



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**WAGNER NEVES FERNANDES**

**ANÁLISE DE MARCADORES HEMATOLÓGICOS,  
BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS EM DIFERENTES FORMAS  
ANÁTOMO-CLÍNICAS DA DOENÇA DE CROHN**

**RECIFE, 2012**

**WAGNER NEVES FERNANDES**

**ANÁLISE DOS MARCADORES HEMATOLÓGICOS,  
BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS EM DIFERENTES FORMAS  
ANÁTOMO-CLÍNICAS DA DOENÇA DE CROHN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde – UFPE, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre.

**ORIENTADOR:**

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo-Júnior

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA

**CO-ORIENTADORES:**

Prof. Dr. Dra. Adriana Maria da Silva Telles

Departamento de Patologia - UFPE

Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Departamento de Genética – UFRPE

**RECIFE, 2012**

Catálogo na Publicação

Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

F363a      Fernandes, Wagner Neves.

Análise de marcadores hematológicos, bioquímicos e genéticos em diferentes formas anátomo-clínicas da Doença de Crohn / Wagner Neves Fernandes. – Recife: O autor, 2012.

98 f. : il.; tab.; quad.; 30 cm.

Orientador: Mário Ribeiro de Melo Júnior.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2012.

Inclui bibliografia, apêndices e anexos.

1. Doença de Crohn. 2. Proteína C-Reativa. 3. Hemossedimentação. 4. Fator de necrose tumoral alfa. 5. Interleucina-10. I. Melo Júnior, Mario Ribeiro de. (Orientador). II. Título.

616.07

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2012-228)



## **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

**Centro de Ciências da Saúde - UFPE**

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.pospat.ufpe.br>

---

### ***DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.***

**AUTOR: WAGNER NEVES FERNANDES**

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA**

**NOME DA DISSERTAÇÃO: “ANÁLISE DOS MARCADORES HEMATOLÓGICOS,  
BIOQUÍMICOS E GENÉTICOS EM DIFERENTES FORMAS ANÁTOMO-CLÍNICAS  
DA DOENÇA DE CROHN”.**

**ORIENTADOR: PROF. DR. MÁRIO RIBEIRO DE MELO JÚNIOR**

**DATA DA DEFESA: 27 DE AGOSTO DE 2012.**

#### ***BANCA EXAMINADORA:***

---

Prof. Dr. Maurílio Toscano Lucena  
Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Geral  
Centro de Ciências da Saúde – UFPE

---

Prof(a). Dra. Paloma Lys de Medeiros  
Departamento de Citologia, Histologia e Embriologia  
Centro de Ciências Biológicas – UFPE

---

Prof. Dra. Rosângela Vidal  
Departamento de Bioquímica  
Centro Acadêmico de Vitória (CAV) - UFPE

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, o criador de tudo, o grande mestre.

Ao professor Dr. Mário Ribeiro, pela excepcional orientação, apoio, incentivo, compreensão, paciência e especialmente por proporcionar calma nos meus momentos de tensão.

À minha família pelo apoio e pela força dada em mais uma jornada da minha vida e por entender meus momentos de ausência.

Aos professores Dr. Francisco Eduardo Lima e Dra. Adriana Telles pela brilhante ideia de desenvolver este trabalho.

Aos pacientes que aceitaram o convite de participar do estudo.

À Dra. Valéria Martinelli e ao Dr. Maurílio Toscano pela contribuição e dedicação no trabalho.

À Luciana Santos pela força, amizade e auxílio em todo o trabalho.

Ao professor Dr. Paulo Souza, à Hildson Dornelas e a todos os demais membros do Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento Prof(a). Tânia Falcão/UFRPE pelas orientações e auxílio na área da biologia molecular.

Às Dra. Dilênia Cipriano e Maria Cleide Freire e todos os demais companheiros de trabalho do Procape/UPE, pelo auxílio nos testes clínico-laboratoriais.

A todos os professores e funcionários do Programa de pós-graduação em Patologia/CCS/UFPE pela dedicação dada aos alunos.

A todos colegas da turma do mestrado pela amizade construída.

## RESUMO

**Introdução:** A doença de Crohn (DC) é uma das mais graves doenças inflamatórias intestinais, constituídas por um grupo heterogêneo de doenças cuja manifestação final comum é a inflamação, e com etiopatogenia que envolve fatores genéticos, imunológicos e ambientais. **Objetivos:** Avaliar se existe associação entre polimorfismos das Regiões Promotoras dos genes da TNF- $\alpha$  (-308G/A) e da Interleucina-10 (-1082G/A), alterações hematológicas e bioquímicas nas diferentes formas clínico-anatômicas da DC em uma população do nordeste brasileiro. **Patients e Métodos:** Foram estudados 49 pacientes ambulatoriais (com idade entre 14 a 81 anos) com diagnóstico de DC. Durante a consulta clínica foi realizada entrevista para obtenção de dados clínico-epidemiológicos através do preenchimento de ficha clínica personalizada. Também foi coletado sangue venoso periférico, para realização das análises hematológica, bioquímica e genética. Foram utilizadas 132 amostras de um banco de dados de DNA de indivíduos normais como controle. **Resultados:** A idade média dos participantes foi de 41,8 anos e o gênero predominante foi o masculino (53,1%). A idade de diagnóstico da doença prevaleceu em indivíduos com menos de 40 anos (63,3%). Em relação à localização da doença, 44,9% apresentava sítio ileal, seguida da região colônica em 28,5% dos pacientes. A forma anátomo-clínica predominante foi a fistulizante (38,7%), seguida pela inflamatória (32,6%) e pela estenosante com 28,5%. Quanto aos marcadores inflamatórios PCR e VSH, ambos estavam aumentados em 57,1% e 65,3% dos casos, respectivamente, principalmente em pacientes com a forma fistulizante da doença. Em relação ao polimorfismo da TNF- $\alpha$  (-308G/A) não foi encontrado significância estatística genotípica ( $p=0.9816$ ) e alélica ( $p=0.9826$ ), em relação aos controles. Quanto ao polimorfismo da IL-10 (-1082G/A), também não foi encontrado diferença estatística ( $p=0.0843$ ) entre os genótipos dos pacientes em relação aos controles. Não foi encontrada relação entre os genótipos pesquisados e as formas anátomo-clínicas da doença de Crohn na população estudada. **Conclusão:** De acordo com nossos achados, os marcadores inflamatórios encontram-se aumentados na maioria dos pacientes com DC, principalmente naqueles na forma fistulizante da doença. Não foi evidenciada diferenças significantes no polimorfismo de regiões promotoras das interleucinas TNF- $\alpha$  e IL-10 entre os pacientes com diferentes formas anátomo-clínicas da DC. Estudos posteriores com mais marcadores genéticos e um número maior de pacientes necessitam ser realizados para que seja traçado um perfil genético diferencial nas diferentes manifestações clínicas da DC em nossa população.

**Palavras chave:** Doença de Crohn, Proteína C-reativa, Hemossedimentação, Fator de necrose tumoral alfa, Interleucina-10.

## ABSTRACT

**Introduction:** Crohn's disease (CD) is one of the severe inflammatory bowel disease, constituted by a heterogeneous group of diseases whose manifestation common is inflammation, and the pathogenesis involved genetic, immunological and environmental factors. **Purpose:** Assess the association between polymorphisms of the promoter regions of the TNF- $\alpha$  genes (-308G / A) and Interleukin-10 (-1082G / A), changes hematological and biochemical in the different forms of anatomic-clinical of CD in one Brazilian Northeast population. **Material and methods:** We studied 49 outpatients (age 14-81 years) diagnosed with CD. During the clinic visit were interviewed to obtain clinical and epidemiological data by filling in custom clinical record. Peripheral venous blood was collected to perform the analyzes hematological, biochemical and genetic. 132 DNA samples database of one subjects healthy were used as control. **Results:** The mean age of participants was 41.8 years and the predominant gender was male (53.1%). The age at diagnosis of the disease prevailed in subjects under 40 years (63.3%). In relation to the site of disease, 44.9% had ileal site, followed by in the colonic 28.5%. The anatomic-clinical form predominant was the fistulizing (38.7%), followed by inflammatory (32.6%) and 28.5% stricturing . For the inflammatory markers CRP and ESR , were increased by 57.1% and 65.3% of cases, respectively, mainly in patients with fistulizing form of the disease. Regarding the polymorphism of TNF- $\alpha$  (-308G / A) did not find statistically significant genotypic ( $p = 0.9816$ ) and allelic ( $p = 0.9826$ ) compared to controls. In relation the polymorphism of IL-10 (-1082G / A), no statistical difference was found ( $p = 0.0843$ ) between the genotypes of patients compared to controls. No relationship was found between the genotypes studied and anatomic-clinical forms of Crohn's disease in the population studied. **Conclusion:** According to our findings, the inflammatory markers are increased in most patients with CD, especially those in the form of fistulizing disease. There was not significant differences between polymorphism of the promoter regions of TNF- $\alpha$  and interleukins IL-10 among patients in different anatomical and clinical forms of CD. Further studies with more genetic markers and a larger number of patients need to be made to be drawn in a different genetic profile differential clinical manifestations of CD in our population.

**Keywords:** Crohn Disease, C-reactive protein, Erythrocyte Sedimentation Rate, Tumor Necrosis Factor-alpha, Interleukin-10.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Interação entre os vários fatores responsáveis pelo desenvolvimento das Doenças Inflamatórias Intestinais..... | 14 |
| <b>Figura 2.</b> Diferença de localização anatômica entre a Doença de Crohn e a Retocolite Ulcerativa Inespecífica.....         | 16 |

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO I

|                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table 1.</b> Clinical characteristics of the CD group.....                                                                                      | 47 |
| <b>Table 2.</b> The frequencies of the genotypes and allelic of -308 G/A of TNF- $\alpha$ and -1082 G/A of IL-10 in the CD and control groups..... | 48 |
| <b>Table 3.</b> TNF- $\alpha$ and IL-10 gene polymorphism in various phenotype of Crohn's disease (CD): proportions of genotypes (%). ....         | 49 |

### ARTIGO II

|                                                                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Características clínicas de acordo com a Classificação de Vienna (1998) .....                 | 55 |
| <b>Tabela 2.</b> Médias e desvio-padrão do CDAI, do VSH e da PCR em relação à forma anátomo-clínica da DC..... | 56 |
| <b>Tabela 3.</b> Médias e desvio-padrão do CDAI, da Hb e do RDW em relação à forma anátomo-clínica da DC.....  | 58 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Gráfico 1.</b> Perfil de alteração (em %) dos marcadores inflamatórios de acordo com as formas anátomo-clínicas da DC..... | 56 |
| <b>Gráfico 2.</b> Comparação dos valores médios dos resultados do VSH entre as formas anátomo-clínicas da DC.....             | 57 |
| <b>Gráfico 3.</b> Comparação dos valores médios dos resultados da PCR entre as formas anátomo-clínicas da DC.....             | 57 |

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

A: Adenina

AINE: Anti-inflamatórios não esteróides

BSA: Soro albumina bovina

C:Citosina

CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CCS: Centro de Ciências da Saúde

CD: Crohn's Disease

CDAI: Índice de Atividade da Doença de Crohn

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CRP: C-reactive protein

DC: Doença de Crohn

DII: Doença Inflamatória Intestinal

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DP: Desvio-padrão

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

ESR: erythrocyte sedimentation rate

FACEPE: Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

G: Guanina

GI: Gastro Intestinal

IBD: Inflammatory Bowel Disease

ICAM-1: Molécula de adesão intercelular 1

IFN-gama: Interferon-gama

IL-6: Interleucina-6

IL-10: Interleucina-10

IL-12: Interleucina-12

IL-18: Interleucina-18

IL-1 $\beta$ : Interleucina-1 beta

IL23R: Receptor da Interleucina 23

NcoI: enzima de restrição NcoI

NOD: Domínio de oligomerização nucleotídica

OR: Odds Ratio

PCDAI: Índice de Atividade da Doença de Crohn Pediátrico

PCR: Proteína C reativa

PCR-ARMS: Reação em cadeia polimerase-alelo específica

PCR-AS: Reação em cadeia polimerase-alelo específica

PCR-RFLP: Reação em cadeia polimerase-polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de digestão

PE: Pernambuco

PLT: Plaquetas

PPGG: Programa de Pós-Graduação em Genética

PPGP: Programa de Pós-Graduação em Patologia

PROCAPE: Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco

RCUI: Retocolite Ulcerativa

RDW: coeficiente de variação da distribuição das hemácias  
g/dL: gramas por decilitro

SES: Secretaria Estadual de Saúde

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único

T: Timina

TAE: Tris Acetato a 400mM e EDTA

TGI: Trato Gastro Intestinal

TLR2: Receptor Toll-like 2

TLR4: Receptor Toll-like 2

TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral alfa

UC: Ulcerative Colitis

UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

UFRPE: Universidade Federal Rural de Pernambuco

UPE: Universidade de Pernambuco

VCM: Volume Corpuscular Médio

VSH: Velocidade de Sedimentação da Hemácias

WBC: Contagem total de leucócitos

## SUMÁRIO

|                                                                                                              |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Resumo.....</b>                                                                                           | <b>05</b> |
| <b>Abstract.....</b>                                                                                         | <b>06</b> |
| <b>Lista de Ilustrações, Tabelas e Gráficos.....</b>                                                         | <b>07</b> |
| <b>Lista de Abreviaturas e Siglas.....</b>                                                                   | <b>08</b> |
| <b>1.Apresentação.....</b>                                                                                   | <b>13</b> |
| <b>2.Revisão da Literatura.....</b>                                                                          | <b>14</b> |
| 2.1.Doenças inflamatórias intestinais.....                                                                   | 14        |
| 2.2.Doença de Crohn.....                                                                                     | 17        |
| 2.2.1.Características clínicas.....                                                                          | 18        |
| 2.2.2.Alterações hematológicas e bioquímicas na Doença de Crohn(DC).....                                     | 19        |
| 2.2.3.Doença de Crohn e as citocinas IL-10 (Interleucina-10) e TNF- $\alpha$ (Fator de Necrose Tumoral)..... | 19        |
| 2.2.4.Aspectos moleculares na Doença de Crohn (DC).....                                                      | 21        |
| 2.2.5.Polimorfismos genéticos.....                                                                           | 22        |
| 2.2.6.Polimorfismos da IL-10 e da TNF- $\alpha$ na Doença de Crohn.....                                      | 23        |
| <b>3.Objetivos.....</b>                                                                                      | <b>25</b> |
| 3.1.Geral.....                                                                                               | 25        |
| 3.2.Específicos.....                                                                                         | 25        |
| <b>4.Material e métodos.....</b>                                                                             | <b>26</b> |
| 4.1.População.....                                                                                           | 26        |
| 4.2.Aspectos éticos.....                                                                                     | 26        |
| 4.3.Aspectos epidemiológicos e clínicos.....                                                                 | 26        |
| 4.4.Análise do polimorfismo gênico.....                                                                      | 27        |
| 4.4.1.Local.....                                                                                             | 27        |

|                                                                                                                  |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.4.2.Extração do DNA Gênomico.....                                                                              | 27        |
| 4.4.3.Análise do polimorfismo -308 (G>A) na região promotora do Gene TNF- $\alpha$ pela técnica de PCR-RFLP..... | 28        |
| 4.4.4.Análise do polimorfismo -1082 (G>A) do Gene IL-10 PCR Alelo – Específico pela técnica ARMS-PCR.....        | 29        |
| 4.5.Estudo Bioquímico.....                                                                                       | 29        |
| 4.6.Análise hematológica.....                                                                                    | 30        |
| 4.7.Análise Estatística.....                                                                                     | 30        |
| <b>5. Resultados.....</b>                                                                                        | <b>31</b> |
| 5.1.Artigo original I.....                                                                                       | 31        |
| 5.2.Artigo original II.....                                                                                      | 50        |
| <b>6. Considerações Finais.....</b>                                                                              | <b>68</b> |
| <b>Referências .....</b>                                                                                         | <b>69</b> |
| <b>Apêndices.....</b>                                                                                            | <b>76</b> |
| <b>Anexos.....</b>                                                                                               | <b>81</b> |

## 1. APRESENTAÇÃO

A doença de Crohn (DC) compõe o elenco das chamadas de doenças inflamatórias intestinais (DII), um grupo heterogêneo de doenças cuja manifestação final comum é a inflamação, em cuja patogênese estão envolvidos diferentes fatores genéticos, imunológicos e ambientais (FEAGAN, 2003).

Dados recentes suportam a noção que a diversidade de manifestações clínicas da DC é um reflexo das distintas vias imunogenéticas que podem ocorrer no mecanismo fisiopatológico da doença (BAMIAS; COMINELLI, 2007).

Pela importância recentemente demonstrada de polimorfismos dos genes relacionados à resposta imune inata na fisiopatologia da DC, como por exemplo, os genes IL-10 (Interleucina-10) e TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral alfa) principalmente pela implicação do risco étnico específico para a evolução e complicações encontradas na DC entre subgrupos populacionais diferentes (ANDERSEN *et al.* 2010).

Os recentes avanços na área da imunologia e no conhecimento da patogênese da DC permitiram definir novos alvos terapêuticos e o desenvolvimento de novos fármacos que, possibilitarão, num futuro não muito longínquo, a melhoria da qualidade de vida dos doentes. Apesar do grande número de terapêuticas disponíveis no mercado para o tratamento da DC, ainda há doentes que não conseguem obter resposta mesmo com os novos agentes utilizados atualmente (KORZENIK, 2008).

Assim, cada vez mais têm sido estimulados estudos direcionados a investigar grupos gênicos relacionados ao comportamento da resposta imune no quadro de DC. Contudo, existem ainda diversos aspectos não esclarecidos na busca de possíveis marcadores com valor prognóstico que auxiliem no tratamento deste tipo de doença inflamatória

Desta forma, considera-se relevante avaliar aspectos do perfil genético populacional diferenciado que poderia interferir na resposta de diferentes grupos humanos ao mesmo tratamento farmacológico a partir de imunomoduladores ou até cirúrgicos atualmente utilizados no acompanhamento de pacientes com DC com diferentes formas anátomo-clínicas (PRESCOTT *et al.*, 2010).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Doenças inflamatórias intestinais

Na sua conceituação mais ampla, “as doenças inflamatórias intestinais” (DII) correspondem a qualquer processo inflamatório envolvendo o trato gastrointestinal, seja ele agudo ou crônico, na sua maioria, são afecções de etiologia desconhecida e de grande importância em saúde pública, cujo tratamento envolve custos extremamente altos, incluindo aqueles relacionados à perda de produtividade. Além disso, os pacientes portadores de Doença de Crohn (DC) ou de Retocolite Ulcerativa Inespecífica (RCUI) geralmente já experimentaram várias intervenções cirúrgicas e tratamento com agentes imunossupressores (ROTHENBERG, 2002; CAMPOS *et al.*, 2002).

A RCUI e a DC são as formas mais comuns de DII, que se caracterizam por inflamação crônica dos intestinos, de etiologia ainda não definitivamente esclarecida e em cujo processo patológico estão envolvidos fatores genéticos, ambientais e imunológicos (figura 1) (SARTOR, 1997; RUTGEERS, 1998; MORAHAN *et al.*, 2002). A DII é resultante de ativação persistente e inadequada do sistema imune mucoso (ROBBINS E CONTRAN, 2005), admitindo-se que possa estar relacionada com um distúrbio autoimune (TAKAISHI *et al.*, 2000, DUERR *et al.*, 2003; NAKAMURA *et al.*, 2003).

