

Artigo Original

Detecção de Calprotectina S100A8/A9 na Doença Inflamatória Intestinal por Imunoquimioluminescência e Imuno-histoquímica

Ana Paula Fernandes Silva ^{1,*}, Matheus Henrique Santos Lira Oliveira ¹, Luciano de Albuquerque Mello ², Gabriela Ayres Fragoso Nascimento ³, Maurílio Toscano de Lucena ⁴, Luiz Bezerra Carvalho Júnior ³, Mario Ribeiro de Melo-Júnior ³

¹ Afa Faculdade de Ciências Médicas de Jaboatão, Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brasil.

² Faculdade de Medicina de Olinda, Olinda, Pernambuco, Brasil.

³ Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁴ Centro Universitário Maurício de Nassau, Recife, Pernambuco, Brasil.

* Correspondência: anafernandes@gmail.com.

Resumo: A calprotectina (S100A8/A9) constitui aproximadamente 60% do conteúdo proteico citosólico dos neutrófilos e serve como marcador de ativação e migração leucocitária, fornecendo informações valiosas sobre a intensidade e o padrão da inflamação. Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão tecidual e a quantificação da calprotectina em amostras anorretais de pacientes com doença inflamatória intestinal (DII) utilizando imunoquimioluminescência e imuno-histoquímica. Anticorpos anti-calprotectina foram conjugados com éster de acridina para detecção quimioluminescente e aplicados aos extratos teciduais. Paralelamente, realizou-se imuno-histoquímica indireta em seções anorretais incluídas em parafina de pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa, bem como de controles não portadores de DII. Análises quantitativas e semiquantitativas foram comparadas entre os grupos. Os níveis de calprotectina foram significativamente elevados nos tecidos de pacientes com DII em comparação aos controles ($p < 0,05$) em ambos os métodos de detecção. O ensaio quimioluminescente demonstrou maior sensibilidade analítica, permitindo a quantificação mesmo em amostras com inflamação histológica leve. O aumento da calprotectina tecidual reflete maior infiltração e ativação de neutrófilos na mucosa intestinal, corroborando seu papel como biomarcador local da atividade inflamatória na DII.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal; Calprotectina; Imunoensaio Quimioluminescente; Doença de Crohn; Retocolite Ulcerativa.

Citação: Silva APF, Oliveira MHSL, Mello LA, Nascimento GAF, Lucena MT, Júnior LBC, Melo-Júnior MR. Detecção de Calprotectina S100A8 /A9 na Doença Inflamatória Intestinal por Imunoquimioluminescência e Imuno-histoquímica. Brazilian Journal of Clinical Medicine and Review. 2026;Jan-Dec;04(1):bjcmr44.

<https://doi.org/10.52600/2763-583X.bjcmr.2026.4.1.bjcmr44>

Recebido: 22 Abril 2025

Aceito: 9 Outubro 2025

Publicado: 3 Novembro 2025



Copyright: This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

1. Introdução

As doenças inflamatórias intestinais (DII), que incluem a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), são distúrbios crônicos e multifatoriais caracterizados por episódios recorrentes de inflamação que afetam o trato gastrointestinal [1]. Embora a incidência, a distribuição anatômica, a apresentação clínica, a progressão e a resposta terapêutica possam diferir, tanto a DC quanto a RCU compartilham mecanismos etiopatogênicos semelhantes [2, 3]. Estudos experimentais e clínicos sugerem que esses distúrbios resultam da influência combinada de fatores ambientais, imunológicos, microbiológicos e genéticos, que comprometem a integridade da barreira mucosa intestinal [4]. A migração trans-epitelial de bactérias intestinais ativa o sistema imunológico inato, desencadeando a cascata inflamatória [5, 6].

Como não existem características patognomônicas que distingam claramente a DC da RCU, de outras formas de enterocolite ou da síndrome do intestino irritável, o diag-

nóstico é baseado em uma avaliação integrada de dados clínicos, histórico da doença, distribuição das lesões e achados complementares de exames de imagem, laboratoriais, endoscópicos e histopatológicos [7, 8]. A mucosa intestinal inflamada contém abundantes neutrófilos e proteínas derivadas dessas células, incluindo alfa-1-antitripsina, elastase, calprotectina e lactoferrina. A calprotectina, uma proteína da família S100 que se liga ao cálcio e ao zinco, representa aproximadamente 60% do conteúdo proteico citosólico dos neutrófilos e desempenha funções tanto imunorregulatórias quanto antimicrobianas [9]. Níveis elevados de calprotectina nas DII resultam do aumento da infiltração de neutrófilos na mucosa intestinal e da transmigração para o lúmen intestinal. Outras proteínas derivadas de neutrófilos, como elastase, mieloperoxidase e lisozima, também têm sido investigadas como potenciais marcadores de inflamação gastrointestinal. No entanto, a calprotectina apresenta vantagem sobre essas moléculas devido à sua abundância no citosol dos neutrófilos [9].

