faecal calprotectin for screening of patients with suspected inflammatory bowel disease: diagnostic meta-analysis. **BMJ (Clinical Research Ed.)**, v. 341, n. May 2016, p. c3369, 2010.

VOGL, T. et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. **Nature medicine**, v. 13, n. 9, p. 1042–1049, 2007.

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. NIH Public Access. **Psychiatry: Interpersonal and Biological Processes**, v. 162, n. 3, p. 214–220, 2008.

ZHU, B. et al. A meta-analysis on the effect of corticosteroid therapy in Kawasaki disease. **European Journal of Pediatrics**, v. 171, n. 3, p. 571–578, 2012.