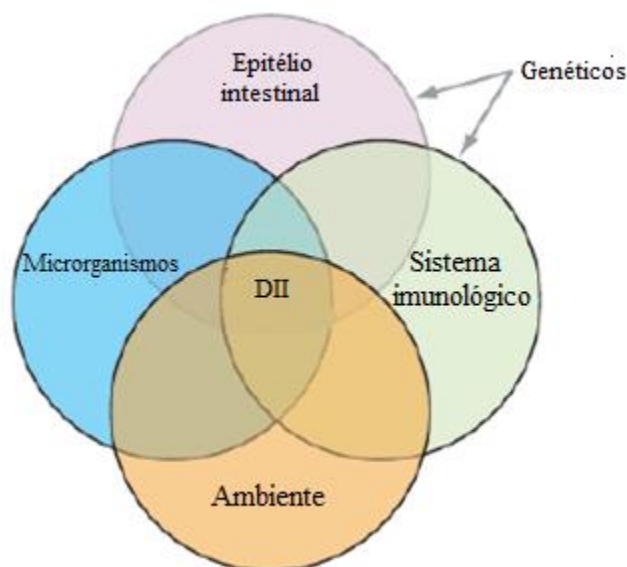


Figura 1. Interação entre os vários fatores responsáveis pelo desenvolvimento das Doenças Inflamatórias Intestinais (modificado). Fonte: Braun, J., Wei, B. Body Traffic: Ecology, genetics and immunity in inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*, v.2, p.401-29, 2007.

As DII ocorrem em todo o mundo e representam um sério problema de saúde, pois atingem preferencialmente pessoas jovens, cursam com recidivas frequentes e admitem formas clínicas de alta gravidade (JEWEL, 2006). A prevalência e incidência destas doenças variam de acordo com a região estudada. Atualmente essas doenças afetam mais de 1.000.000 de americanos. Na América do Norte, a prevalência varia de 26 a 198 casos por 100.000 habitantes para DC e 37 a 246 casos por 100.000 habitantes para RCUI. A incidência é de 3,1 a 14,6 por 100.000 pessoas/ano para DC e 2,2 a 14,3 por 100.000 pessoas/ano para RCUI. Na Europa a prevalência varia de 8,3 a 21,4 casos por 100.000 pessoas/ano e a incidência de 0,7 a 9,8 por 100.000 pessoas/ano para DC e 1,5 a 20,3 por 100.000 pessoas/ano para RCUI (LOFTUS, 2004)

No Brasil ainda não existem dados adequados para estudo de prevalência e incidência destas doenças provavelmente, devido à dificuldade de realizar o diagnóstico pela ausência de teste padrão-ouro, pela multiplicidade de sintomas e pelo custo dos exames diagnósticos. Porém, estudos demonstram que a incidência das DII parece ser menor em países em desenvolvimento, como o Brasil. Esse fato é difícil de ser avaliado devido à dificuldade em se realizar o diagnóstico adequado e a grande prevalência de diarreias infecciosas e parasitárias. Há fortes indícios de que, uma vez o país se torne industrializado, com modificações, de dieta, do estilo de vida e da exposição ambiental essas doenças se tornam mais prevalentes (LOFTUS, 2004).

A DC e RCUI são comuns em países desenvolvidos, áreas urbanas e indivíduos com melhor padrão sócio-econômico, levantando a hipótese de que possa haver associação com higiene e sanitário básico, através da alteração da flora intestinal. O uso de anti-inflamatórios não-esteróides (AINE's) parece estar associado ao gatilho da DII (KRISHNAN; KORZENICK, 2002).

A RCUI e a DC são consideradas formas distintas de DII. Contudo, os sintomas clínicos das duas se sobrepõem, e o diagnóstico diferencial em muitos casos é difícil (GOWER-RUSSEAL *et al.*, 1994). Apesar de constituírem doenças distintas, compartilham aspectos clínicos e epidemiológicos sugerindo a possibilidade de fatores etiológicos comuns. O curso clínico, cujas manifestações principais são diarreia, dor abdominal e sangramento retal, é caracterizado por períodos de remissão e exacerbação, e apresenta complicações das mais diversas (DAMIÃO *et al.*, 2004).

A RCUI acomete total ou parcialmente, a extensão do cólon ou reto, enquanto a DC pode afetar todo o trato gastrointestinal, desde a boca até o ânus, ocorrendo frequentemente

no intestino delgado distal e cólon (figura 2) (ROBBINS E CONTRAN, 2005). Porém há um subgrupo de casos de DC com uma apresentação típica da RCUI, o que ilustra o grau de similaridade destas doenças (IRVINE *et al.*, 2001; JEWEL, 2006). Isso significa que um paciente pode inicialmente ter sido diagnosticado com RCUI e mais tarde ser considerado portador de DC (KROMBLUTH, 1998; MAEDA *et al.*, 1994).



Figura 2. Diferença de localização anatômica entre a Doença de Crohn e a Retocolite Ulcerativa Inespecífica  
Fonte:<http://apbiocorpohumano.webnode.com.br/sistema%20de%20org%C3%A3os/digestivo/doen%C3%A7a%20de%20crohn>

Na DC as manifestações clínicas são variáveis, mais sutis que na RCUI, geralmente se apresentando com febre, diarreia (ocasionando perda de peso e de eletrólitos), dor abdominal e períodos assintomáticos que podem durar semanas a meses. Pacientes com DC, manifestada no cólon, pode apresentar perda de sangue fecal, evidente ou oculta, podendo acarretar anemia e também outras complicações hepáticas e renais (CASTRO *et al.*, 2002; ROBBINS E CONTRAN, 2005). Na sua fase crônica pode surgir complicações como estenose, abscessos e fístulas.

Na RCUI os pacientes também apresentam surtos de diarreia com muco e sangue em períodos assintomáticos de meses, anos ou até décadas. Alguns pacientes podem apresentar uma única crise, leve moderada ou grave tornando-se uma emergência médica em algumas situações (ROBBINS E CONTRAN, 2005). A dor abdominal na RCUI e a diarreia com sangue são muito frequentes (CASTRO *et al.*, 2002).

A dor abdominal também está presente quase que invariavelmente em todos os pacientes com DII. Algumas características da dor podem apontar para RCUI ou DC. Por

exemplo, dor em fossa ilíaca direita recorrente e exacerbada pelas refeições pode sugerir DC enquanto dor em quadrante inferior esquerdo do abdome, tipo cólica, associada ao processo defecatório e algumas vezes à ocorrência de tenesmo pode sugerir RCUI. Os sintomas constitucionais estão comumente presentes nos pacientes com DII em atividade: emagrecimento, inapetência, febre, prostração, anemia (SCHNEIDER, 2009)

A RCUI, juntamente com a DC, compõem as DII mais frequentes da atualidade (LANNA *et al.*, 2006). Em aproximadamente 10% dos casos não é possível, diagnóstico diferencial entre RCUI e a DC retal (STHERLAND *et al.*, 2002).

## **2.2 Doença de Crohn**

A doença de Crohn (DC) compõe o elenco das chamadas de doenças inflamatórias intestinais (DII), um grupo heterogêneo de doenças cuja manifestação final comum é a inflamação, em cuja patogênese estão envolvidos diferentes fatores genéticos, imunológicos e ambientais (FEAGAN, 2003).

Neste panorama, a DC é uma doença inflamatória crônica do trato gastrointestinal, que pode envolver qualquer segmento desde a boca até ao ânus. A presença de áreas de mucosa normal intercalando áreas afetadas pela doença, isto é, o envolvimento segmentar, acometendo toda parede do órgão e com lesões tipicamente granulomatosas do intestino caracteriza a DC, diferenciando-a da retocolite ulcerativa (RCUI) que apresenta envolvimento confinado à mucosa do cólon, de forma contínua (AHMAD *et al.*, 2002).

### 2.2.1 Características clínicas

A DC apresenta ampla heterogeneidade de manifestações clínicas que variam desde formas inflamatórias até formas graves, estenosantes e fistulizantes. A morbidade da DC está relacionada com sintomas crônicos de diarreia, dor abdominal e desnutrição, os quais têm um impacto significativo na qualidade de vida. A maioria dos pacientes necessita de tratamento medicamentoso, com até 50% de terapia imunossupressora, e um número semelhante de pacientes necessitam cirurgia dentro de cinco anos após o diagnóstico (HUME; SMITH, 2002).

O padrão clínico foi classificado em: não-estenosante/não-penetrante (inflamatória) nos casos de doença inflamatória sem complicações; estenosante no caso de ocorrência de estreitamentos intestinais ou ano-retais de repetição documentados por exames radiológicos, endoscópicos ou cirúrgico-patológicos, com dilatação pré-estenótica ou com sinais ou sintomas de obstrução, sem a presença de doença penetrante; penetrante (fistulizante) nos casos de ocorrência de fístulas intra abdominais ou perianais, massas inflamatórias e/ou abscessos (S. ALMEIDA *et al*, 2004).

Os sintomas de DC tendem a ser mais variados, dependendo da localização da lesão no aparelho digestivo, e pode ocorrer de forma leve, moderada ou grave, caracterizada por ciclos de remissão e de doença ativa. As alterações funcionais da mucosa intestinal e dos resultados exames laboratoriais dos pacientes com DC são parcialmente atribuídos a um aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias na lâmina própria dos intestino grosso e delgado (KUMAR, 2002).

Histologicamente a característica marcante da DC é o acometimento transmural que pode afetar todas as camadas, da mucosa à serosa e, que apresenta um caráter descontínuo das lesões (áreas de mucosa preservada em meio às de atividade inflamatória). A primeira anormalidade é o aumento dos folículos linfóides com anel eritematoso em volta. Isto leva a úlcera aftóide que progride para ulceração profunda, fissura, fibrose, estenose e fistulização. Os achados endoscópicos são variáveis desde discretas erosões, edema, friabilidade, enantema, sendo mais característico a presença de úlceras, que podem ser aftóides, elípticas ou lineares, intercaladas por mucosa normal, assim como lesões fibroestenoses e fistulizantes (MACHADO; SCHNEIDER, 2006).

A DC ocorre em crianças e adultos, com um pico de incidência entre 15 e 30 anos. A incidência da DC tem aumentado nas últimas três décadas em quase todos os países

ocidentais. Estudos epidemiológicos mostram que a incidência e a prevalência da DC variam significativamente dependendo da área geográfica e do grupo étnico (BONEN; CHO, 2003).

Avanços científicos demonstram que a DC apresenta etiopatogenia multifatorial, envolvendo uma interação complexa entre fatores ambientais (*i.e.*, microbiota intestinal), imunológicos, e predisposição genética (CHAMBERLIN; NASER, 2006; XAVIER e PODOLSKY, 2007)

### **2.2.2 Alterações hematológicas e bioquímicas na Doença de Crohn (DC)**

Embora de etiologia multifatorial, muitos pacientes internados com exacerbação aguda de sua doença apresentam desnutrição protéico-calórica, hipoalbuminemia e anemia. Leucocitose, trombocitose, aumento nos níveis séricos de proteína C reativa (PCR) e de velocidade de hemossedimentação (VSH) podem ser decorrentes de inflamação crônica. A hipoalbuminemia e a anemia seriam marcadores de gravidade, pois têm relação não apenas com atividade de doença, mas também com desnutrição. A desnutrição é consequência da própria enfermidade e contribui para a maior susceptibilidade do paciente a infecções e complicações pós-operatórias. Estes exames laboratoriais de fácil realização e baixo custo estão disponíveis na maioria dos hospitais públicos (ELIA *et al*, 2007).

Em um estudo realizado por Salviano *et al*, 2007, os resultados do perfil bioquímico revelaram alto percentual de hipoalbuminemia, prevalência elevada de anemia, observadas através dos níveis de hematócrito e hemoglobina. Por outro lado, a maioria dos pacientes apresentava a glicose de jejum, uréia, creatinina, sódio e potássio dentro dos padrões de normalidade. No que se refere ao cálcio sérico, constatou-se níveis reduzidos, demonstrando grande vulnerabilidade desses indivíduos em relação ao metabolismo ósseo.

### **2.2.3 Doença de Crohn e as citocinas IL-10 (Interleucina-10) e TNF- $\alpha$ (Fator de Necrose Tumoral)**

Vários estudos têm demonstrado um possível envolvimento da IL-10 na patogênese de doenças inflamatórias, assim como, sua associação com o prognóstico (LECH-MARANDA *et al*, 2004 e STEWART *et al*, 1994). A IL-10 é uma citocina normalmente produzida por células T ativadas, monócitos, células B e timócitos. Ela possui forte atividade anti-inflamatória e desempenha um papel crítico na regulação da resposta imune, predominantemente através da inibição de mediadores pro-inflamatórios incluindo TNF-  $\alpha$  e IL-12 (DINESH *et al*, 2009; ZOODSMA *et al*, 2005).

O efeito inibidor da IL-10 é um importante fator limitante da duração e do dano patológico das respostas inflamatórias (MOORE *et al.*, 2001; KENDALL *et al.*, 2001; COOK *et al.*, 2001; FANG *et al.*, 2005).

Por outro lado, o TNF- $\alpha$  é um dos mediadores mais importantes nesta doença. É produzido por macrófagos ativados e tem entre outras funções, a de estimular a produção de moléculas de adesão e citocinas inflamatórias, apoptose celular, recrutamento de neutrófilos para os locais de inflamação, ativação da coagulação e indução da formação de granulomas (SANDBORN e HANAUER, 1999).

O TNF- $\alpha$  está envolvido com o desencadeamento da resposta imune, indução do evento inflamatório agudo e transição para inflamação crônica e persistência da mesma (BURGUER; DAYER, 1995). Ele também contribui para a inibição da resposta inflamatória pela estimulação da liberação de IL-10 (McCOLM *et al.*, 2000). Por outro lado, a deficiência de produção de TNF-  $\alpha$  em experimentos animais está associada à incapacidade de combater uma ampla gama de infecções (ELSAS, 2001). O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória, secretada por macrófagos ativos e localizado no cromossomo 6 (região p.21.3) (KIRKPATRICK *et al.*, 2004, DUARTE *et al.*, 2005). Na mucosa intestinal contribui para a resposta Th1 patogênica. Admite-se que o TNF- $\alpha$  tem papel central na patogenia da inflamação da mucosa na DC, sendo considerado o protótipo de citocina pró-inflamatória. (PAPADAKIS E TARGAN, 2000)

A combinação de efeitos sobre células imunes (recrutamento e estimulação) e células endoteliais (ativação por estímulo de síntese de moléculas de adesão E-selectina e ICAM-1) conduz a recrutamento de monócitos e linfócitos T ativados para a mucosa intestinal e formação de granulomas. Quando induz produção de metaloproteinases por células do estroma contribui para a lesão tecidular. Induz a produção de citocinas e quimiocinas por células endoteliais e mononucleadas da mucosa, nomeadamente de IFN-gama independente da IL-12 ou IL-18. O TNF-  $\alpha$  em associação com IFN-gama pode motivar apoptose de células vilositárias contribuindo para alterações da barreira epitelial e perpetuação da resposta inflamatória (PAPADAKIS E TARGAN, 2000)

Vários estudos demonstraram um aumento do TNF-  $\alpha$  no soro, fezes e mucosa intestinal de indivíduos com DC (KUCHARZIK, 2006). O bloqueio do TNF- $\alpha$  por anticorpos monoclonais (Infliximab) diminui as respostas Th1, sendo por isso usado como uma forma de tratamento eficaz na DC moderada a severa, com melhorias em termos clínicos e endoscópicos (SHIH e TARGAN, 2008).

Na DC, os macrófagos e as células dendríticas (CD) não só estão aumentadas em número, como também expressam de forma exagerada TLR2 e TLR4, moléculas co-estimuladoras e produzem mais citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e IL-6, com a consequente ativação de células Th1 (DANESE E FIOCCHI, 2006). Além disso, as CD produzem menos IL-10, o que diminui as respostas reguladoras (BAMIAS; COMINELLI, 2007).

#### **2.2.4 Aspectos moleculares na Doença de Crohn(DC)**

Durante a última década, mudanças gradativas ocorreram em relação ao conceito da imunopatogênese da DC, direcionando a atenção para o importante papel da imunidade inata. O reconhecimento de antígenos bacterianos pelos receptores de padrões moleculares associados à patógenos, representados pelos receptores *Toll-like* (TLR) e proteínas do domínio de oligomerização nucleotídea (NOD) (*nucleotide oligomerization domain*) expressados nas células sentinelas da barreira epitelial intestinal, releva que as células epiteliais, dendríticas, e macrófagos podem estar na posição de comando da imunidade da mucosa normal e na inflamação (FIOCCHI, 2007; BAMIAS e COMINELLI, 2007). Uma falha na resposta imune inata parece ser o defeito primário na DC, como a alteração de sinalização do NOD2 e outras deficiências ainda não identificadas (XAVIER e PODOLSKY, 2007).

Os fatores genéticos de susceptibilidade à DC são evidenciados por estudos que demonstram maior concordância da doença em gêmeos monozigóticos que em dizigóticos, e em estudos de agregação familiar (BAYLESS *et al.*, 1996; COLOMBEL *et al.*, 1996; FIOCCHI, 1998; RICHARD, 2003). A maioria dos estudos demonstra frequência de 5% a 20% de doença inflamatória intestinal na história familiar dos pacientes com DC (RICHARD, 2003). Atualmente, a pesquisa de genes relacionados à susceptibilidade da DC representa um grande desafio por causa da complexidade dos fatores genéticos envolvidos, incluindo a ausência de um mecanismo de transmissão mendeliano, a penetrância gênica, a heterogeneidade genética, e a multiplicidade de genes de susceptibilidade envolvidos (DUERR *et al.*, 2003; ZHENG *et al.*, 2003; MENDOZA e TAXONERA, 2005).

### 2.2.5 Polimorfismos genéticos

Estudos de associação de genes candidatos a doenças utilizam como ferramenta a análise de sítios polimórficos. Polimorfismo refere-se à ocorrência simultânea na população, de genomas que apresentam variações alélicas que podem produzir diferentes fenótipos. São caracterizados por sequências nucleotídicas que ocorrem randomicamente no genoma. Essas sequências são classificadas de acordo com o tamanho médio das unidades de repetições, em minissatélites, microssatélites e mutações puntiformes. Estes sítios polimórficos podem localizar-se na região codificadora, regulatória ou aparentemente silenciosa do DNA (LEWIN, 2001).

Minissatélites são repetições de 2 a 60 nucleotídeos. Microssatélites incluem sequências contendo repetições *em tandem* de 1 a 4 pb, distribuídos ao longo do genoma. Mutações puntiformes ou SNP's (*single nucleotide polymorphism*) consistem em mudança de um único nucleotídeo, ocorrem comumente no genoma humano na frequência de 1 a cada 1000 pb. É a mais abundante forma de variação genética entre indivíduos da mesma espécie. Apesar da maioria não influenciar na expressão gênica, ou seja, não modificar funcionalmente a proteína, estão sendo muito utilizados como marcadores genéticos de doenças (LEWIN, 2001).

Técnicas modernas tem sido utilizadas para análise de SNPs. A identificação de SNP's por genotipagem em larga escala com a utilização de painéis de oligonucleotídeos e posterior sequenciamento do DNA, permite a rápida identificação de marcadores de doenças e seus haplótipos (JORDAN *et al.*, 2002).

Na última década, vários estudos de análise de ligação seguidos por estudos de análise sistêmica do genoma demonstraram evidências de polimorfismos genéticos associadas a DC em muitos genes. Esforços conjuntos em vários centros de pesquisa têm alcançado sucesso na identificação de genes na DC, incluindo CARD15 (NOD2) (HUGOT *et al.*, 2001; OGURA *et al.*, 2001), *DLG5* (STOLL *et al.*, 2004), *SLC22A4* e *SLC22A5* (PELTEKOVA *et al.*, 2004), *CARD4* (*NOD1*) (McGOVERN *et al.*, 2005), *IL23R* (DUERR *et al.*, 2006), *ATG16L1*, *PHOX2B* e *NCF4* (RIOUX *et al.*, 2007; PARKES *et al.*, 2007). No entanto, nenhum dos *loci* destes genes confere um risco relativo maior que 2, comprovando que a DC é um distúrbio poligênico complexo (RIOUX *et al.*, 2000; AHMAD *et al.*, 2004; HUGOT e JUNG, 2006).