Concentrações de calprotectina em DII ativa foram relatadas variando de 200 mg/kg a 20.000 mg/kg, reforçando a hipótese de que seu aumento reflete a migração de neutrófilos da mucosa inflamada para o lúmen intestinal [10, 11]. Ensaios de imunoquimioluminescência baseiam-se na detecção de emissões de luz geradas pela reação entre um antígeno e um anticorpo marcado com um composto quimioluminescente, como o éster de acridina. Este método proporciona maior sensibilidade analítica do que ensaios espectrofotométricos ou colorimétricos, permitindo a detecção na faixa de femtomoles a attomoles (10^{-15} a 10^{-18} mol) com alta estabilidade [12, 13].

Estudos prévios do nosso laboratório demonstraram que biomoléculas marcadas com ésteres de acridina podem detectar diferentes antígenos de forma específica e quantitativa, com sensibilidade superior em comparação com métodos histoquímicos tradicionais [14–16]. Embora os níveis fecais e séricos de calprotectina sejam amplamente utilizados para monitorar a inflamação intestinal, essas medições refletem principalmente a atividade inflamatória luminal ou sistêmica, e não a resposta mucosa local. A avaliação direta da expressão de calprotectina em tecido intestinal pode fornecer informações mais precisas sobre a distribuição espacial e a intensidade da inflamação em nível celular. Além disso, a detecção em tecido permite a avaliação de padrões histopatológicos em paralelo com a quantificação do biomarcador, oferecendo vantagens potenciais para pesquisa e padronização diagnóstica [19–20]. Considerando o número limitado de estudos que exploram a calprotectina tecidual utilizando métodos analíticos altamente sensíveis, nosso estudo teve como objetivo investigar a expressão e a quantificação da calprotectina (S100A8/A9) em tecidos anorretais de pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa, combinando imunoquimioluminescência e imuno-histoquímica.

2. Métodos

2.1 Seleção dos Casos

Amostras de tecido anorretal foram obtidas por biópsia (Pinça de Biópsia Professor Medina, 3 mm) de 39 pacientes com diagnóstico confirmado de doença de Crohn (DC; n = 9) ou retocolite ulcerativa (RCU; n = 30), todos em acompanhamento regular no Ambulatório de Proctologia do Hospital Barão de Lucena, Pernambuco, Brasil. Como controles (n = 6), foram utilizadas amostras de tecido anorretal de doadores cadavéricos com intervalo pós-morte inferior a 24 horas. Para minimizar a degradação proteica nas amostras de controle, os tecidos foram coletados durante autópsias de rotina, imediatamente fixados em formalina tamponada a 10% e processados nas mesmas condições e prazos laboratoriais das amostras de pacientes.

Os critérios de inclusão compreenderam diagnóstico confirmado de DC ou RCU, estabelecido por critérios clínicos, radiológicos, endoscópicos e histopatológicos combinados. Os critérios de exclusão incluíram colite indeterminada ou intervenção cirúrgica recente por distúrbios gastrointestinais. Variáveis sociodemográficas e clínicas (idade,

sexo, localização da lesão, histórico de câncer e doenças associadas) foram coletadas por meio de questionários estruturados.

2.2 Conjugação Anti-Calprotectina com Éster de Acridínio

A conjugação do éster de acridínio (EA) aos anticorpos monoclonais anti-calprotectina (S100A8/A9, clone MRP8/14, BMA Biomedicals, Suíça) foi realizada utilizando o Kit de Marcação com Éster de Acridínio (Enzo Life Sciences, Catálogo nº ADI-907-001). Uma mistura de 100 µL de anticorpo e 1 µL da solução de EA foi incubada por 1 h a 25 °C. O conjugado (anti-calprotectina-EA) foi purificado por cromatografia de exclusão molecular usando uma coluna Sephadex G-25 (10 × 1 cm) pré-equilibrada com PBS (pH 7,2). Quinze frações de 1 mL foram coletadas durante a eluição, e o teor proteico foi determinado por densidade óptica a 280 nm usando espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro (Amersham Biosciences).

2.3 Medidas por Imunoquimioluminescência

Para a análise quimioluminescente, fragmentos de tecido ($0,3 \times 0,3 \times 8 \times 10^{-4}$ cm) foram incubados com 100 µL do conjugado anti-calprotectina-EA por 2 h a 4 °C, e em seguida lavados com PBS. As amostras foram transferidas para tubos de polipropileno de 1,5 mL contendo 100 µL de PBS. A quimioluminescência foi medida utilizando um luminômetro Turner BioSystems (módulo de tubo único 9200-001). Para iniciar a reação, 50 µL de H₂O₂ 0,5% + HNO₃ 0,1 N (Trigger A) foram adicionados a 50 µL da amostra, seguidos por 50 µL de NaOH 0,25 N (Trigger B) para induzir alcalinização. A emissão de luz foi quantificada em Unidades Relativas de Luz (RLU), com tempo de contagem de 5 s por amostra.

2.4 Estudo de Imuno-histoquímica

As amostras de tecido foram seccionadas em triplicata e submetidas a coloração imunoindireta usando anticorpos monoclonais anti-calprotectina (S100A8/A9; BMA Biomedicals). A recuperação de antígeno foi realizada em tampão citrato 100 mM (pH 6,0) por 2 min após fervura em panela de pressão. As seções foram resfriadas a 35 °C e incubadas com peróxido de hidrogênio a 3% por 30 min à temperatura ambiente para bloquear peroxidase endógena. As amostras foram então incubadas com anticorpos anti-calprotectina (diluição 1:200) por 2 h a 37 °C. A detecção foi realizada utilizando o sistema Reveal Polyvalent Free-Biotin DAB (Biogen). PBS (100 mM, pH 7,2, com 150 mM NaCl) foi usado para todas as etapas de lavagem. Para controles negativos, o anticorpo primário foi substituído por PBS. As lâminas imuno-histoquímicas foram analisadas independentemente por dois patologistas cegos para minimizar viés do observador. Divergências foram resolvidas por consenso. A concordância entre observadores foi avaliada pelo coeficiente κ de Cohen, que apresentou valor de 0,70, indicando concordância substancial.

2.5 Análise Histomorfométrica Digital

Para análise quantitativa, três campos microscópicos representativos foram selecionados por amostra. Imagens com ampliação de 400× foram capturadas usando câmera de vídeo Samsung CCBW-410 acoplada a um microscópio Olympus BH-2 e analisadas com o software MOTIC Image Plus 2.0. A análise histomorfométrica foi realizada utilizando o software GIMP 2.8.18 (GNU Image Manipulation Program). Áreas positivas para calprotectina foram quantificadas em pixels por campo (área total do campo = 12.234 µm²).

2.6 Análise Estatística

Os dados obtidos pelo ensaio de imunoquimioluminescência foram expressos como média ± desvio padrão e analisados usando OriginPro 8.0 SR4 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). Os dados de imuno-histoquímica foram analisados com GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, EUA). A normalidade dos dados foi avaliada

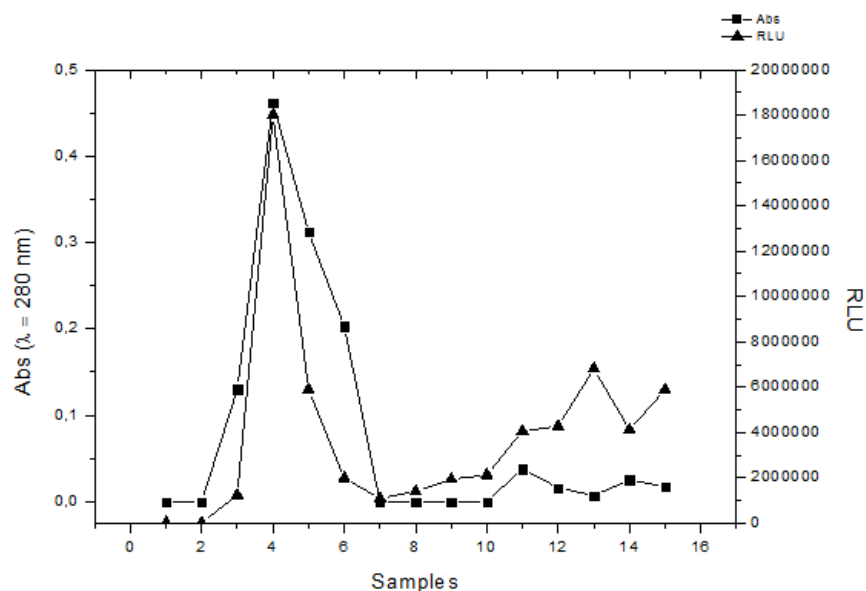
pelo teste de Shapiro–Wilk. Devido ao tamanho reduzido de alguns subgrupos, análises não paramétricas foram priorizadas quando a normalidade não pôde ser confirmada. Comparações entre grupos foram realizadas utilizando ANOVA one-way seguida do teste post hoc de Tukey para dados paramétricos, e Kruskal–Wallis seguido do teste de Dunn para dados não paramétricos. Quando aplicável, a correlação de postos de Spearman foi utilizada para avaliar associações entre os níveis de calprotectina e variáveis clinicopatológicas. O nível de significância estatística foi estabelecido em $p < 0,05$.