### 2.2.6 Polimorfismos da IL-10 e da TNF- $\alpha$ na Doença de Crohn

Evidências sugerem que fatores do hospedeiro são de primordial importância para a manifestação clínica da doença. Genes de citocinas inflamatórias, ou regiões nos seus promotores têm polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP's) que influenciam a taxa e magnitude de produção de citocinas. Muitos SNPs em genes de citocinas têm sido associados com a predisposição para o desenvolvimento de uma variedade de doenças inflamatórias. Vários estudos têm demonstrado um possível envolvimento da IL-10 na patogênese de doenças inflamatórias, assim como, sua associação com o prognóstico. O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1. Três SNPs na região promotora do gene IL-10 foram identificados nas posições -1082, - 819 e -592. O polimorfismo na região -G1082A tem se mostrado importante na determinação na produção alta, média e baixa da interleucina 10 (RAM *et al*, 2003).

Pela importância recentemente demonstrada de polimorfismos dos genes relacionados à resposta imune inata na fisiopatologia da DC, como por exemplo, os genes IL-10 (Interleucina-10) e TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral  $\alpha$ ) principalmente pela implicação do risco étnico específico para a evolução e complicações encontradas na DC entre subgrupos populacionais diferentes (ANDERSEN *et al*. 2010).

Putignano *et al* 2011, estudando indivíduos com DC da região da Toscana (Itália), obtiveram uma relação positiva comprovada de SNPs A/T, analisados num promotor do gene da IL-10 relacionados com a produção desta citocina, corroborando assim com o potencial terapêutico deste alvo.

O TNF- $\alpha$  desempenha um papel importante na defesa contra a infecção. O gene TNF-  $\alpha$ , que codifica a proteína TNF- $\alpha$ , é em parte regulado a nível transcrricional e vários estudos sugerem que polimorfismos no promotor deste gene podem ter um papel determinante na susceptibilidade à doença. Um dos polimorfismos relevantes é o TNF- $\alpha$  (-G308A), que está associado a uma produção aumentada da proteína respectiva (DUARTE *et al*, 2005)

Existem diversos estudos que apontam para uma associação entre o polimorfismo TNF-  $\alpha$  -308 e DC (LOUIS *et al.*, 2000; VATAY *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2004; FERREIRA *et al.*, 2005; SANCHEZ *et al.*, 2009). Frequentemente a frequência do alelo TNF-  $\alpha$  -308A tem também sido descrita como mais alta nas formas cólicas e fistulizantes da doença (KOSS *et al* 2000, LOUIS *et al.*, 2000). O alelo TNF- $\alpha$  (-308) foi ainda associado a risco aumentado de manifestações extra-intestinais como a artrite, eritema nodoso e sarcoidose (GONZALEZ *et al*, 2003).

Embora os fatores genéticos e ambientais contribuam em larga medida para os distúrbios imunológicos observados nesta doença, a compreensão dos mecanismos imunitários ajuda-nos a definir novas bases de tratamento (KUCHARZIK, 2006).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Geral**

Avaliar se existe associação entre polimorfismos das Regiões Promotoras dos genes da Interleucina-10 (-G1082A) e da TNF- $\alpha$ (-G308A), com alterações hematológicas e bioquímicas nas diferentes formas clínico-anatômicas da doença de Crohn em uma população do nordeste brasileiro.

#### **3.2 Específicos**

- 3.2.1 Determinar as frequências genotípica e alélica dos polimorfismos na região promotora (-G1082A) do gene da IL-10 e do gene da TNF $\alpha$  -308 (-G308A), utilizando as técnicas de PCR-AS (Reação em cadeia polimerase-alelo específica) e de PCR-RFLP (Reação em cadeia polimerase-polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de digestão), respectivamente, em uma população com a doença de Crohn e em grupo-controle de indivíduos sem doença inflamatória intestinal;
- 3.2.2 Correlacionar os polimorfismos encontrados na doença de Crohn em suas diferentes formas anatomo-clínicas (inflamatória, fistulizante e estenosante) e suas características clínicas (idade, localização, entre outros)
- 3.2.3 Estabelecer o perfil hematológico e bioquímico dos pacientes com doença de Crohn e correlacionar este perfil com as diferentes manifestações clínicas da doença.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 População**

Foram selecionados 49 pacientes (entre 14 a 81 anos) com diagnóstico de doença de Crohn, que são regularmente atendidos no Serviço de Gastroenterologia/Coloproctologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e no serviço de Proctologia do Hospital Barão de Lucena SES/PE, no período de janeiro/2011 a julho/2011. Foram usadas para controle 76 amostras de DNA de seres humanos sadios do banco de DNA do Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento Prof(a). Tânia Falcão/UFRPE.

O critério de inclusão dos pacientes foi o diagnóstico confirmado de DC estabelecido por meio de achados clínicos, radiológicos, endoscópicos e histopatológicos, de acordo com os critérios da classificação de Lennard-Jones (1989). As informações de idade de diagnóstico, gênero, localização e comportamento da DC foram organizadas de acordo com a Classificação de Vienna (1998) modificado.

Como critérios de exclusão foram dispensados aqueles pacientes com colite indeterminada ou que tenham sofrido qualquer processo cirúrgico recente devido a distúrbios gastrointestinais. Também foram excluídos da pesquisa aqueles pacientes que não tiverem nascidos no Brasil.

### **4.2 Aspectos éticos**

Os indivíduos que foram selecionados e aceitaram participar do estudo, de acordo com os critérios citados, assinaram um de Termo de consentimento livre e esclarecido (**Apêndice A**).

O projeto foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do CCS/UFPE sob número de protocolo nº: 222/10, folha de rosto nº: 349673 e CAAE nº: 0223.0.172.000-10.

### **4.3 Aspectos epidemiológicos e clínicos**

A fim de estabelecer correlação entre os possíveis agentes causais ou contributivos para a lesão em estudo, os fatores como gênero, faixa etária, peso, escolaridade e doenças associadas foram obtidos através da análise da ficha clínica dos pacientes.

Foram levantados dados de achados clínicos, radiológicos, endoscópicos (colonoscopia) e histopatológicos para determinação da forma anátomo-clínica e localização

da doença no trato gastrointestinal, além do Índice de Atividade da Doença de Crohn(CDAI). Informações em relação ao tratamento, histórico familiar e manifestações extra-intestinas também foram analisadas.

#### **4.4 Análise do polimorfismo gênico**

##### **4.4.1 Local**

O estudo genético foi realizado no Laboratório de Genética, Bioquímica e Sequenciamento de DNA Prof(a). Tânia Falcão, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

##### **4.4.2 Extração do DNA Gênomico**

As amostras clínicas obtidas através da punção venosa foram colocadas em tubo estéril de 5 ml contendo EDTA(anticoagulante) para ser realizada a posterior extração do DNA genômico dos linfócitos utilizando-se o “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (PROMEGA®) de acordo com as instruções do fabricante. Para extração, esta mistura foi incubada por 10 min em temperatura ambiente. Posteriormente, após homogeneização das amostras, uma alíquota de 300 µL de sangue total foi transferida para um tubo eppendorf estéril de 1,5mL, adicionado 900µL de solução de lise celular e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos, sendo invertido gentilmente de 2 a 3 vezes durante esse período. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 30s. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado, o pellet foi agitado no vortex por 15 segundos e re-suspenso em 300 µL de solução de lise do núcleo, misturando-se o material por inversão 3 a 4 vezes, durante o período de incubação em temperatura ambiente por 10 minutos. Novamente as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 30s, seguido de descarte do sobrenadante. Em seguida, foi adicionado 100 µL da solução de precipitação de proteínas e a mistura foi agitada em vortex (10 a 20 segundos), incubada por 10 minutos à temperatura ambiente e depois centrifugado por 13.000 rpm por 3 min. O sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo eppendorf estéril de 1,5mL. Foi adicionado a esse novo tubo 300 µL de isopropanol para precipitação do DNA e posterior centrifugação a 13.000 rpm por 3 min. Logo após centrifugação e posterior descarte do sobrenadante, foi adicionado ao pellet 1.000µL de etanol a 70% seguido de centrifugação a 13.000rpm por 2 minutos à temperatura de 4°C. O etanol foi retirado cuidadosamente e o tubo foi invertido em papel absorvente e deixado aberto para secar completamente em temperatura ambiente. Finalmente, o pellet foi

ressuspensão em 100 µL de solução de rehidratação. Após a extração as amostras foram tratadas com RNase e posteriormente mantidas a uma temperatura de -20°C.

#### **4.4.3 Análise do polimorfismo -308 (G>A) na região promotora do Gene TNF- $\alpha$ pela técnica de PCR-RFLP (polimorfismo dos comprimentos dos fragmentos de digestão) descrita por Cabrera *et al*, 1995)**

A reação foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: em um volume final de 20 µl, foi utilizado 10 µl de MasterMix 1X(Promega®), 0,5 µl do primer (senso): 5'-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3' e 0,5 µl do primer (antisenso): 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3', 7,0µl de água DEPC e 2,0 µl de DNA.

A reação foi incubada no termociclador PTC-100 (MJ Research) nas seguintes condições de amplificação: um ciclo de desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos, seguidos por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. O tamanho do produto amplificado foi de 107 pb.

Após a PCR, o produto amplificado (107 pb) foi submetido à digestão enzimática utilizando a endonuclease Nco I. Em um volume final de 15 µl, foi aplicado 1,5µl de Buffer (1x), 0,2µl de BSA (Bovine Serum Albumin-Albumina bovina), 0,5µl da enzima de restrição (Nco I), 2,8µl de Água DEPC e 10µl do produto do amplificado e posteriormente incubado à 37 °C por 4 horas. Na presença do alelo G, há reconhecimento do sítio de restrição pela enzima Nco I, ocorrendo a clivagem do produto amplificado de 107 pb em dois fragmentos, um de 87 pb e outro de 20 pb. Já na presença do alelo A, presente na posição -308 do gene mutado (G>A), há consequentemente alteração no sítio de restrição, não havendo reconhecimento pela enzima Nco I. Com isso, não há o corte e o produto amplificado (107 pb) permanece inalterado.

Após a digestão, o produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 3,0% em tampão TAE (Tris Acetato a 400mM e EDTA a 10mM). Foram aplicados 9µl do produto da digestão, diluídos em 0,5µl de tampão de corrida Blue Green (LGC Bio). Foi aplicado no gel 5µl do marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb (Invitrogen). A separação eletroforética foi realizada a 80V por 30 min.

#### **4.4.4 Análise do polimorfismo -1082(G>A) do Gene IL-10 PCR Alelo – Específico pela técnica ARMS-PCR (Amplification Refractory Mutation System), descrita por CRILLY *et al*, 2003.**

A reação foi realizada utilizando os seguintes parâmetros: em um volume final de 20µl, foi utilizado 10 µl de MasterMix 1X(Promega®), 0,5µl de cada primer, 7,0µl de água DEPC e 2,0 µl de DNA. Os primers utilizados foram os seguintes: primer A (senso): 5'-CCTATCCCTACTTCCCCC-3', o primer G (senso): 5'CCTATCCCTACTTCCCCT-3' e um primer Genérico (antisenso): 5'CCTATCCCTACTTCCCCT 3'.

A reação foi incubada no termociclador PTC-100 (MJ Research) nas seguintes condições de amplificação: um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, seguidos por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minutos, 59°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e um ciclo de extensão final a 72°C por 5 min. O tamanho do produto amplificado foi de 152 pb.

Após a PCR os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE (Tris Acetato a 400 mM e EDTA a 10 mM). Foram aplicados 9 µl do produto da ARMS-PCR, diluídos em 0,5µl de tampão de corrida Blue Green (LGC Bio). Foi aplicado no gel 5µl do marcador de peso molecular(ladder) de 100 pb (Invitrogen). A separação eletroforética foi realizada a 80V por 30 min.

#### **4.5 Estudo Bioquímico**

Foram colhidos através de punção venosa à vácuo, 6 mL de sangue, em tubo seco com gel separador. Após a formação de coágulo, o material foi submetido à centrifugação de 3.000 RPM durante 5 minutos para obtenção de soro.

A dosagem bioquímica da proteína C reativa ultra-sensível (VR: 0,0 a 5,0 mg/dL) foi realizada no setor de bioquímica do laboratório de análises clínicas do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) da Universidade de Pernambuco (UPE). A referida dosagem foi processada por metodologia automatizada, nefelometria, do equipamento COBAS INTEGRA 400 PLUS da marca ROCHE®.

#### **4.6 Análise hematológica**

Foram colhidos através de punção venosa à vácuo, 5 mL de sangue, em tubo com EDTA (anticoagulante), para obtenção de sangue total. Foram também confeccionados no momento da coleta, estiraços em lâmina de microscopia que foram posteriormente corados através de corantes panóticos rápidos.

Os exames hematológicos (hemograma completo e VSH) foram realizados no setor de hematologia do laboratório de análises clínicas do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) da Universidade de Pernambuco (UPE). O hemograma foi realizado por metodologia automatizada do aparelho XD-2100 da marca SYSMEX®, seguido de revisão microscópica da lâmina pelo pesquisador. Já o VSH foi realizado por metodologia manual (método de Wintrobe).

#### **4.7 Análise Estatística**

A existência de associações entre variáveis categóricas foi realizada utilizando o teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, de acordo ao tamanho das amostras. A magnitude dessas associações foi estimada com o odds ratios (OR), utilizando intervalos de confiança de 95%. As comparações de distribuição entre variáveis contínuas foram realizadas através de métodos não paramétricos (Testes de Mann-Whitney, Wilcoxon ou Kruskal-Wallis). Todos os testes foram de duas caudas e um valor de p menor que 0,05, indicativo de significância estatística. Foram calculadas as frequências genóticas e alélicas dos polimorfismos analisados. Para estas análises foram utilizados os programa BioEstat 5.0 e Prisma 3.0..

## **5. RESULTADOS:**

### **5.1 ARTIGO ORIGINAL 1**

#### **Interleukin-10 (IL-10) and Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) genotypes in Brazilian patients with Crohn's Disease**

Wagner Neves Fernandes<sup>1</sup>

Luciana Pinto Santos<sup>2</sup>

Hildson Dornelas Angelo<sup>3</sup>

Valéria Ferreira Martinelli<sup>4</sup>

Maurílio Toscano<sup>5</sup>

Francisco Eduardo B. de A. Lima<sup>6</sup>

Adriana Maria da S. Telles<sup>7</sup>

Paulo Roberto Eleutério de Souza<sup>8</sup>

Mário Ribeiro de Melo-Júnior<sup>7</sup>.

#### **Institutions:**

<sup>1</sup> MSc in Pathology, Health Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco (PPGP/CCS/UFPE);

<sup>2</sup> Graduate student, Health Sciences Center, Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE);

<sup>3</sup> Post-graduate program in Genetics, Universidade Federal de Pernambuco (PPGG/UFPE);

<sup>4</sup> MSc in Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE);

<sup>5</sup> PhD in Surgery, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE);

<sup>6</sup> PhD in Surgery, Professor of Surgery, Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE);

<sup>7</sup> Professor Doctor of Department of Pathology, Universidade Federal de Pernambuco (PPGP/CCS/UFPE);

<sup>8</sup> Professor Doctor of Department of Biology, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE);

Correspondence to: Prof. Mario Ribeiro de Melo-Júnior

Av. Prof. Moraes Rego 1235, Cidade Universitária, 50670-901, Recife, PE, Brazil;

e-mail: mariormj@gmail.com

Runnig title: Interleukin-10 and Tumor Necrosis Factor promoter polymorphisms and Crohn's disease

**ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA HUMAM IMMUNOLOGY**  
**QUALIS CAPES: ÁREA MEDICINA II, ESTRATO A2**  
**FATOR DE IMPACTO: 2.837**

## ABSTRACT

Crohn's Disease (CD) is a recurrent chronic inflammatory disease characterized by segmental transmural inflammation that may affect any part of the digestive tract. Polymorphisms in cytokines genes may play an important role in the development and clinical manifestation. Due to this, there is a great interest in the identification of biomarkers that which could quantify the susceptibility and disease activity. A case-control study of 49 CD cases and 132 CD-free adults controls, was performed to analyze whether or not the polymorphisms of the TNF- $\alpha$  gene promoter at positions -308 G/A and IL-10 gene promoter at positions -1082 G/A would alter the risk for CD and clinical manifestations. Genotyping was carried out by polymerase chain reaction, PCR products to TNF- $\alpha$  polymorphism were digested by NcoI restriction enzyme and fractionated after on 2% Agarose gel and visualized posteriorly staining by ethidium bromide, while the PCR products to IL-10 polymorphism were fractionated on 1.5% Agarose gel and visualized posteriorly staining by ethidium bromide. There were not significant differences in the distribution of the TNF- $\alpha$  and IL-10 gene polymorphisms between the CD and control groups. Moreover, no association was observed between genotypic distribution of CD patients and localization or behavior's disease. Our data support the hypothesis that the TNF- $\alpha$ /IL-10 genotypes did not play an important role in pathogenesis of Crohn's disease in Brazilian Northeast.

**Keywords:** Crohn's Disease; Cytokines; Tumor necrosis factor alpha; Interleukin 10; Polymorphisms.

## 1. INTRODUCTION

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory disease characterized by segmental transmural inflammation that may affect any part of the gastrointestinal tract. Its evolution may be complicated with the development of internal or enterocutaneous fistulas [1]. The symptoms of CD tend to be more varied, depending on its site in the digestive tract, and can occur in a mild, moderate or severe form characterized by cycles of remission and active disease [2]. Functional changes of the intestinal mucosa and systemic biochemical laboratory findings of CD patients are partially attributed to an increased secretion of proinflammatory cytokines in the small and large bowel lamina propria [3].

Pro-inflammatory cytokines involved in CD are part of a complex signaling network that is not completely understood. TNF- $\alpha$  is an important pro-inflammatory cytokine that is involved in systemic inflammation, and stimulates acute phase reactions [4]. Several SNPs in the TNF- $\alpha$  promoter region are known to affect the level of gene expression. Two SNPs located at nucleotides -238 and -308 have been previously described that a G/A substitution at position -308 in the promoter region of the TNF- $\alpha$  gene increases TNF- $\alpha$  transcription [5-6]. Such variations in the TNF- $\alpha$  promoter region have previously been associated with susceptibility to a range of immune disorders, including asthma [7], psoriasis [8], rheumatoid arthritis [9] and CD [10-15]

Interleukin 10 (IL-10) is a pleiotropic cytokine with strong immunosuppressive properties. This protein is mainly produced by activated T cells, activated monocytes/macrophages, stimulated B cells, and mast cells [16]. The 5'-flanking region of the IL-10 gene is highly polymorphic, with three single base pair substitutions at position -1082 G/A, -819 C/T, and -592 C/A, which results in differential IL-10 production, since the SNP at position -1082 is lying within a putative ETS-like transcription factor-binding site [17]. The G allele at -1082 and haplotypes containing this allele have been associated with high IL-10

production, while the A allele and the ATA haplotype have been associated with low IL-10 production [18]. Several evidences suggest that IL-10 could be a strong candidate gene influencing CD susceptibility [19].

Several studies have shown the possible involvement of IL-10 in the pathogenesis of CD, as well as its association with prognosis [20-21]. Some studies on IL-10 polymorphism association with IBD and with other diseases have been published, reporting controversial results [15, 21-25].

The understanding of these cytokines participation in CD not only provides a better comprehension into the pathogenesis of CD but also sheds light on various clinical applications.

The aim of this study was to establish the association between TNF- $\alpha$  gene polymorphism (-308 G/A), IL-10 gene polymorphism (-1082G/A) and CD Brazilian population and evaluate the relation between this polymorphism with susceptibility and behavior of CD.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Crohn Disease patients and healthy controls**

Blood samples were collected from 49 CD patients from the Gastroenterology Clinic of the Hospital Barão de Lucena/SES/PE and Hospital das Clínicas of Pernambuco, Federal University of Pernambuco and 132 healthy volunteers, with a mean age of  $41.81 \pm 14.6$  years and  $32.00 \pm 10.53$  years, respectively. The patients were diagnosed according to the criteria of the LENNARD-JONES of 1989 [26] and classified according to the Vienna classification [27]. The Ethics Committee of the Health Sciences Center of Federal University of Pernambuco approved the study (protocol 222/2010), and written informed consent was obtained from all subjects.