3. Resultados

A população do estudo consistiu em três grupos: doença de Crohn (DC, $n = 9$), retocolite ulcerativa (RCU, $n = 30$) e controles ($n = 6$). As idades médias foram de 39 ± 7 anos para DC e 44 ± 8 anos para RCU. Observou-se predomínio feminino em ambos os grupos (55% em DC e 75% em RCU). Nenhum dos participantes apresentava histórico de câncer, embora sete pacientes com DC e dezenove com RCU relataram histórico familiar positivo em parentes de primeiro grau. O consumo de álcool foi identificado em 44% dos pacientes com DC e 29% dos pacientes com RCU. Tabagismo ou histórico de tabagismo superior a dois anos esteve presente em 55% dos casos de DC e 33% dos casos de RCU.

O anticorpo anti-calprotectina foi conjugado com êxito ao éster de acridínio (EA). A cromatografia de exclusão molecular (Sephadex G-25) confirmou a formação do conjugado, com sobreposição dos picos de proteína e quimioluminescência correspondentes à quarta fração de eluição (Figura 1).

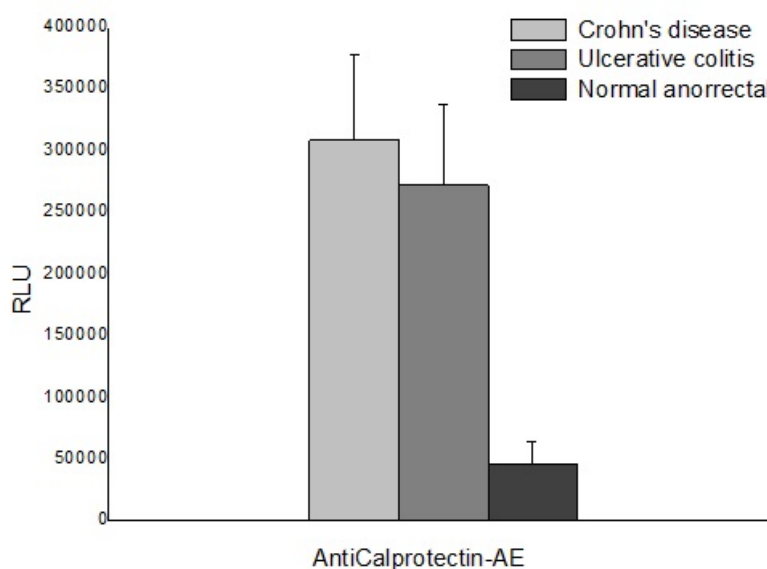
Figura 1. Perfil cromatográfico do conjugado (AntiCalprotectina-EA) em coluna de Sephadex G-25 (10×1 cm). A eluição foi realizada com tampão fosfato 10 mM em NaCl 0,15 M (PBS), pH 7,2. Frações (amostras de 1 mL) foram coletadas e a absorbância e a quimioluminescência medidas.



A análise quantitativa demonstrou que os níveis de calprotectina estavam significativamente elevados nos tecidos de DII em comparação com os controles (Figura 2). Os valores médios de Unidade Relativa de Luz (RLU) foram 308.184 ± 69.199 (intervalo 112.846–590.203) para DC, 271.687 ± 65.669 (intervalo 101.235–658.948) para RCU e 93.644 ± 2.226 para os controles. Todas as medições foram realizadas em triplicata, com coeficiente de variação entre 24,2% e 38,9%. A análise estatística confirmou diferença significativa na quimioluminescência de calprotectina entre os tecidos de DII e os controles ($p <$

0,05, teste post hoc de Tukey), enquanto não foi observada diferença significativa entre os grupos DC e RCU ($p > 0,05$).

Figura 2. Comparação da imunoquimioluminescência da doença de Crohn (DC, $n = 9$), retocolite ulcerativa (RCU, $n = 30$) e tecido anorretal normal ($n = 6$) marcado com Anti-Calprotectin-EA. Variações estatisticamente significativas foram observadas entre os valores de RLU de pacientes com DII e controles normais.



A avaliação imuno-histoquímica revelou expressão citoplasmática de calprotectina predominantemente em leucócitos polimorfonucleares e macrófagos infiltrantes na mucosa inflamada (Figura 3). Embora a intensidade visual da coloração fosse modesta em comparação com a amplitude do sinal quimioluminescente, a análise histomorfométrica quantitativa demonstrou área positiva para calprotectina significativamente maior nos tecidos de DII em relação aos controles (Figura 4). A densidade média de pixels por campo foi significativamente maior nos tecidos inflamados ($p < 0,05$, Shapiro-Wilk = 0,9167), confirmando a correlação quantitativa entre o sinal imuno-histoquímico e o estado inflamatório. Os dados morfométricos estão resumidos na Tabela 1. Nenhuma diferença qualitativa nos padrões de coloração foi observada entre DC e RCU, sugerindo uma via inflamatória compartilhada envolvendo calprotectina derivada de neutrófilos.

4. Discussão

A prevalência de doença inflamatória intestinal (DII) em países ocidentais atingiu aproximadamente 0,5% da população geral, e as taxas de incidência continuam a aumentar em regiões recentemente industrializadas, sugerindo uma transição epidemiológica global dessas doenças [19]. Populações com alta prevalência, como as da América do Norte e Europa, apresentam maior frequência de DII entre a segunda e a quarta décadas de vida, afetando homens e mulheres igualmente. A distribuição por idade e sexo observada em nossa coorte é consistente com esses achados epidemiológicos recentes [19, 20].

Diversos fatores ambientais e comportamentais têm sido associados ao início ou à progressão da DII. O tabagismo tem sido relacionado a um aumento do risco de doença de Crohn (DC), enquanto a cessação do tabagismo, mas não o tabagismo ativo, tem sido associada à retocolite ulcerativa (RCU) [20, 21]. Fatores dietéticos, consumo de álcool,

estresse psicológico, distúrbios do sono e baixos níveis de vitamina D também foram implicados na suscetibilidade à doença [21]. De acordo com estudos anteriores, uma proporção considerável de nossos pacientes com DII relatou tabagismo e consumo de álcool. A associação entre DII e câncer colorretal é bem estabelecida, particularmente na RCU, que envolve inflamação contínua da mucosa confinada ao cólon. Esse padrão provavelmente contribui para a maior incidência de carcinoma associado à colite na RCU em comparação à DC [22].

Figura 3. Expressão imuno-histoquímica de calprotectina em pacientes com doença inflamatória intestinal (Ampliação 400×).

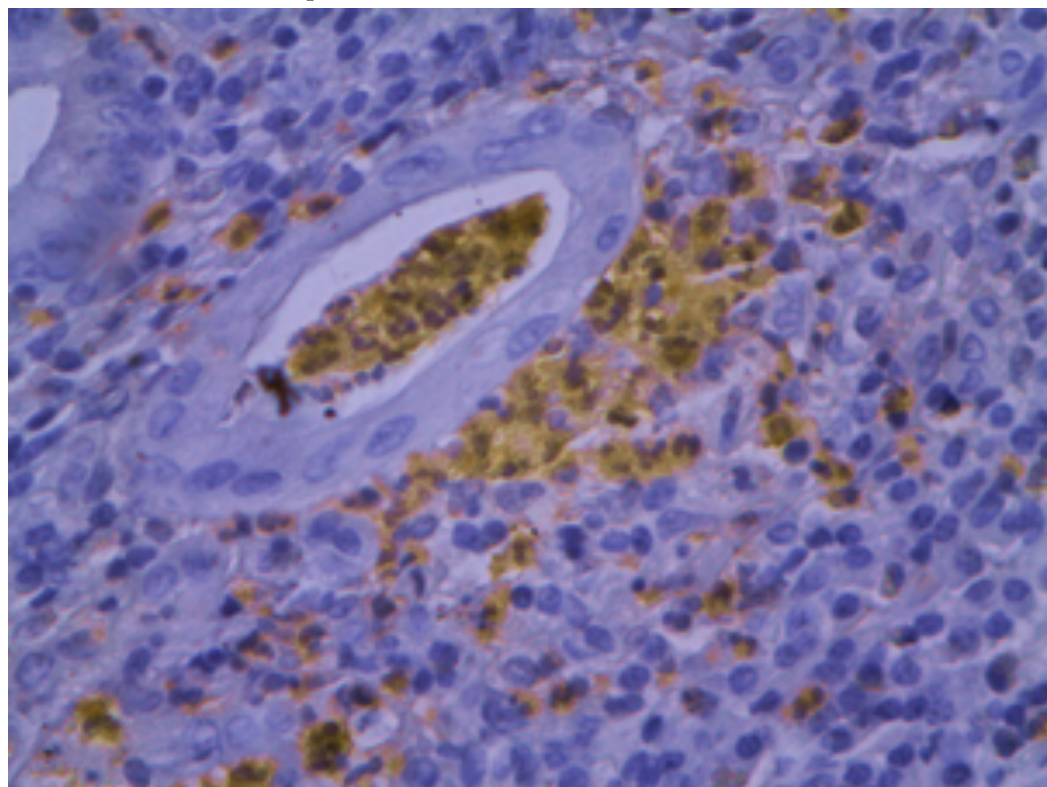


Figura 4. Porcentagem de imunorreatividade (em pixels) da calprotectina por campo capturado (área total 12.234 μm^2).