### **2.2 Genotyping of TNF- $\alpha$**

Genotyping of the single nucleotide polymorphisms in the promoter region of the TNF- $\alpha$  gene (-308 G/A) was carried out by polymerase chain reaction. Primer sequences (forward primer 5'- AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3'; and reverse primer: 5'- TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3') were used. Each PCR contained 200 ng genomic DNA in a final volume of 15.0 $\mu$ l reaction which included 1.0 pmol of each primer, 1x Gotaq® ColorLess Master Mix (PROMEGA). PCR was performed on an automated DNA thermal cycle (Mastercycler personal, Eppendorf) with procedure as follows: initial denaturation at 94°C for 3 min, 30 cycles of amplification consisting of denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 52°C for 1min, extension at 72°C for 1min and in the last cycle, extension was prolonged to 5 min [28]. The PCR products were digested using 2unit/ $\mu$ l of NcoI restriction enzyme in a total volume of 25 $\mu$ l, containing 8 $\mu$ l of PCR product in supplied buffer. The

mixture was incubated at 65°C for 12-16 hours. For the -308 G/A, the PCR product size was 107 pb. After digestion, the PCR product with G and A allele was digested to 3 fragments of 107, 87 and 20 bp. The PCR product with G allele was digested to 2 fragments of 87 and 20 bp. The PCR product with A allele was not digested, shown only one fragment of 107pb. The digested PCR product was fractionated on 2% Agarose gel and visualized after staining by ethidium bromide on ultraviolet light.

### **2.3 Genotyping of IL-10**

IL-10 promoter polymorphism at position -1082 was analyzed by the PCR-ARMS (Amplification Refractory Mutation System). Briefly, a 258 bp fragment containing the polymorphism was amplified in a DNA thermal cycle machine (Mastercycler personal, Eppendorf) using specific primers (“A” forward primer 5'- ACTACTAAGGCTTCTT-TGGAA-3'; “G” forward primer 5'-CTACTAAGGCTTCTTTGGGAG-3' and reverse primer 5'-CAGTGCCAACTGAGA-ATTTGG-3') and the condition was 2 min at 95° C, 40 cycles of 15 s at 95°C, 50 s at 65°C and 50 s at 72°C, with a final extension at 72°C for 5 min. The PCR product was fractionated on 1.5% Agarose gel and visualized after staining by ethidium bromide on ultraviolet light [29].

### **2.4 Statistical Analysis**

The genotype distributions and allelic frequencies for the TNF- $\alpha$  gene polymorphisms for CD patients and healthy controls were compared using the chi-squared test. Results were considered statistically significant when the probability of findings occurring by chance was less than 5% ( $P < 0.05$ ). The odds ratios (OR) were calculated from genotypic frequency and

allelic frequency with a 95% confidence interval (CI) for the TNF- $\alpha$  and IL-10 gene polymorphisms. Statistical comparisons were performed using the BioEstat version 5.0.

### 3. RESULTS

The major clinical characteristics of CD population are given in table 1. Overall, 46.9% of patients (23/49) had extraintestinal manifestations. Of all the 49 CD diagnoses in our study, 16 patients (32.6%) were diagnosed as having non-stricturing/non-fistulizing CD, 14 patients (28.5%) with stricturing CD and 19 (38.9%) with fistulizing CD (Table 1). Only 8.2% patients (4/49) had a positive family history of CD. The frequencies of the genotypes of -308 G/A of TNF- $\alpha$  in the CD and control groups are shown in Table 2. The distributions of genotypes of TNF- $\alpha$  gene polymorphism at -308 G/A and of IL-10 gene polymorphism at -1082 G/A was in agreement with the prediction under the condition of Hardy-Weinberg equilibrium. Except the control group to IL-10 gene polymorphism (-1082 G/A).

In the CD group, 80.43% (37/46) of the patients had the G/G genotype, 19.57% (9/46) G/A genotype and none of the patients had the A/A TNF- $\alpha$  genotype. In the control group, 80.26% (61/76) had the G/G TNF- $\alpha$  genotype, 19.74% (15/76) had the G/A TNF- $\alpha$  genotype and none controls had the A/A genotype. The statistical analyses did not show significant differences in the distribution of polymorphism in the promoter region of the TNF- $\alpha$  (-308 G/A) gene between the CD and control groups. Therefore, when we analyzed the genotypic distribution between localization and CD behavior, these results also showed no statistical significant difference (Table 3).

In relation to IL-10 gene polymorphism in the CD group, 20.5% (9/44) of the patients had the G/G IL-10 genotype, 50.0% (22/44) G/A IL-10 genotype and 29.5% (13/44) A/A IL-10 genotype. In the control group, 8.4% (11/132) had the G/G IL-10 genotype, 74.2% (98/132) G/A IL-10 genotype and 17.4% (23/132) A/A IL-10 genotype. Once again, no significant association was observed between susceptibility, behavior and localization with the IL-10 (-1082 G/A) promoter polymorphism.

#### 4. DISCUSSION

The tumor necrosis factor (TNF) alpha is a key cytokine in the immune response, playing an important role in the pathogenesis of Inflammatory bowel diseases (IBD) [4]. The TNF- $\alpha$  gene is located on chromosome 6 in a region containing the IBD3 locus [30], and several studies have implicated TNF- $\alpha$  promoter polymorphisms (-308 G/A) as potential determinants of CD susceptibility. A number of studies have been published on TNF- $\alpha$  polymorphisms in several populations [7,31-33], mainly focusing in the promoter region of the gene. In some of these, their results indicated that the TNF- $\alpha$  gene does not contribute to the risk of developing CD in Spanish [34 ], Australian [25], Czech [35], Irish [8], Brazilian [36], Dutch [37], Chinese [38], Canadian [39], and Caucasian [40] population. However, other studies in Belgian [10], Portuguese [13-14], Hungarian [11] and Korean [12, 41] population did show association between TNF- $\alpha$  -308 polymorphism and CD. In the present study, we found a statistically no significant association between the polymorphism at position -308 in the promoter region of the TNF- $\alpha$  gene and CD (Table 2).

Some studies have also reported associations between TNF- $\alpha$  polymorphisms and CD clinicopathological phenotype, although no clear picture has emerged yet [5, 10, 34]. The A allele has been associated with high transcriptional promoter activity [5]. These polymorphisms would therefore lead to severe and sustained inflammation of the digestive tract and ultimately to the development of CD. We have not found any other association between disease localization and behavior of CD with the TNF- $\alpha$  promoter polymorphism. Similar outcomes were found in Portuguese [13-14] and Dutch population [37]. However, Louis and coworkers [10] studying a Belgian population found association between TNF2 and behavior and CD colonic, while Sanchez and coworkers [15] found the TNF1/TNF1 genotype associated with the upper digestive tract and the TNF1/TNF2 genotype with the terminal ileum location in Canadian population. Thus, it is interesting to speculate that the variability

in the results may be due to genetic/ethnic variations among different populations and/ or the presence of different phenotypes among the patients in different studies.

In fact, the actions of cytokines may be deeply conditioned by the presence of other cytokines, particularly in the case IL-10 and TNF- $\alpha$ , which are mutually regulated and play opposing functional roles in inflammatory responses. Whereas TNF- $\alpha$  is a prototype of a pro-inflammatory molecule, IL-10 is mainly recognized for its anti-inflammatory activity [42], thus, IL-10 is a key player in the homeostasis of the intestinal immune system. Due to its anti-inflammatory effects they are significant for the development and maintenance of chronic inflammation and autoimmune disorders, including IBD [22]. It has been traditionally hypothesized that patients with IBD would be more likely to have an IL-10 low producer genotype, especially CD, considered a T<sub>H</sub>1-mediated disease [23]. Polymorphisms in the promoter region of IL-10 have been reported to influence gene expression, one of them, the SNP at the IL-10 -1082 position has been associated with conflicting results to contribute to the risk of developing CD [15,21-25].

There is some evidence that the IL-10-1082A allele results in a lower production of IL-10 protein compared with the -1082G allele [43], and it is known that patients with low IL-10 levels have a high CD susceptibility [20-21,24]. In this study it was observed a great number of IL-10 -1082A/A genotype in patients group, however, it has not demonstrated significant difference. Similarly to our outcomes, previous studies were unable to find association between CD susceptibility and the IL-10 promoter polymorphism in Canadian [15], Danish [22], Korean [12], Ireland [8] and Spanish population [23]. In addition, we evaluated whether the SNP (-1082 G/A) could influence in the localization or behavior of CD, although none significant association was found. The same was observed by Koss in Caucasian [44], nevertheless, Fowler [25] and Sanchez [15] studying Australian and Canadian population, observed a significant association between G/G genotype with CD behavior and

colonic location, respectively. Several reasons could explain this discrepancy on the effect of the genotypic distribution on behavior or localization of CD: genetic heterogeneity of the clinical populations examined, different definitions of CD phenotypes among different populations and perhaps environmental factors may also contribute to CD behavior.

In conclusion, our observations suggest the -308 TNF- $\alpha$  and -1082 IL-10 polymorphism don't contribute to predispose individuals to localization, behavior or CD susceptibility in Brazilian population.

## **5. ACKNOWLEDGMENTS**

We thank the patients and their families, whose collaboration and understanding have made this work possible. This study was supported by the Brazilian funding agencies FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

## 6. REFERENCES

- [1]. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347: 417.
- [2]. Kumar P, Clarck M. *Clinical Medicine*. 5th ed. London, UK: WB Saunders; 2002.
- [3]. Reinecker HC, Steffen M, Witthoeft T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott RP, et al.. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993; 94: 174.
- [4]. Satsangi J, Parkes M, Jewell DP, Bell JI. Genetics of inflammatory bowel disease. *Clin Sci (Lond)* 1998; 94: 473.
- [5]. Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 3195.
- [6]. Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. *Hum Immunol* 2001; 62: 1191.
- [7]. Moffatt, MF, Cookson, WO. Tumour necrosis factor haplotypes and asthma. *Hum Mol Genet.* 1997; 6(4): 551-4.
- [8]. Balding J, Livingstone WJ, Conroy J, Mynett-Johnson L, Weir DG, Mahmud N, et al.. Inflammatory bowel disease: the role of inflammatory cytokine gene polymorphisms. *Mediators Inflamm* 2004; 13: 181.
- [9]. Mulcahy B, Waldron-Lynch F, McDermott MF, Adams C, Amos CI, Zhu DK, et al.. Genetic variability in the tumor necrosis factor-lymphotoxin region influences susceptibility to rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 1996; 59: 676.
- [10]. Louis E, Belaiche J. Genetics of Crohn's disease behaviour. *Acta Gastroenterol Belg* 2000; 63: 377.
- [11]. Vatay A, Bene L, Kovács A, Prohászka Z, Szalai C, Romics L, et al.. Relationship between the tumor necrosis factor alpha polymorphism and the serum C-reactive protein levels in inflammatory bowel disease. *Immunogenetics* 2003; 55: 247.
- [12]. Kim TH, Kim BG, Shin HD, Kim JW, Kim CG, Kim JS, et al.. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in Korean patients with inflammatory bowel disease. *Korean J Gastroenterol* 2003; 42: 377.

- [13]. Almeida AC, Ferreira P, Canedo F, Pereira C, Figueiredo R, Seruca JC, et al.. Diferentes subtipos clinico patológicos da doença de Crohn podem ser definidos por variantes dos genes Nod2/Card15 e TNFa. *J Port Gastreterol* 2004; 11: 302-310.
- [14]. Ferreira AC, Almeida S, Tavares M, Canedo P, Pereira F, Regalo G, et al.. NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 331.
- [15]. Sanchez R, Levy E, Costea F, Sinnott D. IL-10 and TNF-alpha promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3776.
- [16]. Opal SM, Depalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117 (4): 1162-72.
- [17]. Lazarus M, Hajeer AH, Turner D, Sinnott P, Worthington J, Ollier WE, et al.. Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1997; 24: 2314.
- [18]. Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, et al.. Genetic influence on cytokine production in meningococcal disease. *Lancet* 1997; 349: 1912-3.
- [19]. Roh JW, Kim MH, Seo SS, Kim SH, Kim JW, Park NH, et al.. Interleukin-10 promoter polymorphisms and cervical cancer risk in Korean women. *Cancer Lett* 2002; 184: 57.
- [20]. Tagore A, Gonsalkorale WM, Pravica V, Hajeer AH, McMahon R, Whorwell PJ, et al.. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens* 1999; 54: 386.
- [21]. Klein W, Tromm A, Griga T, Fricke H, Folwaczny C, Hocke M, et al.. The IL-10 gene is not involved in the predisposition to inflammatory bowel disease. *Electrophoresis* 2000; 21: 3578.
- [22]. Andersen V, Ernst A, Christensen J, Østergaard M, Jacobsen BA, Tjønneland A, et al.. The polymorphism rs3024505 proximal to IL-10 is associated with risk of ulcerative colitis and Crohns disease in a Danish case-control study. *BMC Med Genet* 2010; 11: 82.
- [23]. Fernandez L, Martinez A, Mendoza JL, Urcelay E, Fernandez-Arquero M, Garcia-Paredes J, et al.. Interleukin-10 polymorphisms in Spanish patients with IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 739.
- [24]. Wang AH, Lam WJ, Han DY, Ding Y, Hu R, Fraser AG, et al.. The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. *Hum Immunol* 2011; 72: 431.

- [25]. Fowler EV, Eri R, Hume G, Johnstone S, Pandeya N, Lincoln D, et al.. TNFalpha and IL10 SNPs act together to predict disease behaviour in Crohn's disease. *J Med Genet* 2005; 42: 523.
- [26]. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1989; 170: 2.
- [27]. Gasche C, Scholmerich J, Brynskov J, D'Haens G, Hanauer SB, Irvine EJ, et al.. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 8.
- [28]. Cabrera M, Shaw MA, Sharples C, Williams H, Castes M, Convit J, et al.. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. *J Exp Med* 1995; 182: 1259-64.
- [29]. Crilly A, Hamilton J, Clark CJ, Jardine A, Madhok R. Analysis of the 5' flanking region of the interleukin 10 gene in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology (Oxford)* 2003; 42: 1295-8.
- [30]. Hampe J, Shaw SH, Saiz R, Leysens N, Lantermann A, Mascheretti S, et al.. Linkage of inflammatory bowel disease to human chromosome 6p. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 1647.
- [31]. Knight JC, Udalova I, Hill AV, Greenwood BM, Peshu N, Marsh K, et al.. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. *Nat Genet* 1999; 22: 145.
- [32]. Correa PA, Gomez LM, Cadena J, Anaya JM. Autoimmunity and tuberculosis. Opposite association with TNF polymorphism. *J Rheumatol* 2005; 32: 219.
- [33]. Castro-Santos P, Suarez A, Mozo L, Gutierrez C: Association of IL-10 and TNFalpha genotypes with ANCA appearance in ulcerative colitis. *Clin Immunol* 2007;122:108.
- [34]. González S, Rodrigo L, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, Fuentes D, Niño P, et al.. TNF-alpha -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 1101.
- [35]. Sýkora J, Subrt I, Didek P, Siala K, Schwarz J, Machalová V, et al.. Cytokine tumor necrosis factor-alpha A promoter gene polymorphism at position -308 G-->A and pediatric inflammatory bowel disease: implications in ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 479.

- [36]. Santana G, Bendicho MT, Santana TC, Reis LB, Lemaire D, Lyra AC. The TNF- $\alpha$  -308 polymorphism may affect the severity of Crohn's disease. *Clinics (Sao Paulo)* 2011; 66: 1373.
- [37]. Bouma G, Xia B, Crusius JB, Bioque G, Koutroubakis I, Von Blomberg BM, et al.. Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1996; 103: 391.
- [38]. Song Y, Wu KC, Zhang L, Hao ZM, Li HT, Zhang LX, et al.. Correlation between a gene polymorphism of tumor necrosis factor and inflammatory bowel disease. *Chin J Dig Dis* 2005; 6: 170.
- [39]. Zipperlen K, Peddle L, Melay B, Hefferton D, Rahman P.. Association of TNF-alpha polymorphisms in Crohn disease. *Hum Immunol* 2005; 66: 56.
- [40]. Ferguson LR, Huebner C, Petermann I, Gearry RB, Barclay ML, Demmers P, et al.. Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 4652.
- [41]. Yang SK, Lee SG, Cho YK, Lim J, Lee I, Song K. Association of TNF-alpha/LTA polymorphisms with Crohn's disease in Koreans. *Cytokine* 2006; 35: 13.
- [42]. Van Deventer SJ. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* 1997; 40(4): 443.
- [43]. Gibson AW, Edberg JC, Wu J, Westendorp RG, Huizinga TW, Kimberly RP. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2001; 166: 3915.
- [44]. Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun* 2000; 1: 185.

Table 1. Clinical characteristics of the CD group

| Clinical Characteristics                                                            | Patients, n = 49 (%) |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| Age at diagnosis                                                                    |                      |
| < 40 years                                                                          | 31 (63.3)            |
| ≥ 40 years                                                                          | 18 (36.7)            |
| Sex                                                                                 |                      |
| Male                                                                                | 26 (53.1)            |
| Female                                                                              | 23 (46.9)            |
| Location                                                                            |                      |
| Colonic                                                                             | 13 (31.7)            |
| Small bowel                                                                         | 8 (19.5)             |
| Upper GI                                                                            | 1 (2.4)              |
| Mixed location                                                                      | 19 (46.4)            |
| Behavior                                                                            |                      |
| Non-stricturing/non-fistulizing                                                     | 16 (32.6)            |
| Stricturing                                                                         | 14 (28.5)            |
| Fistulizing                                                                         | 19 (38.9)            |
| Extraintestinal manifestations                                                      | (n=23)               |
| Arthritis/Artralgia                                                                 | 18 (36.7)            |
| Psoriasis                                                                           | 1 (2.1)              |
| Ankylosing spondylitis                                                              | 1 (2.1)              |
| Pyodermitis                                                                         | 2 (4.2)              |
| Erythema nodosum                                                                    | 1 (2.1)              |
| Complete clinical information according to the Vienna classification [27] modified. |                      |

Table 2. The frequencies of the genotypes and allelic of -308 G/A of TNF- $\alpha$  and -1082 G/A of IL-10 in the CD and control groups

| TNF- $\alpha$<br>(-308G/A) | CD patients<br>n= 46(%) | Controls<br>n=76(%)   | $\chi^2(P\ value)$ | OR (95% CI)            | $p^*$ |
|----------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|------------------------|-------|
| Genotype                   |                         |                       |                    |                        |       |
| GG                         | 37 (80.43)              | 61 (80.26)            |                    |                        |       |
| GA                         | 9 (19.57)               | 15 (19.74)            |                    |                        |       |
| AA                         | 0                       | 0                     |                    |                        |       |
| GG/GA+AA                   | 37/9                    | 61/15                 | 0.001(0.9816)      | 1.0109(0.402-2.541)    | NS    |
| Allelic                    |                         |                       |                    |                        |       |
| G                          | 83 (90.2)               | 137 (90.1)            |                    |                        |       |
| A                          | 9 (9.8)                 | 15( 9.9)              | 0.000(0.9826)      | 1.0097(0.422-2.410)    | NS    |
| IL-10<br>(-1082G/A)        | CD patients<br>n= 44(%) | Controls<br>n= 132(%) | $\chi^2(P\ value)$ | OR (95% CI)            | $p^*$ |
| Genotype                   |                         |                       |                    |                        |       |
| GG                         | 9( 20.5)                | 11 (8.4)              |                    |                        |       |
| GA                         | 22 (50.0)               | 98 (74.2)             |                    |                        |       |
| AA                         | 13 (29.5)               | 23 (17.4)             |                    |                        |       |
| GG+GA/AA                   | 31/13                   | 109/23                | 2.980 (0.0843)     | 1.9874 (0.9033-4.3723) | NS    |
| Allelic                    |                         |                       |                    |                        |       |
| G                          | 40 (54.5)               | 120 (54.5)            | 0.0000             | -                      | -     |

\* $P$  values are in comparison with the control group.

NS: not statistically significant.