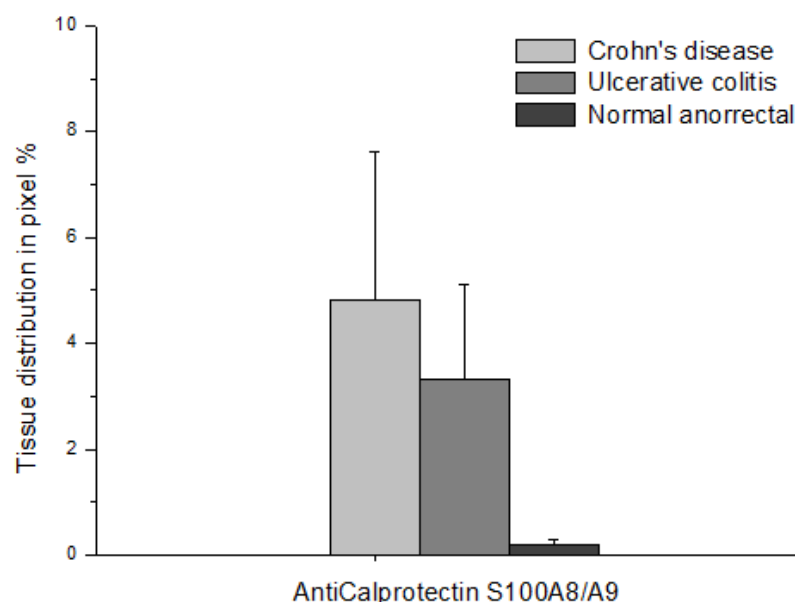


Tabela 1: Dados morfométricos da imunoexpressão de calprotectina em tecidos anorretais de pacientes com doença de Crohn, retocolite ulcerativa e controles.

	Doença de Chron		Colite Ulcerativa		Controle	
	Pixel	μ	Pixel	μ	Pixel	μ
Mínimo	15647	4,13 x106	7186	1,9 x106	53	14022,74
Máximo	87233	2,3 x107	57942	1,5 x107	543	143666,9
Média	37975	10 x106	26411,8	6,9 x107	192,8	51019,8

**Área total do campo de captura = 12.234 μm^2 .

A calprotectina (S100A8/A9) é uma proteína citosólica abundantemente expressa em neutrófilos e monócitos ativados. Atuando como molécula ligadora de cálcio e zinco, funciona como um padrão molecular associado a danos (DAMP) liberado durante estresse celular e inflamação [23]. Diversos estudos clínicos confirmaram o valor diagnóstico e prognóstico da calprotectina na DII, particularmente em ensaios fecais que refletem inflamação neutrofílica no lúmen intestinal [24,25]. Demonstrou-se que a calprotectina fecal se correlaciona mais fortemente com índices histológicos do que com escores endoscópicos, sugerindo que seu aumento pode preceder lesões mucosas visíveis [24]. Estudos brasileiros relataram concentrações médias de calprotectina fecal variando de 405 a 686 $\mu\text{g/g}$ em pacientes com DII, valores significativamente maiores do que os observados em distúrbios funcionais intestinais [26, 27]. Walsham e Sherwood [28] propuseram uma abordagem algorítmica para diagnóstico diferencial, na qual valores de calprotectina fecal acima de 150 $\mu\text{g/g}$ são sugestivos de DII ou carcinoma colorretal.

Embora as quantificações de calprotectina fecal e sérica tenham sido amplamente validadas, a detecção em tecidos permanece menos explorada. Em nosso estudo, o uso de anticorpos conjugados com éster de acridínio permitiu a detecção direta de calprotectina em extratos de tecidos anorretais de pacientes com DII. O método imunoquimioluminescente demonstrou alta sensibilidade analítica, com valores médios de Unidade Relativa de Luz (RLU) de 308.184 para DC e 271.687 para RCU, ambos significativamente superiores aos tecidos controle. Esses achados destacam o potencial do método para detectar pequenas quantidades de antígeno e reforçam sua estabilidade analítica.

A análise imuno-histoquímica mostrou expressão citoplasmática de calprotectina predominantemente em leucócitos polimorfonucleares e macrófagos na mucosa inflamada, consistente com descrições anteriores de sua localização celular [29]. Embora a intensidade visual da coloração tenha parecido modesta, a análise morfométrica quantitativa confirmou áreas positivas para calprotectina significativamente maiores em tecidos de DII em comparação aos controles. Esses resultados validam a relevância histopatológica da calprotectina como marcador de inflamação mucosa ativa e complementam a quantificação quimioluminescente.

Este estudo apresenta algumas limitações que devem ser reconhecidas. O tamanho da amostra, particularmente no grupo controle, foi relativamente pequeno e pode ter reduzido o poder estatístico. Além disso, tecidos controle pós-morte podem estar sujeitos a degradação parcial de proteínas, apesar do curto intervalo pós-morte e dos procedimentos de fixação padronizados. Outra limitação é a ausência de correlação com índices de atividade clínica, como o Índice de Atividade da Doença de Crohn (CDAI) ou o Escore de Mayo, o que poderia esclarecer ainda mais a relação entre calprotectina tecidual e gravidade da doença. Estudos futuros com coortes maiores e correlação clínica são necessários para validar esses achados preliminares.