Table 3. TNF- $\alpha$  and IL-10 gene polymorphism in various phenotype of Crohn's disease (CD): proportions of genotypes (%)

|                                        | TNF- $\alpha$ GG | TNF- $\alpha$ GA+AA | $\chi^2$ (P value) |
|----------------------------------------|------------------|---------------------|--------------------|
| Colonic CD (n=12)                      | 83.3 (10)        | 16.6 (2)            |                    |
| Small bowel CD (n=8)                   | 100 (8)          | 0                   |                    |
| Upper GI CD (n=1)                      | 100 (1)          | 0                   |                    |
| Mixed location (n=19)                  | 73.6 (14)        | 26.3 (5)            |                    |
| Single versus Mixed                    | 19/14            | 2/5                 | 1.938 (0.1628)     |
| Non-stricturing/non-fistulizing (n=16) | 87.5 (14)        | 12.5(2)             | Reference          |
| Stricturing (n=14)                     | 78.6 (11)        | 21.4 (3)            | 0.429 (0.5127)     |
| Fistulizing (n=16)                     | 75.0 (12)        | 25.0 (4)            | 0.821 (0.3650)     |

|                                        | IL-10 GG+GA | IL-10 AA | $\chi^2$ (P value) |
|----------------------------------------|-------------|----------|--------------------|
| Colonic CD (n=13)                      | 69.2 (9)    | 30.8 (4) |                    |
| Small bowel CD (n=8)                   | 71.4 (5)    | 28.6 (2) |                    |
| Upper GI CD (n=1)                      | 100 (1)     | 0        |                    |
| Mixed location (n=16)                  | 56.3 (9)    | 43.7 (7) |                    |
| Single versus Mixed                    | 15/9        | 6/7      | 0.918 (0.3388)     |
| Non-stricturing/non-fistulizing (n=15) | 73.3 (11)   | 26.7 (4) | Reference          |
| Stricturing (n=10)                     | 60.0 (6)    | 40.0 (4) | 0.490 (0.4838)     |
| Fistulizing (n=19)                     | 73.7 (14)   | 26.3(5)  | 0.001 (0.9816)     |

## 5.2 ARTIGO ORIGINAL II

### Perfil de Marcadores inflamatórios em diferentes formas anátomo-clínicas da Doença de Crohn.

#### Autores:

Wagner N. Fernandes<sup>1,6</sup>, Luciana P. Santos<sup>2</sup>, Adriana M. da S. Telles<sup>3</sup>, Francisco E. de A. Lima<sup>4</sup>, Waléria Martinelli<sup>4</sup>, Maurílio Toscano<sup>5</sup>, Dilênia C. O. Torres<sup>6</sup>, Maria C. Freire<sup>6</sup>, Mário R. Melo-Júnior<sup>1,3</sup>.

1- Programa de Pós-graduação em Patologia, CCS/UFPE.

2-Departamento de Fisioterapia, CCS/UFPE.

3-Departamento de Patologia, CCS/UFPE.

4-Departamento de Cirurgia, CCS/UFPE

5-Hospital Barão de Lucena, SES/PE.

6- Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco, UPE

#### RESUMO

**Introdução:** A avaliação dos pacientes com doença inflamatória intestinal (DII) é muitas vezes complexa, exigindo uma combinação de achados clínicos, laboratoriais, endoscópico, histopatológico ou radiológico. A implementação da estratégia de diagnóstico, utilizando biomarcadores não invasivos, é necessário. **Objetivos:** traçar um perfil de marcadores inflamatórios sanguíneos, utilizados rotineiramente na prática clínica, em relação à forma anátomo-clínica da doença de Crohn e analisar as diferenças deles de acordo com este comportamento. **Pacientes e métodos:** Foram estudados 49 pacientes ambulatoriais (entre 14 a 81 anos) com diagnóstico de Doença de Crohn. Durante a consulta clínica foi realizada entrevista para obtenção de dados clínico-epidemiológicos através do preenchimento de ficha clínica personalizada. Também foi coletado sangue venoso periférico, para realização das análises hematológica e bioquímica. **Resultados:** A idade média dos participantes foi de 41,8 anos e o gênero predominante foi o masculino (53,1%). A idade de diagnóstico da doença foi maior em indivíduos com idade inferior a 40 anos de idade, com 31/49 (63,3%). Em relação à localização da doença prevaleceu a ileal 22/49 (44,9%), seguida pela colônica 14/49 (28,5%). Em relação aos exames laboratoriais utilizados como marcadores inflamatórios, VSH e proteína C reativa ultra-sensível (PCR), estavam aumentados em 32/49(65,3%) e em 28/49(57,1%), respectivamente, do total dos pacientes estudados. Quando analisamos estes marcadores nas formas anatomo-clínicas, separadamente, a fistulizante foi a forma que apresentou a maior parte dos pacientes com elevação deles, com 78,9% para ambos os testes. Não foi encontrada diferença estatística entre os marcadores utilizados e as diferentes formas anátomo-clínicas da doença. **Conclusão:** A PCR e o VSH são poucos dispendiosos e são testes mais simples de utilizar do que os índices de atividade que consomem tempo e são um pouco complexos. Portanto, é útil para avaliar atividade da DC. Os nossos resultados sugerem que a PCR é de medição importante na prática diária, mas que seu impacto clínico e terapêutico terá de ser complementado com estudos posteriores.

**Palavras-chave:** Doença de Crohn, Proteína C-reativa, Hemossedimentação.

ARTIGO A SER SUBMETIDO À REVISTA DIGESTIVE DISEASE AND SCIENCE  
QUALIS CAPES: ÁREA MEDICINA II, ESTRATO B1  
FATOR DE IMPACTO: 2.117

## Introdução

A avaliação dos pacientes com doença inflamatória intestinal (DII) é muitas vezes complexa, exigindo uma combinação de achados clínicos, laboratoriais, endoscópicos, histopatológicos ou radiológicos (NAKAMURA *et al.*, 2003). O diagnóstico da DII, particularmente da doença de Crohn (CD), é frequentemente perdido ou retardado, devido à natureza não-específica de sinais e sintomas intestinais e extra-intestinais (MEUWIS *et al.*, 2007).

A implementação da estratégia de diagnóstico, utilizando biomarcadores não invasivos, é necessário. Estes biomarcadores têm o potencial de evitar procedimentos invasivos desnecessários, ou seja, avaliações diagnósticas que podem resultar em desconforto e em possíveis complicações (MENDOZA; ABREU, 2009). A presença de inflamação intestinal ativa nas DII está associada com uma reação de fase aguda e migração dos leucócitos para o intestino, desencadeando na produção de várias proteínas, que podem ser detectadas no soro, tais como proteína C-reativa (PCR) ou fezes, como calprotectina fecal (GISBERT *et al.*, 2007).

Escores de atividade de doença clínica e exames laboratoriais (em particular, os marcadores inflamatórios: velocidade de sedimentação das hemácias, VSH, e proteína C-reativa) são usados para determinar a gravidade da doença inflamatória intestinal (LANGHORST *et al.*, 2008). A capacidade para determinar o tipo, gravidade, prognóstico e resposta à terapia de DII, utilizando biomarcadores tem sido um objetivo dos investigadores clínicos (SOLEM *et al.*, 2005).

Sob circunstâncias normais a PCR é produzida por hepatócitos em quantidades baixas (1 mg/dL). No entanto, após um estímulo de fase aguda, tais como uma inflamação, os hepatócitos aumentam rapidamente a produção de PCR sob a influência de interleucina (IL)-6, factor de necrose de tumoral (TNF- $\alpha$ ) e IL-1 $\beta$ , e pode atingir níveis máximos de 350-400mg/dL (KAROUI *et al.*, 2007). Há uma heterogeneidade notável na resposta da PCR entre a DC e RCUI, considerando que a DC é associada com uma resposta forte da PCR e a RCUI tem apenas uma resposta modesta ou ausente da PCR (VERMEIRE, S *et al.*, 2006). Outra possível explicação é baseada no fato da inflamação no caso da RCUI ser limitada à mucosa do cólon, enquanto que na DC é transmural e, portanto, há um efeito sistêmico maior (GISBERT *et al.*, 2007).

O VSH mede a velocidade que as hemácias sedimentam em um tubo capilar. Inevitavelmente, o VSH depende da concentração plasmática e do número e tamanho dos eritrócitos, portanto certas situações como anemia, policitemia, e talassemia afetam o VSH (VATAY *et al.*, 2003). Ao contrário ao que acontece com a PCR, os valores do VSH parecem ser bastante similares em pacientes com DC e RCUI (GISBERT *et al.*, 2007). O mecanismo pelo qual os valores elevados de RDW estão associados à atividade das DII (doenças inflamatórias intestinais) é desconhecido. RDW é uma medida quantitativa da anisocitose, que é a variabilidade no tamanho do diâmetro dos eritrócitos. O RDW é aferido por analisadores automatizados de hematologia que são utilizados para realizar os hemogramas. Uma elevação no RDW pode ocorrer em condições de produção ineficaz das hemácias (deficiência de ferro, vitamina B12 ou folato, e hemoglobinopatias), aumento da destruição das hemácias (hemólise), ou depois de transfusões de sangue (SEOK, C. *et al.*, 2011). Citocinas pró-inflamatórias têm sido estudadas na inibição da eritropoietina. Assim, a inflamação pode levar a anisocitose através da liberação de hemácias imaturas para a circulação periférica (LIPPI *et al.*, 2009).

Estudos recentes têm sido conflitantes sobre a capacidade do VSH e da PCR prever a atividade da doença na RCUI, mas outros trabalhos têm demonstrado que o local da doença tem um grande impacto nestes parâmetros laboratoriais, por exemplo, a inflamação restrita ao reto ou cólon sigmóide apresenta VSH e PCR baixos (RODGERS; CUMMINS, 2007) apesar do paciente apresentar um quadro grave da doença. Na DC, o VSH correlaciona bem com doença limitada ao cólon, mas não relacionada com o intestino delgado (SIDOROFF, 2010).

O objetivo principal deste trabalho foi traçar um perfil de marcadores inflamatórios sanguíneos, utilizados rotineiramente na prática clínica, em relação à forma anátomo-clínica da doença de Crohn e analisar as diferenças deles de acordo com este comportamento. O índice de atividade da doença de Crohn (CDAI), a hemoglobina (Hb) e a amplitude de distribuição das hemácias (RDW) também foram avaliados.

## **Metodologia:**

Foram selecionados 49 pacientes (entre 14 a 81 anos) com diagnóstico de Doença de Crohn, que são regularmente atendidos no Serviço de Gastroenterologia/Coloproctologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e no serviço de Proctologia do Hospital Barão de Lucena SES/PE, no período de janeiro/2011 a julho/2011.

O critério de inclusão foi o diagnóstico confirmado de DC estabelecido por meio de achados clínicos, radiológicos, endoscópicos e histopatológicos, de acordo com os critérios da classificação de Lennard-Jones (1989). Todos estes pacientes foram classificados de acordo com a forma anátomo-clínica predominante (inflamatória, fistulizante ou estenosante), baseados na classificação de Vienna (GASCHE *et al.*, 2000).

Como critérios de exclusão foram dispensados aqueles pacientes com colite indeterminada ou que tenham sofrido qualquer processo cirúrgico recente devido a distúrbios gastrointestinais. Também foram excluídos da pesquisa aqueles pacientes que não nasceram no Brasil.

Os exames laboratoriais foram realizados a partir de amostras de sangue venoso periférico, obtido durante consulta médica seguida de entrevista com o pesquisador para obtenção de informações clínico-epidemiológicas através do preenchimento do questionário.

O hemograma completo foi realizado por metodologia automatizada do aparelho XD-2100 da marca SYSMEX®, seguido de revisão microscópica da lâmina pelo pesquisador. Já o VSH foi realizado por metodologia manual (método de Wintrobe). A dosagem da proteína C reativa ultra-sensível, foi realizada por metodologia automatizada, nefelometria, do equipamento COBAS INTEGRA 400 PLUS da marca ROCHE®. Todos os exames laboratoriais foram realizadas no laboratório de análises clínicas do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) da Universidade de Pernambuco (UPE).

Os parâmetros utilizados foram os seguintes: hemoglobina (Hb, faixa de 14-18 g / dl para homens e 12-16 g / dl para mulheres), contagem total de leucócitos (WBC, faixa de 4.000-10.000 / mm<sup>3</sup>), contagem de plaquetas (PLT, faixa de 150,000-450,000 / mm<sup>3</sup>), e coeficiente de variação de distribuição das hemácias (RDW, faixa de 11-14%). Os níveis de normalidade para o VSH e da PCR foram de 20 mm / h e 0-5,0 mg / dl, respectivamente (CAKAL *et al.*, 2009).

O projeto foi avaliado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do CCS/UFPE sob número de protocolo nº: 222/10, folha de rosto nº: 349673 e CAAE nº: 0223.0.172.000-10.

As medidas obtidas foram submetidas ao estudo estatístico utilizando-se a obtenção de médias, desvio-padrão e o teste de Tukey, através do Software PRISMA 3.0. Em todos os casos, foi considerado como nível de significância para rejeição da hipótese nula um valor de  $p < 0,05$ .

## Resultados:

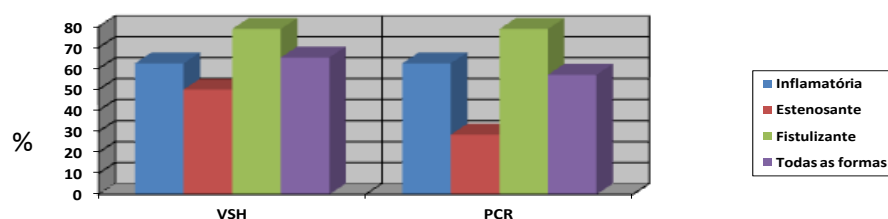
Foram estudados um total de 49 pacientes de ambos os gêneros, no qual predominou o masculino com 26/49 (53,1%) dos participantes (tabela 1). Participaram do estudo indivíduos entre 14 e 81 anos de idade com uma média  $\pm$  DP de  $41,8 \pm 14,7$  anos. A faixa etária com maior prevalência da Doença de Crohn foi a de adultos jovens (26 a 41 anos) com 19/49 (38,7%).

A idade de diagnóstico da doença foi maior em indivíduos com idade inferior a 40 anos de idade, com 31/49 (63,3%). Em relação à localização da doença prevaleceu a ileal 22/49 (44,9%), seguida pela colônica 14/49 (28,5%). Apenas 3/49 (6,1%) apresentaram a doença no trato gastro intestinal (TGI) superior.) (tabela 1).

Tabela 1. Características clínicas de acordo com a Classificação de Vienna (1998) modificado.

| Características clínicas | Pacientes, n(%) |
|--------------------------|-----------------|
| Idade de diagnóstico:    |                 |
| < 40 anos                | 31 (63.3%)      |
| $\geq$ 40 anos           | 18 (36.7%)      |
| Gênero:                  |                 |
| Masculino                | 26 (53.1%)      |
| Feminino                 | 23 (46.9%)      |
| Localização:             |                 |
| Ileal                    | 22 (44.9%)      |
| Colon                    | 14 (28.5%)      |
| Ileo-colonica            | 10 (20.5%)      |
| TGI superior             | 3 (6.1%)        |
| Forma anátomo-clínica:   |                 |
| Inflamatória             | 16 (32.6%)      |
| Estenosante              | 14 (28.5%)      |
| Fistulizante             | 19 (38,9%)      |

Em relação aos exames laboratoriais utilizados como marcadores inflamatórios, VSH e proteína C reativa ultra-sensível, estavam aumentados em 32/49 (65,3%) e em 28/49 (57,1%), respectivamente, do total dos pacientes estudados. Quando analisamos estes marcadores nas formas anatomo-clínicas, separadamente, a fistulizante foi a forma que apresentou a maior parte dos pacientes com elevação deles, com 78,9% para ambos os testes. Já a forma que apresentou uma elevação mais branda, destes exames, foi a estenosante com 7/14(50%) e 4/14(28,5%) dos pacientes, respectivamente (gráfico 1).



**Gráfico 4: Perfil de alteração (em %) dos marcadores inflamatórios de acordo com a forma anátomo-clínica da DC.**

Apesar dos valores do VSH e da PCR estarem elevados em todas as formas anátomo-clínicas (tabela 2), não houve significância estatística ( $p > 0,05$ ) para usarmos estes marcadores como ferramentas capazes de diferenciar uma forma da outra (gráficos 2 e 3). O índice de atividade inflamatória na Doença de Crohn, conhecido como CDAI (Crohn's Disease Activity Index) (BEST *et al*, 1976), obtido a partir de dados clínicos e laboratoriais do paciente, esteve abaixo de 150 para todos os indivíduos pesquisados, categorizando os pacientes num quadro de remissão da doença.

**Tabela 2: Médias e desvio-padrão do CDAI, do VSH e da PCR em relação à forma anátomo-clínica da DC.**

| Forma anátomo-clínica<br>(n) | Média do<br>CDAI $\pm$ DP | Média do<br>VSH (mm/h) $\pm$ DP | Média da<br>PCR (mg/dL) $\pm$ DP |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Inflamatória (n=16)          | 47 $\pm$ 37.1             | 26.1 $\pm$ 16.9                 | 9.8 $\pm$ 13.2                   |
| Estenosante (n=14)           | 47.8 $\pm$ 28.9           | 23.0 $\pm$ 19.2                 | 5.3 $\pm$ 9.7                    |
| Fistulizante (n=19)          | 69.6 $\pm$ 44.8           | 29.6 $\pm$ 16.4                 | 18.8 $\pm$ 23.1                  |
| Total (n=49)                 | 56 $\pm$ 39.1             | 26.6 $\pm$ 17.2                 | 12.0 $\pm$ 17.7                  |

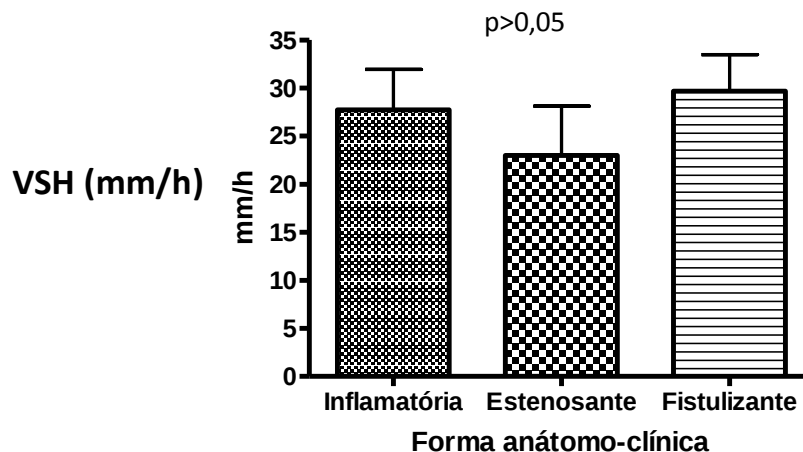


Gráfico 5: Comparação dos valores médios dos resultados do VSH entre as formas clínicas da DC.

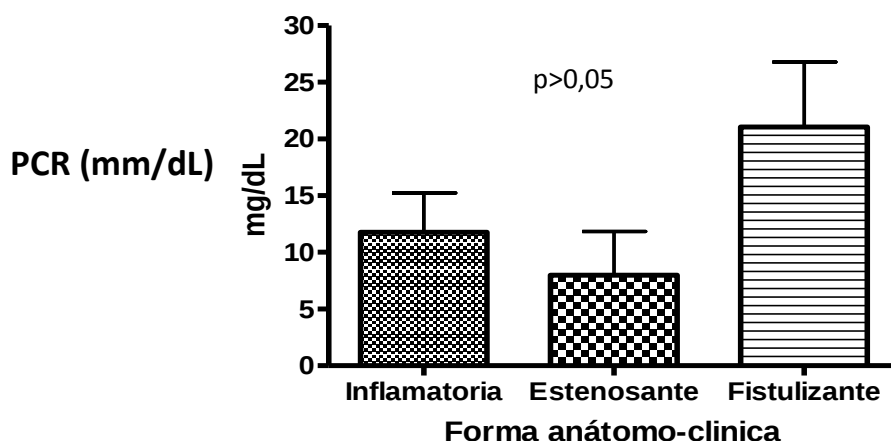


Gráfico 6: Comparação dos valores médios dos resultados da PCR entre as formas clínicas da DC.

Os níveis de Hb nos pacientes do sexo masculino se apresentaram abaixo dos valores de referência (14g/dl) nas formas estenosante e fistulizante. Nos pacientes do sexo feminino, os níveis de Hb permaneceram dentro dos padrões de normalidade em todas as formas anátomo-clínicas (12-16g/dl). Os valores de RDW ficaram acima dos valores de referência (11-14%) nas formas estenosante e fistulizante (tabela 3). Embora, em algumas formas clínicas, a Hb e o RDW estejam fora dos valores de normalidade estabelecidos no estudo, a diferença entre elas não foi significativa ( $p > 0,05$ ).

Tabela 3. Médias e desvio-padrão da Hb e do RDW em relação à forma anátomo-clínica da DC.

| Forma anátomo-clínica (n) | Média Hb(g/dL) | Média RDW $\pm$ DP (%) |
|---------------------------|----------------|------------------------|
|                           | Masc/Fem       |                        |
| Inflamatória (n=16)       | 14.5/12.6      | 13.9 $\pm$ 1.1(43.7)   |
| Estenosante (n=14)        | 13.9/12.0      | 14.5 $\pm$ 1.9(50.0)   |
| Fistulizante (n=19)       | 13.0/12.5      | 14.6 $\pm$ 2.0(57.8)   |
| Total (n=49)              | 13.7/12.4      | 14.3 $\pm$ 1.7(51.0)   |

## Discussão e conclusão

O objetivo do estudo foi analisar se os valores de PCR e VSH se encontravam alterados na DC e se valores para estes marcadores apresentavam diferença estatística entre os fenótipos da doença. Estudou-se também a associação com outros marcadores laboratoriais (hemoglobina e RDW) e com o índice de atividade da doença de Crohn (CDAI).

O CDAI é o índice mais utilizado tanto na prática quanto em ensaios clínicos. No entanto, ele tem algumas limitações: este escore requer a coleta de dados diariamente durante os 7 dias que precedem a consulta, podendo ocorrer uma variabilidade inter observador considerável. Além disso, o CDAI não é preciso em pacientes que tenham sido submetidos a ressecções íleo-colônicas ou que tiveram a forma fistulizante da doença (CHAMOUARD *et al.*, 2006; FILIK, 2006).

Alguns autores, portanto, tentaram avaliar a atividade da DC por outros meios, em especial por marcadores biológicos disponíveis na prática atual (VERMEIRE, S *et al.*, 2006). Dentre estes marcadores, a PCR representa o parâmetro mais importante, utilizado em várias fases de tratamento nas doenças inflamatórias do intestino, particularmente na doença de Crohn (VERMEIRE, SÉVERINE *et al.*, 2004)

A dosagem da PCR tem sido utilizada como um marcador de inflamação intestinal durante o acompanhamento de pacientes com DII, mas a associação entre níveis de PCR e o grau de inflamação é mal documentado (FLORIN *et al.*, 2006, SOLEM *et al.*, 2005). No presente estudo, nenhuma diferença na resposta da PCR foi observada entre os fenótipos da doença de Crohn de acordo com a classificação de Vienna, apesar das dosagens estarem acima dos valores normais em 57,1% do total de pacientes estudados.

Solem (2005), encontrou uma associação significativa entre um nível de PCR elevada (> 8 mg/dL) com DC ativa e inflamação endoscópica e histológica, mas sem o uso de índices de atividade clínica. Chamouard (2006) identificou uma relação significativa entre o valor de PCR, informações clínicas e índices representados pelo CDAI e pelo Van Hees. Por outro lado, alguns estudos mostraram que os níveis de PCR não foram diferentes entre pacientes sem atividade da doença e aqueles com algum sinal endoscópico de inflamação no intestino (COLOMBEL *et al.*, 2006)

Estudos recentes têm demonstrado que os pacientes com Doença de Crohn apresentam uma maior produção de PCR, em relação aos pacientes com RCUI, devido à inflamação transmural da parede do intestino. Pacientes com DC com envolvimento do cólon apresentaram valores de PCR superiores aos dos pacientes com RCUI com colite extensa, indicando que a extensão da doença provavelmente não é um fator importante. No estudo também não foi

observado diferença dos valores de PCR entre os fenótipos da doença (HENRIKSEN *et al.*, 2008).

Rodgers (2007), observou valores aumentados e crescentes de PCR e VSH de acordo com a gravidade da doença (remissão, leve, moderada e grave), porém os resultados encontrados não foram estatisticamente significativos em relação ao quadro clínico da doença. Um estudo recente encontrou dosagens de PCR mais baixas em pacientes com doença predominantemente ileal, mesmo com a doença clinicamente ativa (FLORIN *et al.*, 2006). Isso indica que tanto a PCR e o VSH são mais sensíveis à DC localizada no cólon do que no íleo. O estudo de Fagan (1989) mostrou que tanto a PCR como o VSH tiveram boa correlação com a atividade da doença, porém a correlação foi melhor com a PCR. No mesmo estudo foi associado o aumento de PCR com lesões endoscópicas e lesões ativas em biópsias.

Vermeire (2006) concluiu que os marcadores laboratoriais, VSH e PCR, foram úteis, porém se observou uma heterogeneidade na resposta. Rodgers (2007) encontrou marcadores (PCR e VSH) elevados em alta porcentagem dos casos com doença inflamatória ou fistulizante. Aqueles com doença estenótica, no entanto, apresentaram uma pontuação clínica alta, na ausência de marcadores de inflamação. Em alguns casos, mesmo na doença quiescente e leve, houve elevação dos níveis de VSH e PCR, indicando a inflamação contínua na ausência de sintomas. Chamouard (2006) identificou uma relação significativa entre o valor de PCR, informações clínicas e índices representados pelo CDAI e pelo Van Hees. Porém, não encontrou relação estatística entre os valores de PCR, comportamento e localização da doença, semelhante ao presente estudo.

A PCR foi demonstrada ser um marcador mais sensível da atividade da doença do que o VSH, particularmente na DC. Rodgers (2007) relatou que tanto na RCUI quanto na DC, a porcentagem de pacientes com VSH e PCR elevados, seus níveis médios eram comparáveis para cada fase, localização e gravidade da doença clínica. Nos casos com comportamento fistulizante da DC, o VSH foi mais elevado do que a PCR (78,6% e 31%, respectivamente). Em nosso estudo, estes marcadores também se encontraram em valores mais elevados nos pacientes com a forma fistulizante, porém em igual porcentagem (78,9%) para ambos os marcadores.

O melhor marcador de laboratório para diferenciar os pacientes normais com os pacientes com DII foi a PCR, onde 100% dos pacientes com DC e apenas 60% dos pacientes com RCUI tinham esse marcador aumentado. O VSH foi o segundo melhor marcador, com 85% dos pacientes com DC e apenas 23% dos pacientes com RCUI (VERMEIRE, S *et al.*, 2006).

Filik (2006) encontrou uma relação estatística significativa ( $p=0,001$ ) entre os níveis de PCR e atividade endoscópica, porém não encontrou diferença estatística significativa entre o CDAI e a atividade endoscópica, demonstrando as limitações deste índice. Supostamente a gravidade clínica depende mais da inflamação transmural que é típico desta doença do que as lesões superficiais acessíveis pela endoscopia.

Um estudo de pacientes pediátricos com DII, comparando a localização isolada da doença com os valores de PCR alterados, encontrou um  $p=0,02$  comparando as médias logarítmicas dos valores de PCR da localização ileal e colônicas, isoladas. Já o VSH não foi relacionado nesta comparação. A sensibilidade e a especificidade foram maiores para os valores de PCR elevados (90% e 97%, respectivamente) do que para os valores de VSH elevados (73%, e 79%, respectivamente) (TSAMPALIEROS *et al.*, 2011).

Outro estudo também em pacientes pediátricos com DII, encontrou uma correlação positiva entre os valores de PCR e o PCDAI (Índice de Atividade da Doença de Crohn Pediátrico), onde os valores aumentados de PCR se correlacionaram com os escores elevados de PCDAI ( $p<0,0001$ ). Além disso, a PCR, usando um ponto de corte  $< 3$ , teve uma sensibilidade de 86% e uma especificidade de 64%, quando comparado um PCDAI $<10$ , utilizado para prever a doença inativa, com um PCDAI  $> 10$  que determina atividade da doença. Foi encontrado também uma diferença estatística significativa ( $p<0,001$ ) entre os graus de atividade da doença inativa e ativa (leve, moderada e severa) e os níveis de PCR, porém nenhuma diferença foi encontrada ( $p=0,136$ ) entre os graus leve e moderado. Os valores aumentados de PCR também estiveram relacionados com a localização da doença, onde foi encontrado um  $p=0,0046$  da localização ileocolônica em relação à colônica. Houve uma diferença significativa ( $p=0,007$ ) entre o VSH e as formas inativa e a ativa, entretanto não houve diferença estatística entre os valores de VSH e as formas ativas. Foi encontrado uma correlação positiva ( $p<0,0001$ ) entre os valores de VSH e PCR, e também entre os valores de VSH e PCDAI ( $p<0,0001$ ). Usando um cut-off  $<14$  para o VSH, encontrou-se uma sensibilidade de 70% e uma especificidade de 79%, quando comparados um PCDAI $<10$  (doença inativa) a um PCDAI $>10$  (doença ativa) (TILAKARATNE *et al.*, 2010).

Até o momento não existe terapia médica que tenha sido demonstrado em reduzir a produção de PCR pelos hepatócitos, portanto, um decréscimo na concentração de PCR deve ser o resultado de que uma redução da inflamação intestinal causada pela terapia médica ou uma variação natural na atividade da doença, ou ambos (HENRIKSEN *et al.*, 2008).

Nível de PCR tem sido recentemente proposto como um fator preditivo de resposta ao tratamento da doença inflamatória intestinal. Os níveis normais de PCR foram associados

com uma melhor resposta terapêutica de Infiximab, CDP571, CDP870 e natalizumab (FILIK *et al*, 2006, SANDBORN *et al*, 2005, SIDOROFF *et al*, 2010).

Consigny (2006) mostrou que uma PCR > 20mg/L associado a um VSH > 15mm pode ocorrer uma recaída com uma sensibilidade de 89%. Florin (2006) notou que apesar de haver uma correlação da atividade da DC com a PCR, essa relação pode ser baixa em pacientes com a doença ativa. Embora vários marcadores laboratoriais foram investigados na DII, nenhum foi mostrado para ser ideal ou superior às nossas atuais ferramentas de diagnóstico. No entanto, a PCR é um marcador útil e deve ser preferida em DC, pois se correlaciona bem com atividade da doença. Considerando fase aguda outros reagentes e marcadores de inflamação como o VSH também fornecem informações confiáveis sobre a atividade da doença. Sua meia-vida mais longa e a interferência com outros fatores tornam-os menos útil em prática clínica em comparação com a PCR (VERMEIRE, S *et al.*, 2006).

Estudos recentes têm relatado que o RDW se correlaciona com a atividade da doença em pacientes com DII (CAKAL *et al.*, 2009), (CLARKE *et al.*, 2008). Um estudo desenvolvido para classificação das anemias sugeriu o uso do volume corpuscular médio (VCM) e RDW juntos para definição da anemia. O RDW é também um sensível marcador de deficiência nutricional a qual afeta a produção e maturação das hemácias (BESSMAN *et al.*, 1983).

Em nosso estudo os valores de RDW ficaram acima dos valores de referência (11-14%) nas formas estenosante e fistulizante, 14,5% e 14,6%, respectivamente. Apesar de nas formas clínicas relatadas o RDW estar fora dos valores de normalidade, a diferença entre elas não foi significativa ( $p>0,05$ ).

Song (2011), em um estudo retrospectivo, encontrou um aumento do RDW associado com a atividade e a gravidade da doença em pacientes com DII com ou sem anemia, e apresentando uma precisão maior que os valores de PCR e VSH. Clarke (2008) também em um estudo retrospectivo, encontrou uma pequena diferença, porém estatisticamente significativa ( $p=0,027$ ) dos valores de RDW entre pacientes com DC e com RCUI. Cakal (2009), encontrou uma elevação do RDW em 78,6% dos pacientes com DC e usando um ponto de corte de 14,1, encontrou uma sensibilidade de 78% e uma especificidade de 63% ( $p=0,002$ ) para este marcador nestes pacientes. O mesmo autor também encontrou a PCR como marcador mais sensível e específico de doença ativa em pacientes com DC.

Alguns autores relataram prejudicada a absorção intestinal de ferro correlacionada com a atividade da doença e marcadores de inflamação em pacientes com CD. A deficiência de ferro devido à perda crônica de sangue, a absorção deficiente e a falta de ingestão é um problema frequente em pacientes com DII, e foi observada em 30-80% de pacientes com DC e em 81% de pacientes com RCUI. Os pacientes com anemia têm aumento na severidade da doença e redução da qualidade de vida (SEMRIN *et al*, 2006, GUAGNOZZI *et al*, 2006).

Os dados apresentados fornecem uma base para a implementação de mais um rigoroso projeto de estudo com a análise de novos dados, onde o RDW pode provar ser clinicamente um marcador eficaz e de baixo custo. Avaliando o RDW como um marcador adicional para uma futura avaliação inflamatória da DC, podendo colaborar no diagnóstico e contribuir como mais uma ferramenta em nossa compreensão da DC (CLARKE *et al.*, 2008). A elevação do RDW precede as alterações dos níveis de VCM e hemoglobina, o que significa que ele pode ser usado como um marcador de início para a avaliação da atividade da doença em pacientes com DII.

Os mecanismos biológicos subjacentes a esta associação é mérito de investigação. O RDW é amplamente disponível sem custo adicional na rotina hematológica laboratorial atual e é altamente reprodutível. São necessárias mais pesquisas para determinar se o RDW é ou não um instrumento de avaliação útil para a atividade da DC em diferentes cenários clínicos.

Os nossos resultados sugerem que a PCR de medição é importante na prática diária, mas que seu impacto clínico e terapêutico terá de ser avaliado em estudos posteriores. Os valores de PCR isolados não pode substituir CDAI ou outros índices de atividade clínica, nem da avaliação clínica. Os estudos combinando vários parâmetros biológicos e morfológicos são exigidos.

A PCR é pouco dispendiosa e constitui um teste mais fácil de utilizar do que os índices de atividade que consomem tempo e são um pouco complexos. Portanto, é útil para avaliar atividade da DC. Estudos adicionais são necessários para incorporar a PCR em índices já existentes ou para a definição de novos índices incluindo-a. Se a questão do retorno da PCR aos valores normais deve ser um objetivo da terapia também merecem avaliações futuras. Marcadores são úteis e devem ser integrados na gestão global do paciente com DII.

A limitação deste estudo foi o tamanho da amostra, relativamente pequena, especialmente quando os pacientes foram estratificados em subgrupos de acordo com o fenótipo da DC (inflamatória, estenosante e fistulizante).

Os médicos, na prática, dependem de uma combinação de história clínica, achados ao exame físico e investigações para determinar a presença da doença ativa. Uma melhor compreensão da correlação entre medidas subjetivas e objetivas pontos (em particular os marcadores inflamatórios) ajudará os médicos na avaliação de pacientes com doença inflamatória intestinal.

## Referências:

- BEST, W. R.; BECKTEL, J. M.; KERN, Jr. F. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. **Gastroenterol**, v. 70, p.439-44, 1976.
- CAKAL, B.; GOKMEN, A. A.; YUCEL, A. A. *et al.* Red Cell Distribution Width for Assessment of Activity of Inflammatory Bowel Disease. p. 842-847, 2009.
- CHAMOUARD, P.; RICHERT, Z.; MEYER, N.; RAHMI, G.; BAUMANN, R. Diagnostic value of C-reactive protein for predicting activity level of Crohn's disease. **Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association**, v. 4, n. 7, p. 882-7, jul 2006.
- CLARKE, K.; SAGUNARTHY, R.; KANSAL, S. RDW as an additional marker in inflammatory bowel disease/undifferentiated colitis. **Digestive diseases and sciences**, v. 53, n. 9, p. 2521-3, set 2008.
- COLOMBEL, J. F.; SOLEM, C. A., SANDBORN, W. J.; BOOYA, F.; LOFTUS, E. V.; HARMSSEN, W. S. Quantitative measurement and visual assessment of ileal Crohn's disease activity by CT enterography: correlation with endoscopic severity and C-reactive protein. **Gut**, v. 55, p.1561-7, 2006.
- CONSIGNY, Y.; MODIGLIANI, R.; COLOMBEL, J. F.; DUPAS, J. L.; LEMANN, M.; MARY, J.Y. The Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires Digestives. A simple biological score for predicting low risk of shortterm relapse in Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis**, v. 12, p.551-7, 2006.
- FILIK, L. C-Reactive Protein and Monitoring the Activity of Crohn ' s Disease. **Advances In Therapy**, v. 23, n. 4, p. 655-662, 2006.
- FLORIN, T. H.; PATERSON, E. W.; FOWLER, E.V.; RADFORD-SMITH, G. L. Clinically active Crohn's disease in the presence of a low C-reactive protein. **Scand J Gastroenterol**, v. 41, p.306-11, 2006.
- GASCHE, C.; SCHOLMERICH, T.; BRYNSKOV, J. *et al.* A Simple Classification of Crohn ' s Disease : Report of the. v. 6, n. 1, p. 8-15, 2000.
- GISBERT, J. P.; GONZÁLEZ-LAMA, Y.; MATÉ, J. Papel de los marcadores biológicos en la enfermedad inflamatoria intestinal. **Gastroenterología y hepatología**, v. 30, n. 3, p. 117-129, 2007.
- GUAGNOZZI, D.; SEVERI, C.; IALONGO, P., *et al.* Ferritin as a simple indicator of iron deficiency in anemic IBD patients. **Inflamm Bowel Dis**, v. 12, p.150-151, 2006.
- FAGAN, E. A.; DYCK, R. F.; MATON, P. N.; HODGSON, H. J. F.; CHADWICK, V. S.; PETRIE, A.; PEPYS, M. B. Serum levels of C-reactive peptide in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Eur J Clin Invest**, v. 12, p.351- 359, 1989.

HENRIKSEN, M.; JAHNSEN, J.; LYGREN, I. *et al.* C-reactive protein: a predictive factor and marker of inflammation in inflammatory bowel disease. Results from a prospective population-based study. **Gut**, v. 57, n. 11, p. 1518-1523, 2008.

KAROUI, S.; OUERDIANE, S.; SERGHINI, M. *et al.* Correlation between levels of C-reactive protein and clinical activity in Crohn ' s disease. **Digestive and Liver Disease**, v. 39, p. 1006-1010, 2007.

LANGHORST, J.; ELSENBRUCH, S.; KOELZER, J. *et al.* Noninvasive markers in the assessment of intestinal inflammation in inflammatory bowel diseases: performance of fecal lactoferrin, calprotectin, and PMN-elastase, CRP, and clinical indices. **The American journal of gastroenterology**, v. 103, n. 1, p. 162-9, jan 2008.

LENNARD-JONES, J.E. Classification of inflammatory bowel disease. **Scand J Gastroenterol Suppl** 170, p. 2-6., 1989.

LIPPI, G.; TARGHER, G.; MONTAGNANA, M.; SALVAGNO, G.L.; ZOPPINI, G., GUIDI, G. C. Relation between red blood cell distribution width and inflammatory biomarkers in a large cohort of unselected outpatients. **Arch Pathol Lab Med**, v.133, p. 628-632, 2009.

MENDOZA, J. L.; ABREU, M. T. Biological markers in inflammatory bowel disease : Practical consideration for clinicians Intérêt clinique des marqueurs biologiques dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales. **Gastroentérologie Clinique et Biologique**, v. 33, p. S158-S173, 2009.