Embora nossos resultados demonstrem que a detecção imunoquimioluminescente de calprotectina em tecidos seja viável e analiticamente robusta, sua aplicação clínica ainda está em fase exploratória. Para tradução à prática diagnóstica de rotina, é necessária padronização adicional, incluindo reprodutibilidade interlaboratorial, análises de custo-efetividade e validação frente a biomarcadores estabelecidos, como ELISA de cal-

protectina fecal e sistemas de pontuação endoscópica. Ainda assim, o método pode representar uma ferramenta complementar valiosa para pesquisas sobre inflamação mucosa, potencialmente melhorando a precisão das avaliações histopatológicas na DII.

Em resumo, este estudo fornece evidências de que a calprotectina pode ser detectada quantitativamente em tecidos anorretais de pacientes com doença de Crohn e retocolite ulcerativa utilizando imunoquimioluminescência, corroborada pela análise histomorfológica imuno-histoquímica. Esses achados sustentam o papel da calprotectina tecidual como marcador de atividade inflamatória local e reforçam o potencial dos ensaios imunoquimioluminescentes para detecção sensível de biomarcadores mucosos na DII.

5. Conclusão

A detecção imunocimiluminescente permitiu a avaliação quantitativa da calprotectina (S100A8/A9) em amostras de tecido anorretal de pacientes com doença inflamatória intestinal, mostrando diferenças estatisticamente significativas em comparação com tecidos controle. Os resultados demonstraram forte concordância entre as análises quimioluminescentes e imunohistoquímicas, corroborando o papel da calprotectina como um marcador confiável da inflamação mucosa local. Embora sejam necessários estudos adicionais para validar esses achados em coortes maiores e correlacioná-los com índices de atividade clínica, o método representa uma abordagem promissora para a avaliação sensível de biomarcadores em tecido na doença de Crohn e na colite ulcerativa.

Financiamento: Nenhum

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa: Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Bioética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil (Protocolo CEP/CCS/UFPE nº 316/2010). O consentimento informado por escrito foi obtido de todos os participantes ou de seus representantes legais.

Agradecimentos: Nenhum.

Conflitos de Interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Materiais Suplementares: Nenhum.

Referências

1. Iliev ID, Ananthakrishnan AN, Guo CJ. Microbiota in inflammatory bowel disease: mechanisms of disease and therapeutic opportunities. *Nat Rev Microbiol.* 2025 Aug;23(8):509–524. doi:10.1038/s41579-025-01163-0. Epub 2025 Mar 10. Erratum in: *Nat Rev Microbiol.* 2025 Aug;23(8):541. doi:10.1038/s41579-025-01175-w. PMID:40065181; PMCID:PMC12289240.
2. Roda G, Ng SC, Kotze PG, Argollo M, Panaccione R, Spinelli A, et al. Crohn's disease. *Nat Rev Dis Primers.* 2020;6(1):22. doi:10.1038/s41572-020-0156-2.
3. Kobayashi T, Siegmund B, Le Berre C, Wei SC, Ferrante M, Shen B, et al. Ulcerative colitis. *Nat Rev Dis Primers.* 2020;6(1):74. doi:10.1038/s41572-020-0205-x.
4. Jarmakiewicz-Czaja S, Tomasik P, Wolkow P, Gierlikowski W, Tomasik PJ. Genetic and epigenetic etiology of inflammatory bowel disease: an update. *Genes (Basel).* 2022;13(12):2388. doi:10.3390/genes13122388.
5. Zheng J, Sun Q, Zhang M, et al. Noninvasive, microbiome-based diagnosis of inflammatory bowel disease. *Nat Med.* 2024;30:3555–3567. doi:10.1038/s41591-024-03280-4.
6. Alghoul Z, Yang C, Merlin D. The current status of molecular biomarkers for inflammatory bowel disease. *Biomedicines.* 2022;10(7):1492. doi:10.3390/biomedicines10071492.
7. Aggeletopoulou I, Konstantakis C, Assimakopoulos SF, Triantos C. Exploring the role of IL-1 β in inflammatory bowel disease pathogenesis. *Front Med (Lausanne).* 2024;11:1307394. doi:10.3389/fmed.2024.1307394.
8. M'Koma AE. Inflammatory bowel disease: clinical diagnosis and surgical treatment—overview. *Medicina (Kaunas).* 2022;58(5):567. doi:10.3390/medicina58050567.
9. Bromke MA, Jarzab A, Jackowski M. Faecal calprotectin in assessment of mucosal healing in adults with inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *J Clin Med.* 2021;10(10):2203. doi:10.3390/jcm10102203.
10. Cury DB, Mizsputen SJ, Versolato C, Oliveira TS, Amarante HM. Serum calprotectin levels correlate with biochemical and histological markers of disease activity in TNBS colitis. *Cell Immunol.* 2013;282:66–70. doi:10.1016/j.cellimm.2013.04.004.
11. Rogler G, Aldeguer X, Kruis W, Mottet C, Reinisch W, Andus T. Concept for a rapid point-of-care calprotectin diagnostic test for diagnosis and disease activity monitoring in patients with inflammatory bowel disease: expert clinical opinion. *J Crohns Colitis.* 2013;7:670–677. doi:10.1016/j.crohns.2013.02.014.