MEUWIS, M. A.; FILLET, M.; GEUTRS, P.; DE SENY, D.; LUTTERI, L.; CHAPELLE, J. P. Biomarker discovery for inflammatory bowel disease, using proteomic serum profiling. **Biochem Pharmacol**, v.73, p. 1422-33, 2007.

NAKAMURA, R. M.; MATSUTANI, M.; BARRY, M. Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 335, n. 1-2, p. 9-20, set 2003.

RODGERS, A. D.; CUMMINS, A. G. CRP Correlates with Clinical Score in Ulcerative Colitis but Not in Crohn ' s Disease. **Dig Dis Sci**, p. 2063-2068, 2007.

SANDBORN, W. J.; COLOMBEL, J. F.; ENNS, R.; FEAGAN, B. G.; HANAUER, S.; LAWRENCE, I. C. For the International Efficacy of Naralizumab as Active Crohn's Therapy (ENACT-1) and the Evaluation of Natalizumab as Continuous Therapy (ENACT-2) Trial Groups. Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn's disease. **N Engl J Med**, v. 353, p.1912-25, 2005.

SEMRIN, G.; FISHMAN, D. S.; BOUSVAROS, A. *et al.* Impaired Intestinal Iron Absorption in Crohn ` s Disease Correlates with Disease Activity and Markers of Inflammation. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 12, n. 12, p. 1101-1106, 2006.

SEOK, C.; DONG, S.; PARK, I. *et al.* Association Between Red Cell Distribution Width and Disease Activity in Patients with Inflammatory Bowel Disease. **Dig Dis Sci**, n. Cd, 2011.

SIDOROFF, M. High-sensitivity C-reactive protein in paediatric inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 23, p. 2901, 2010.

SOLEM, C. A.; EDWARD, V.; TREMAINE, W. J. *et al.* Correlation of C-Reactive Protein with Clinical , Endoscopic , Histologic , and Radiographic Activity in Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 11, n. 8, p. 707-712, 2005.

SONG, C. S.; PARK, J. H.; JEON, W. K.; PARK, D. I.; KIM, H. J.; KIM, B. I.; YOON, M. Y.; CHO, Y. K.; SEOK, H. S.; SOHN, C. I. Association Between Red Cell Distribution Width and Disease Activity in Patients with Inflammatory Bowel Disease. **Dig Dis Sci**, v. 15, n. 2, p. 340-342, 2011.

TILAKARATNE, S.; LEMBERG, D. A; LEACH, S. T.; DAY, A. S. C-reactive protein and disease activity in children with Crohn's disease. **Digestive diseases and sciences**, v. 55, n. 1, p. 131-6, jan 2010.

TSAMPALIEROS, A.; GRIFFITHS, A. M.; BARROWMAN, N.; MACK, D. R. Use of C-Reactive Protein in Children with Newly Diagnosed Inflammatory Bowel Disease. **The Journal of Pediatrics**, v. 159, n. 2, p. 340-342, 2011.

VATAY, A.; BENE, L.; KOVÁCS, A. *et al.* Relationship between the tumor necrosis factor alpha polymorphism and the serum C-reactive protein levels in inflammatory bowel disease. **Immunogenetics**, v. 55, n. 4, p. 247-52, jul 2003.

VERMEIRE, S; ASSCHE, G VAN; RUTGEERTS, P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? **Gut**, v. 55, n. 3, p. 426-431, 2006.

VERMEIRE, SÉVERINE; ASSCHE, GERT VAN; RUTGEERTS, PAUL. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 10, n. 5, p. 661-665, 2004.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ Os marcadores inflamatórios estudados se encontraram alterados na maioria dos pacientes com Doença de Crohn, porém não houve diferença estatística significativa entre estes marcadores e as formas anátomo-clínicas da doença na população estudada.
- ✓ Os polimorfismos da  $\text{TNF-}\alpha$ (-308G/A) e da IL-10(-1082G/A) não foram estatisticamente significante em relação ao comportamento (inflamatória, estenosante e fistulizante) da Doença de Crohn na população estudada.
- ✓ Estudos posteriores com mais marcadores genéticos, associação de marcadores inflamatórios com índices de avaliação da DC e um número maior de pacientes necessitam ser realizados para que seja traçado um perfil genético diferencial nas diferentes manifestações clínicas da DC em nossa população.

## REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA:

- AHMAD, T.; ARMUZZI, A.; BUNCE, M.; MULCAHY-HAWES, K.; MARSHALL, S.E.; et al. The Molecular Classification of the Clinical Manifestations of Crohn's Disease. **Gastroenterology**, v. 22, p.854-866, 2002.
- AHMAD, T.; TAMBOLI, C. P.; JEWELL, D.; COLOMBEL, J.F. Clinical Relevance of Advances in Genetics and Pharmacogenetics of IBD. **Gastroenterology**, v.126, p.1533- 1549, 2004.
- ALMEIDA, A.C.; FERREIRA, P.; CANEDO, F; PEREIRA, C.; FIGUEIREDO, R.; SERUCA, J.C. et al.. Diferentes subtipos clínico patológicos da doença de Crohn podem ser definidos por variantes dos genes Nod2/Card15 e TNFa. **J Port Gastrenterol**, v.11, p.302-310, 2004.
- ANDERSEN, V., ERNST, A., CHRISTENSEN, J., OSTERGAARD, M., JACOBSEN, B. A., TJONNELAND, A., KRARUP, H.B. and VOGEL, U. The polymorphism rs3024505 proximal to IL-10 is associated with risk of ulcerative colitis and Crohns disease in a Danish case-control study. **BMC Medical Genetics**, v.11:82, 2010.
- BAMIAS, G.; COMINELLI, F. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: current concepts. **Curr Opin Gastroenterol**, v.23, p. 365-369, 2007.
- BAYLESS, T. M; TOKAYER, A. Z.; POLITO II, J. M.; QUASKEY, S.A.; MELLITS, D.; et al. Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members - potencial hereditary influences. **Gastroenterology**, v. 111, p. 573-579, 1996.
- BONEN, D. K.; CHO, J. H. The genetics of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.124, p.521-536, 2003.
- BURGUER, D.; DAYER, J. M. Inhibitory cytokines and cytokine inhibitors. **Neurology**, v.45(6 Suppl 6):S39-43, 1995.
- CABRERA, M.; SHAW, M.A.; SHARPLES, C.; WILLIAMS, H.; CASTES, M.; CONVIT, J. et al.. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. **J Exp Med**, v.182: p.1259-64, 1995.
- CAMPOS, F. G.; WAITZBERG, D. I.; HABR-GAMA, A.; LOGULLO, A. F.; NORONHA, I. L.; JANCAR, S.; TORRINHAS, R. S.; FURST, P. Impact of parenteral n-3 fatty acids on experimental acute colitis. **Br J Nutr**. v.87, n.1: S83-8, 2002.
- CASTRO, L. P.; SAVASSI-ROCHA, P. R.; FILHO, A. L.; CONCEIÇÃO, S. A. Tópicos de Gastroenterologia: **Avanços em Coloproctologia**, vol.11. Ed. Medsi, 2002.
- CHAMBERLIN, W. M.; NASER, S. A. Integrating theories of the etiology of Crohn's disease on the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. **Med Sci Monit**, v.12,n.2, p.RA27-33, 2006.

COLOMBEL, J. F; GRANDBASTIEN, B.; GOWER-ROUSSEAU, C.; PLEGAT, S.; EVRARD, J.P.; *et al.* Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. **Gastroenterology**, v. 111, p. 604-607, 1996.

COOK, J.K.; KARAKOZIS, S.; KIM, D.; PROVIDO, H.; GONGORA, E.; KIRKPATRICK, J.R. Interleukin-10 attenuates proinflammatory cytokine production and improves survival in lethal pancreatitis. **American Surgeon**, Baltimore, v.67, n.3, p.237-241, 2001.

CRILLY, A.; HAMILTON, J.; CLARK, C.J.; JARDINE, A.; MADHOK, R. Analysis of the 5' flanking region of the interleukin 10 gene in patients with systemic sclerosis. **Rheumatology** (Oxford), v.42: p.1295-8, 2003.

DANESE, S.; FIOCCHI, C. Etiopathogenesis of inflammatory bowel diseases. **World J Gastroenterol**, v.12,n.30, p.4807-12, 2006.

DAMIÃO, A. O. M. C.; SIPAHI, A. M.; Doença inflamatória intestinal. **Gastroenterologia**. Rio de Janeiro: MEDSI Editora médica e científica Ltda p. 1105-1149, 2004.

DINESH, A.; ANIL M. and RAMA DEVI, M. Interleukin-10 G-1082A and C- 819T Polymorphisms as Possible Molecular Markers of Urothelial Bladder Cancer, **Archives of Medical Research**, v.40, p.97-102, 2009.

DUARTE, I.; SANTOS, A.; SOUSA, H.; CATARINO, R.; PINTO, D.; MATOS, A.; *et al.* G-308 TNF- $\alpha$  polymorphisms is associated with an increased risk of invasive cervical cancer. **Biochem Biophys Res Commun**. v.334(2), p. 588-592, 2005.

DUERR, R. H. Update on the Genetics of Inflammatory Bowel Disease. **J Clin Gastroenterol**, v.37, n.5, p.358-367, 2003.

DUERR, R. H.; TAYLOR, K. D.; BRANT, S. R.; RIOUX, J. D.; SILVERBERG, M. S.; *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. **Science**, v.314, p.1461-1463, 2006.

ELIA, P.P.; FOGAÇA, H.S.; BARROS, R. G. G. R.; ZALTMAN, C.; ELIA, C. S. C.; Análise descritiva dos perfis social, clínico, laboratorial e antropométrico de pacientes com doenças inflamatórias intestinais, internados no Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, Rio de Janeiro. **Arq Gastroenterol**, v. 44, n.4, P. 332-339, 2007.

ELSAS, P. X. Citocinas Pró-inflamatórias na Medicina Fetal e Neonatal. In: MEDSI, editor. **Recentes Avanços em Neonatologia**. Dezembro ed: Clínica de Perinatologia; 2001.

FANG, I.M.; LIN, C.P.; YANG, C.H.; CHIANG, B.L.; YANG, C.M.; CHAU, L.V.; CHEN, M.S. Inhibition of experimental autoimmune anterior uveitis by adenovirusmediated transfer of the interleukin-10 gene. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**. New York, v.21, n.6, p.420-428, 2005.

FEAGAN, BG, Sy R. Epidemiology of inflammatory bowel disease. In: Lichtenstein GR, editor. **The clinician guide to inflammatory bowel disease**. Thorofare: SLACK, p.1-8, 2003.

FERREIRA, A.C.; ALMEIDA, S.; TAVARES, M.; CANEDO, P.; PEREIRA, F.; REGALO, G. et al. NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis**, v.11; 331, 2005.

FIOCCHI, C. Inflammatory Bowel Disease: Etiology and Pathogenesis. **Gastroenterology**, v.115, p.182-205, 1998

FIOCCHI, C. Falling from grace: paradigm shifting in inflammatory bowel disease. **Curr Opin Gastroenterol**, v.23, p.363-364, 2007.

GONZALEZ, S.; RODRIGO, L.; MARTINEZ-BORRA, J.; LOPEZ-VAZQUEZ, A.; FUENTES, D.; NINO, P. et al. TNF-alpha -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF-alpha production and inflammatory activity in Crohn's patients with fistulizing disease. **Am J Gastroenterol**; 98: 1101-6, 2003.

GOWER-RUSSEALI, C. C.; SALOMONEZ, J. F.; DUPAS, J. L.; MARTI, R.; NUTTENS, M. C.; VOTTE, A.; LEMAHIEL, M.; LEMAIRE, B.; COLOMBEL, J. F.; CORTOT, A. Incidence inflammatory bowel disease in Northern France(1988-1990). **Gut** 35: 1433-1438, 1994.

HUGOT, J. P.; CHAMAILLARD, M.; ZOUALI, H.; LESAGE, S.; CEZARD, J. P.; et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v. 411, n.6837, p. 599-603, 2001.

HUGOT, J. P.; JUNG, C. IBD Genes: The Old and New Candidates. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.43, Suppl.2, p.S11, 2006.

HUME, G.; SMITH, G. L. R. The pathogenesis of Crohn's disease in the 21st century. **Pathology**, v.34, p.561-567, 2002.

IRVINE, E.; FALTOKBYAR, F.; SWARBRIK, E. T. A critical review of epidemiology studies in inflammatory bowel disease. **Scan J Gastroenterol**, v. 36: 2-15, 2001.

JEWEL, D. P. Ulcerative colitis. In: Feldman, M.; Scharschmidt, B. F.; Sleisenger, M. H.; Sleisenger & Fordtrans's gastrointestinal and liver disease – **Gastroenterology** 130: 1039-1045, 2006.

JORDAN, B. et al. Genome complexity reduction for SNP genotyping analysis. **PNAS**. v. 99(5), p. 2942-2947, 2002.

KENDALL, L.V.; RILEY, L.K.; HOOK, R.R.JR; BESCH-WILLIFORD, C.L.; FRANKLIN, C.L. Differential interleukin-10 and gamma interferon Mrna expression in lungs of ciliium-associated respiratory bacillus-infected mice. **Infection and Immunity**, Washington, v.69, n.6, p.3697-3702, 2001.

KIM, T.H.; KIM, B.G.; SHIN, H.D.; KIM, J.W.; KIM, C.G.; KIM, J.S. et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in Korean patients with inflammatory bowel disease. **Korean J Gastroenterol**, v. 42: 377, 2003.

KIRKPATRICK, A.; BIDWELL, J.; VAN DEN BRULE, A. J.; MEIJER, C. J.; PAWADE, J.; GLEW, S. TNF- $\alpha$  polymorphisms frequencies in HPV-associated cervical dysplasia, **Gynecol Oncol**, v. 92(2), p.675-679, 2004.

KRISHMAN, A, KORZENIK, J.; In Inflammatory Bowel Disease and environmental influences. **Gastroenterol Clin N Am**, v.31, p.21-39,2002.

KROMBLUTH, A.; SACHAR, D. K.; SALAMON, P. Crohn's disease. In: Feldman M.; Scharschmidt, B. F.; Sleisenger, M. H.; Sleisenger & Fordtrans's gastrointestinal and liver disease – pathophysiology, diagnosis and management. 6.ed Philadelphia: W. B. Saunders. p. 1708-1734, 1998.

KOSS, K.; SATSANGI, J.; FANNING, G. C.; WELSH, K. I.; JEWEL, D. P. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. **Genes Immun** v.1, p.185-90. 2000.

KORZENIK, J. R. Investigational therapies in the medical management of Crohn's disease [Online] ; Available from: URL: [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com). 2008

KUCHARZIK, T.; MAASER, C.; LUGERING, A.; KAGNOFF, M.; MAYER, L.; TARGAN, S.; DOMSCHKE, W. Recent understanding of pathogenesis: implications for future therapies. **Inflamm Bowel Dis**, Nov; v.12,n.11, p.1068-1083, 2006.

KUMAR, P.; CLARCK, M. Clinical Medicine. 5th ed. London, UK: WB Saunders; 2002.

LANNA, C. C. D.; FERRARI, M. L. A.; CARVALHO, M. A. P.; CUNHA, A. s. Manifestações articulares em pacientes co Doença de Crohn e Retocolite ulcerativa. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.46, supl.1, p. 45-5, 2006

LEWIN, B.; **Genes VII**.Porto Alegre, Ed. Artmed, 2001.

LECH-MARANDA, E.; BASEGGIO, L.; BIENVENU, J.; CHARLOT, C.; BERGUER, F.; RIGAL, D. *et al*. Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. **Blood**, v.103, p.3529-34, 2004.

LOFTUS, E.; Clinical epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: incidence, prevalence and environmental influences. **Gastroenterol**, v.126, 1504-17,2004.

LOUIS, E.; PEETERS, M.; FRANCHIMONT, D.; SEIDEL, L.; FONTAINE, F.; DEMOLIN, G.; *et al*. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism in Crohn's disease (CD): influence on disease behaviour? **Clin Exp Immunol**, v.119, 64-8, 2000.

MACHADO, M.; SCHNEIDER, N.; Em **Colonoscopia nas doenças inflamatórias intestinais**. **Endoscopia Digestiva**. São Paulo, v.141, 995-98, 2006.

McCOLM, J.R.; STENSON, B.J.; BIERMASZ, N.; McINTOSH, N. Measurement of interleukin 10 in bronchoalveolar lavage from preterm ventilated infants. **Arch Dis Child Fetal Neonatal**. v.82, n.2, F156-9, 2000.

McGOVERN, D.P.B.; HYSI, P.; AHMAD, T.; VAN HEEL, D.A.; MOFFATT, M. F.; *et al*. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and

- susceptibility to inflammatory bowel disease. **Hum Mol Genet**, v.14, n.10, p.1245-1250, 2005.
- MAEDA, K.; OKADA, M.; YAO, T.; SAKURAI, T.; LIDA, M.; FUCHIGAMI, T.; YOSHINAGA, K.; IMAMURA, K.; OKEDA, Y.; SAKAMOTO, K. Intestinal and extra-intestinal complications of Crohn's disease: predictors and cumulative probability of complications. **J gastroenterology**, v.29, p. 577-582, 1994.
- MENDOZA, J. L.; TAXONERA, C. Clinical value of gene NOD2/CARD15 mutations in Crohn's disease. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 97, n.8, on-line dia, Madrid Aug, 2005.
- MOORE, K.W.; DE WAAL MALEFYT, R.; COFFMAN, R.L.; O'GARRA, A. Interleukin 10 and interleukin 10 receptor. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.19, p.683-765, 2001.
- MORAHAN, G.; HUANG, D.; WU, M.; HOLT, B.J.; WHITE, G.P.; KENDALL, G. E.; SLY, P.D.; HOLT, P.G. Genetics of autoimmune diseases in humans and in animal models. **Lancet**, v.360, p.455-459. 2002
- NAKAMURA, R. M.; MATSUTANI, M.; BARRY, M. Advances in clinical laboratory tests for inflammatory bowel disease. **Clinica Chimica Acta** 235(1-2): 9-20, 2003.
- OGURA, Y.; BONEN, D. K.; INOHARA, N.; NICOLAE, D. L.; CHEN, F. F.; *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v.411, p. 603-606, 2001.
- PAPADAKIS, K. A.; TARGAN, S. R.; Tumor necrosis factor: biology and therapeutic inhibitors. **Gastroenterology**, v.119, p.1148-57, 2000.
- PARKES, M.; BARRETT, J. C.; PRESCOTT, N. J.; TREMELLING, M.; ANDERSON, C. A.; *et al.* Sequence variants in the autophagy gene *IRGM* and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. **Nat Genet**, v.39, n.7, p. 830-832, 2007.
- PELTEKOVA, V. D.; WINTLE, R. F.; RUBIN, L. A.; AMOS, C.; I.; HUANG, Q.; *et al.* Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. **Nat Genet**, v.36, n.5, p. 471-475, 2004.
- PRESCOTT, N. J.; DOMINY, M. K.; KUBO, M.; LEWIS, M. C.; FISHER, S. A.; REDON, R.; HUANG, N.; STRANGER, B. S.; BLASZCZYK, K.; HUDSPITH, B; Independent and population-specific association of risk variants at the *IRGM* locus with Crohn's disease **Human Molecular Genetics**, v.19, n.9, p. 1828-1839, 2010.
- PUTIGANO, A. L.; GENISE, S.; BAGNOLI, S.; MILLA, M.; TEDDE, A.; MOLINARO, D.; SESTINI, R.; GENUARDI, M.; ANNESE, V.; PAPI, L.; **The IL-10 promoter polymorphisms is associated with both CD and UC in Tuscany population.** Journal of Crohn's and Colitis, v.5(1), p.S162, 2011.

RAM, S.; BASS, K.; ABREO, K.; BAIER, R.J.; KRUGER, T. E.; Tumor necrosis factor- $\alpha$  -308 gene polymorphism is associated with synthetic hemodialysis graft failure. **J Invest Med**; 51: 19-26, 2003.

RICHARD, H. D. Update on the Genetics of Inflammatory Bowel Disease. **J Clin Gastroenterol**, v.37, p. 358-367, 2003.