12. Ferreira EC, Rossi AV. A quimioluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos de análise. *Quim Nova*. 2002;25:1003–1011. doi:10.1590/S0100-40422002000600018.
13. Brown RC, Li Z, Rutter AJ, Rawson KJ, Kent G. Development and application of a novel acridinium ester for use as a chemiluminescent emitter in nucleic acid hybridisation assays using chemiluminescence quenching. *Org Biomol Chem*. 2009;7:386–394. doi:10.1039/B811947C.
14. Lima LRA, Bezerra MF, Almeida SMV, Oliveira AP, Beltrão EIC. Glycophenotype evaluation in cutaneous tumors using lectins labeled with acridinium ester. *Dis Markers*. 2013;35:149–154. doi:10.1155/2013/787130.
15. Brustein VP, Cavalcanti CLB, Melo-Junior MRM, Medeiros MC, Beltrão EIC. Chemiluminescent detection of carbohydrates in tumoral breast diseases. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011;166:268–275. doi:10.1007/s12010-011-9422-9.
16. Melo-Rego MJ, Cordeiro MF, Cavalcanti CL, Carvalho-Junior LB, Beltrão EIC. Immunohistochemiluminescence detection: a quantitative tool in breast cancer HER-2 status evaluation. *Dis Markers*. 2013;34:373–377. doi:10.3233/DMA-130981.
17. Verstockt B, Verstockt S, De Hertogh G, Van Assche G, Vermeire S. Mucosal tissue biomarkers in inflammatory bowel disease: promises and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022;19(7):439–456. doi:10.1038/s41575-022-00608-1.
18. Naganuma M, Kunisaki R, et al. Tissue biomarkers in ulcerative colitis and Crohn's disease: state of the art and perspectives. *World J Gastroenterol*. 2023;29(25):3897–3912. doi:10.3748/wjg.v29.i25.3897.
19. Kaplan GG. The global burden of IBD: from 2015 to 2025. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2015;12:720–727. doi:10.1038/nrgastro.2015.150.
20. Borowitz SM. The epidemiology of inflammatory bowel disease: clues to pathogenesis? *Front Pediatr*. 2023;10:1103713. doi:10.3389/fped.2022.1103713.
21. Mahid SS, Minor KS, Soto RE, Hornung CA, Galandiuk S. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*. 2006;81:1462–1471. doi:10.4065/81.11.1462.
22. Rivera AP, Muñoz L, Gómez DE, Toro MJ, Delgado M. Ulcerative colitis-induced colorectal carcinoma: a deleterious concatenation. *Cureus*. 2022;14(2):e22187. doi:10.7759/cureus.22636.
23. Fengming Y, Jianbing W. Biomarkers of inflammatory bowel disease. *Dis Markers*. 2014;2014:710915. doi:10.1155/2014/710915.
24. Lobatón T, López-García A, Rodríguez-Moranta F, Ruiz-Cerulla A, Arjol C, Guardiola J, et al. A new rapid test for fecal calprotectin predicts endoscopic remission and postoperative recurrence in Crohn's disease. *J Crohns Colitis*. 2013;7:641–651. doi:10.1016/j.crohns.2013.05.005.
25. Burri E, Beglinger C, Felten SV, Lehmann FS. Fecal calprotectin and the Clinical Activity Index are both useful to monitor medical treatment in patients with ulcerative colitis. *Dig Dis Sci*. 2014;60:485–491. doi:10.1007/s10620-014-3383-0.
26. Dubian S, Gauthier L, Lemoine M, et al. Fecal calprotectin, intestinal ultrasound, and their combination for the diagnosis of inflammatory bowel disease. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*. 2025;49(3):102549. doi:10.1016/j.clinre.2025.102549.
27. Kotze LMS, Nisihara RM, Marion SB, Cavassani MF, Kotze PG. Fecal calprotectin: levels for the etiological diagnosis in Brazilian patients with gastrointestinal symptoms. *Arq Gastroenterol*. 2016;52:50–54. doi:10.1590/S0004-28032015000100011.
28. Walsham NE, Sherwood RA. Fecal calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Gastroenterol*. 2016;9:21–29. doi:10.2147/CEG.S51902.
29. Leach ST, Yang Z, Messina I, Song C, Geczy CL, Cunningham AM, et al. Serum and mucosal S100 proteins, calprotectin (S100A8/S100A9) and S100A12, are elevated at diagnosis in children with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 2007;42:1321–1331. doi:10.1080/00365520701416709.