RIOUX, J. D.; SILVERBERG, M. S.; DALY, M. J.; STEINHART, A. H.; McLEOD, R. S. *et al.* Genome-wide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. **Am J Hum Genet**, v.66, p.1863-1870, 2000.

RIOUX, J. D.; XAVIER, R. J.; TAYLOR, K. D.; SILVERBERG, M. S.; GOYETTE, P.; *et al.* Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. **Nat Genet**, v.39, p. 596-504, 2007.

ROBBINS, L. T.; COTRAN, P. **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro. ABDR. P. 888-893, 2005.

ROTHENBERG, S. S. Laparoscopic segmental intestinal resection. **Semin Pediatr Surg**, v.11, n.4, p.211-6, 2002.

RUTTGEERS, P. Medical therapy of inflammatory bowel disease. **Digestion**, v.59, p.453-469, 1998.

SALVIANO, F.N.; BURGOS, M. G. P. A.; SANTOS, E. C.; Perfil socioeconômico e nutricional de pacientes com doença inflamatória intestinal internados em um hospital universitário. **Arq Gastroenterol**, v. 44, no.2, p. 99-106, 2007.

SANCHEZ, R.; LEVY, E.; COSTEA, F.; SINNETT, D. IL-10 and TNF- $\alpha$  promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location. **World J Gastroenterol**, v.15, p.3776, 2009.

SARTOR, R. B. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. **Am J Gastroenterol**, v.92, p.5-11, 1997.

SANDBORN, W.J; HANAUER, S. B. Antitumor Necrosis Factor Therapy for Inflammatory Bowel Disease: A Review of Agents, Pharmacology, Clinical Results, and Safety. **Inflamm Bowel Dis**, v.5, p.119-133, 1999.

S. ALMEIDA, A.C. FERREIRA, P. CANEDO, F. PEREIRA, C. FIGUEIREDO, R. SERUCA, J. C. MACHADO, F. TAVARELA-VELOSO. Diferentes subtipos clinicopatológicos da Doença de Crohn podem ser definidos por variantes dos genes NOD2/CARD15 e TNF  $\alpha$ . **J Port Gastreenterol**, v.11, p.302-310, 2004.

SCHNEIDER, N. C.; Polimorfismo do HLA-G em pacientes com doenças inflamatórias intestinais. Tese de doutorado. Porto Alegre : PUC/RS, 2009.

SHIH, D.Q.; TARGAN, S. R. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**, v.14, n.3, p.390-400, 2008.

STHERLAND, L.; ROTH, D.; BECK, P.; Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. (Cochrane Review). **The Cochrane Library**, Issue 1, Oxford: Update Software, 2002.

STEWART, J. P.; BEHM, F. G.; ARRAND, J. R.; ROONEY, C. M. Differential expression of viral and human interleukin-10 (IL-10) by primary B cell tumors and B cell lines. **Virology**, v.200, p.724-32, 1994.

STOLL, M.; CORNELIUSSEN, B.; COSTELLO, C. M.; WAETZIG, G. H.; MELLGARD, B.; *et al.* Genetic variation in *DLG5* is associated with inflammatory bowel disease. **Nat Genet**, v. 36, n.5, p.476-480, 2004.

TAKAISHI, HIROMASSA *et al.* Circulating Autoantibodies against purified colonic mucin in ulcerative colitis. **Journal of Gastroenterology**, v.35, p.20-27, 2000.

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v.448, p.427-434, 2007.

VATAY, A.; BENE, L.; KOVÁCS, A.; PROHÁSZKA, Z.; SZALAI, C.; ROMICS, L. *et al.* Relationship between the tumor necrosis factor alpha polymorphism and the serum C-reactive protein levels in inflammatory bowel disease. **Immunogenetics**, v.55, p.247, 2003.

ZHENG, C. Q.; HU, G. Z.; ZENG, Z. S.; LIN, L. J.; GU, G. G. Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. **World J Gastroenterol**, v.9, n.8, p. 1646-1656, 2003.

ZOODSMA, M.; NOTEYZ, I. M., SCHIPPERY, M.; OOSTEROMY, E.; VANDER, G.; STEEGY, G.; DE VRIES, E. G. E.; TE MEERMANK, G. J & VANDER ZEE, A. G. J. Interleukin-10 and Fas polymorphisms and susceptibility for (pre)neoplastic cervical disease, **The Netherlands Int J Gynecol Cancer**, v.15 (Suppl. 3), p.282– 290, 2005.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSETIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

**Título:** Análise do polimorfismo gênico em diferentes formas anátomo-clínicas da Doença de Crohn.

**Mestrando:** Wagner Neves Fernandes

**Orientador:** Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo-Júnior.

**Co-orientadores:** Profa. Dra. Adriana Maria da Silva Telles e Prof. Dr. Francisco Eduardo de Albuquerque Lima

**Endereço do local de Pesquisa:** Ambulatório Gastroenterologia/Coloproctologia do Hospital da Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco(HC/UFPE).

**Endereço profissional do pesquisador:** Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Patologia. Av. Prof. Moraes Rego,1235- Cidade Universitária. Recife-PE-Brasil CEP: 50670-901. Telefone/Fax: (81) 2126-8529.

**Justificativa do trabalho:** A nossa população se beneficiará desta pesquisa, pelo fato dos esclarecimentos que vamos trazer por se tratar de um assunto controverso e carente de informações prognósticas confiáveis e com isso vamos contribuir para diminuir o sofrimento de muitos pacientes melhorando a qualidade de vida dos mesmos. Vossa participação nesta pesquisa consistirá em autorizar a coleta de amostras de sangue através de punção venosa durante seus exames de rotina referente ao seu tratamento sob responsabilidade deste serviço médico

**Este trabalho tem como objetivo geral:** realizar um levantamento genético e laboratorial (hematológico e bioquímico) de pacientes portadores da Doença de Crohn atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE)

**Benefícios do estudo:** As informações coletadas nesse estudo ajudarão a identificar as alterações genéticas e laboratoriais, que ocorrem em pacientes acometidos pela Doença de Crohn, como também avaliar se essas alterações têm correlação com o quadro clínico e suas repercussões na qualidade de vida do paciente. A compreensão desses mecanismos imunitários levará a definir novas bases de tratamento clínico e cirúrgico mais específicos, precisos e eficientes.

**Possíveis riscos:** O estudo oferece risco mínimo à saúde, podendo causar certo constrangimento aos voluntários, pois eles serão solicitados a se submeterem à coleta de material biológico (sangue venoso) que será utilizado para as análises genéticas e laboratoriais. O mesmo será informado da possibilidade da ocorrência de dor e/ou posterior formação de edema no local da punção, que são eventos fisiológicos normais e que variam de pessoa para pessoa.

Caso não compreenda o conteúdo ou qualquer palavra que há neste termo de consentimento, pergunte ao investigador, para melhor esclarecimento. Ambas as partes receberão uma cópia deste termo de consentimento para o seu registro.

O senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo sobre: Análise do polimorfismo gênico em diferentes formas anátomo-clínicas da Doença de Crohn.

Esse estudo não requer nenhum tipo de ônus para o voluntário, sendo todos os custos de total responsabilidade do investigador da pesquisa.

Os resultados deste estudo poderão ser aproveitados para fins de ensino e pesquisa, desde que minha identidade não seja revelada. Reservo-me o direito de interromper a minha participação no estudo se julgar conveniente, a qualquer momento, sem nenhuma penalidade. Declaro também que não receberei nenhum benefício financeiro por minha participação

Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Este projeto foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da UFPE (CEP/CCS/UFPE), de acordo com a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, sob o número de protocolo n°: 222/10 e Folha de Rosto (FR) n°: 349673. Telefone para contato com o comitê de ética: 81 2126-8588.

Desde já colocamo-nos a inteira disposição para quaisquer esclarecimentos adicionais.

Atenciosamente,

  
Mario Ribeiro de MELO-JÚNIOR

Programa de pós-graduação em Patologia

Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife, PE

Fone: 2126-8529. e-mail: [mariormj@gmail.com](mailto:mariormj@gmail.com), [wagnernf1@hotmail.com](mailto:wagnernf1@hotmail.com)

Eu, \_\_\_\_\_, RG  
\_\_\_\_\_, idade \_\_\_\_\_, declaro que entendi as informações contidas neste termo de esclarecimento,  
e todas as minhas dúvidas em relação ao estudo e a minha participação nele foram respondidas satisfatoriamente.  
Dou livre o meu consentimento em participar voluntariamente do estudo até que decida pelo contrário.

\_\_\_\_\_  
Paciente/voluntário

\_\_\_\_\_  
Testemunha 1

\_\_\_\_\_  
Testemunha 2

\_\_\_\_\_  
Pesquisador

Recife, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2011.



**APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA**  
**Universidade Federal de Pernambuco**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Patologia**

Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE  
Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo  
Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.pgmap@ufpe.br> <http://www.pospat.ufpe.br>



**PROJETO: ANÁLISE DO POLIMORFISMO GÊNICO EM DIFERENTES FORMAS ANATOMO-CLÍNICAS DA DOENÇA DE CROHN**

**FICHA CLÍNICA**

Nome: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_

Fone para contato: ( ) \_\_\_\_\_ Identificação(codificação): \_\_\_\_\_

Prontuário no HC n°: \_\_\_\_\_

1- Gênero: M ☐ F ☐

2 - Idade: \_\_\_\_\_

3 - Cor: \_\_\_\_\_

4 - Escolaridade:

☐ Analfabeto

☐ Ensino fundamental

☐ Ensino médio

☐ Superior

☐ Pós-graduado

☐ Outros: \_\_\_\_\_

5 - Profissão/ocupação: \_\_\_\_\_

6 – Diagnostico de Doença de Crohn há: \_\_\_\_\_ anos.

7 – Achados clínicos:

☐ Não ☐ Sim, qual(is): \_\_\_\_\_

8 – Achados radiológicos:

☐ Não ☐ Sim, qual(is): \_\_\_\_\_

9 – Achados endoscópicos:

☐ Não ☐ Sim, qual(is): \_\_\_\_\_

10 – Achados histopatológicos:

☐ Não ☐ Sim, qual(is): \_\_\_\_\_

11 – Forma anátomo-clínica:

☐ Inflamatória

☐ Fistulizante

☐ Estenosante

12 – Condição clínica atual (Grau de Atividade da Doença):

Índice de Atividade da Doença de Crohn(CDAI): \_\_\_\_\_

13 – Localização da doença:

- |                                    |                                     |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Esofágica | <input type="checkbox"/> Gástrica   |
| <input type="checkbox"/> Duodenal  | <input type="checkbox"/> Jejunal    |
| <input type="checkbox"/> Ileal     | <input type="checkbox"/> Íleo-cecal |
| <input type="checkbox"/> Cólon     |                                     |

14 - Envolvimento Perianal

- ☐ Sim
- ☐ Não

15 – Tratamento

- ☐ Medicamentoso Qual(is) medicamento(s): \_\_\_\_\_ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_
- ☐ Dieta
- ☐ Cirúrgico Há quanto tempo: \_\_\_\_\_

16 – Histórico familiar:

- ☐ Não
- ☐ Sim

se sim, grau de parentesco: \_\_\_\_\_ Quantos casos: \_\_\_\_\_

17 – Manifestações extra-intestinais:

- ☐ Osteoarticular: ☐ Artrite ☐ Artralgia ☐ Espondilite anquilosante ☐ Sacroiliite
- ☐ Oftalmológicas: ☐ Uveíte ☐ Conjutivite ☐ Episclerite
- ☐ Dermatológicas ☐ Pioderma gangrenoso ☐ Eritema nodoso ☐ Piodermite ☐ Aftas
- ☐ Hepatobiliares, qual(is): \_\_\_\_\_
- ☐ Vasculares, qual(is): \_\_\_\_\_
- ☐ Nefrológicas, qual(is): \_\_\_\_\_

Outro local, qual(is): \_\_\_\_\_

18 – Tem problemas cardíacos, gástricos, renais, hepáticos ou outros que necessitam de acompanhamento médico:

- ☐ Não
- ☐ Sim, qual(is): \_\_\_\_\_

19 – Já foi submetido há algum procedimento cirúrgico:

- ☐ Não
- ☐ Sim, qual(is): \_\_\_\_\_ e há quanto tempo: \_\_\_\_\_

20 – Hábitos:

☐ Tabagismo: ☐ Atual, ☐ Passado ☐ Há quanto tempo: \_\_\_\_\_

☐ Etilismo: ☐ Atual, ☐ Passado ☐ Há quanto tempo; \_\_\_\_\_

☐ Outros, qual(is): \_\_\_\_\_

## ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - UFPE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº. 316/2010 - CEP/CCS

Recife, 19 de novembro de 2010

Registro do SISNEP FR – 349673

CAAE – 0223.0.172.000-10

Registro CEP/CCS/UFPE Nº 222/10

Título: **Análise do polimorfismo gênico em diferentes formas anátomo-clínicas da Doença de Crohn.**

Pesquisador Responsável: Wagner Neves Fernandes

Senhor(a) Pesquisador(a):

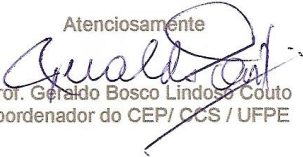
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) registrou e analisou de acordo com a Resolução N.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o protocolo de pesquisa em epígrafe, liberando-o para início da coleta de dados em 18 de novembro 2010.

Ressaltamos que a aprovação definitiva do projeto será dada após a entrega do relatório final, conforme as seguintes orientações:

- a) Projetos com, no máximo, 06 (seis) meses para conclusão: o pesquisador deverá enviar apenas um relatório final;
- b) Projetos com períodos maiores de 06 (seis) meses: o pesquisador deverá enviar relatórios semestrais.

Dessa forma, o ofício de aprovação somente será entregue após a análise do relatório final.

Atenciosamente

  
Prof. Geraldo Bosco Lindoso Couto  
Coordenador do CEP/CCS / UFPE

Ao  
Mestrando Wagner Neves Fernandes  
Pós-Graduação em Patologia – CCS/UFPE

---

Av. Prof. Moraes Rego s/n, 1º Andar, Cid. Universitária, 50670-901, Recife - PE, Tel/fax: 81 2126 8588; cepccs@ufpe.br

---

## ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA HUOC/UPE



---

### COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS COMPLEXO HOSPITALAR HUOC/PROCAPE

REUNIAO: 01/12/2010

PROTOCOLO CCS/UFPE: 222/2010  
CAAE: 0223.0.172.000-10

**PROJETO:** análise do polimorfismo gênico em diferentes formas anátomo-clínicas da doença de CROHN.

**PROTOCOLO CEP-HUOC/PROCAPE:** 207/2010

**PESQUISADOR PRINCIPAL:** Wagner neves Fernandes

#### Resultado:

Projeto **APROVADO** pela Universidade Federal de Pernambuco, **CIENTE** no Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos/ Complexo Hospitalar HUOC/PROCAPE.

Recife, 17 de dezembro de 2010

Magaly Bushatsky  
Vice-coordenadora  
CEP-HUOC/PROCAPE



Pavilhão Ovídeo Montenegro – 1º andar  
Rua Arnóbio Marques, 310 Santo Amaro – Recife/PE  
Fone: (81) 3184-1460 – FAX: (81) 3184-1271  
Email: cep\_huoc.procape@yahoo.com.br

## ANEXO C - CARTA DE ANUÊNCIA DO PROCAPE/UPE



### CARTA DE ANUÊNCIA

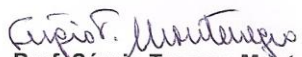
Declaramos para os devidos fins, que concordamos em receber, Wagner Neves Fernandes, Mestrando do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco/UFPE, sob a orientação da Dra. Diléia Oliveira Cipriano Torres e Dra. Maria Cleide Freire.

O mesmo deverá desenvolver seu trabalho de coleta de dados do Projeto de Pesquisa intitulado: "Análise de Polimorfismo Gênico em diferentes formas Anátomo- Clínicas da Doença de Crohn".

A pesquisa será realizada no Laboratório de Análises Clínicas do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco- PROCAPE, em consonância com a resolução CNS/CONEP- 196/96.

Após a aprovação junto ao Comitê de Ética da UFPE, o aluno deverá comparecer à Unidade de Pesquisa Clínica do HUOC/PROCAPE, entregar a cópia do projeto aprovado para que este seja submetido ao CEP da nossa instituição, que tomará ciência e posterior liberação da execução do projeto.

Recife, 21 de outubro de 2010.

  
**Dr. Sergio Tavares Montenegro**  
Diretor  
Pronto Socorro Cardiológico  
Universitário de PE - PROCAPE  
**Prof. Sérgio Tavares Montenegro**  
Diretor do Pronto Socorro Cardiológico de  
Pernambuco/PROCAPE

PROCAPE – Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco – Prof. Luiz Tavares  
Telefone: (81)3181-7114 FAX (81)3181-7206/ R. dos Palmares s/n, Santo Amaro,  
Recife-Pernambuco-CEP: 50.100-060

  
Moacir de Novaes  
CRM-PE 220244-487.211.945.2

**ANEXO D – TABELA PARA OBTENÇÃO DO ÍNDICE DA ATIVIDADE DA DOENÇA DE CROHN(CDAI)**

| Índice de Atividade da Doença de Crohn (CDAI)                                |                                                |          |                        |           |
|------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|----------|------------------------|-----------|
| Variável                                                                     | Critério                                       | Paciente | Fator de multiplicação | Resultado |
| <b>Nº de evacuações liquefeitas</b>                                          | Soma do número de evacuações de 7 dias         |          | 2                      |           |
| <b>Dor abdominal-Soma de 7 dias</b>                                          | 0 = ausente,                                   |          | 6                      |           |
|                                                                              | 1 = leve,                                      |          | 6                      |           |
|                                                                              | 2 = moderada,                                  |          | 6                      |           |
|                                                                              | 3 = intensa                                    |          | 6                      |           |
| <b>Bem-estar geral-Soma de 7 dias:</b>                                       | 0 = geralmente bem,                            |          | 6                      |           |
|                                                                              | 1 = discretamente mal,                         |          | 6                      |           |
|                                                                              | 2 = mal,                                       |          | 6                      |           |
|                                                                              | 3 = muito mal,                                 |          | 6                      |           |
|                                                                              | 4 = terrível                                   |          | 6                      |           |
| <b>Achados extra-intestinais: Qualquer um dos abaixo nos últimos 7 dias:</b> | · Artrite ou artralgias                        |          | 20                     |           |
|                                                                              | · Lesões orais ou mucosas                      |          | 20                     |           |
|                                                                              | · Irite ou uveíte                              |          | 20                     |           |
|                                                                              | · Fissura anal, fístula ou abscesso perirretal |          | 20                     |           |
|                                                                              | · Outra fístula externa                        |          | 20                     |           |
|                                                                              | · Febre                                        |          | 20                     |           |
| <b>Uso de opióides para diarreia</b>                                         | 0 = não                                        |          | 30                     |           |
|                                                                              | 1= sim                                         |          | 30                     |           |
| <b>Massa abdominal</b>                                                       | 0 = ausente,                                   |          | 10                     |           |
|                                                                              | 2 = questionável                               |          | 10                     |           |
|                                                                              | 5 = presente                                   |          | 10                     |           |
| <b>Hematócrito</b>                                                           | 47 - Ht (para homens)                          |          | 6                      |           |
|                                                                              | 42% - Ht (para mulheres)                       |          | 6                      |           |
| <b>Percentual de baixo peso</b>                                              | 100 x [1-(peso atual/peso padrão)]             |          | 1                      |           |

**ANEXO E – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO**

Manuscript Number:

Title: Interleukin-10 (IL-10) and Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) genotypes in Brazilian patients with Crohn's Disease

Article Type: Research Article

Keywords: Crohn's Disease; Cytokines; Tumor necrosis factor alpha; Interleukin 10; Polymorphisms.

Corresponding Author: Dr. Mário Ribeiro Melo-Júnior, PhD

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Pernambuco

First Author: Wagner N Fernandes, MSc

Order of Authors: Wagner N Fernandes, MSc; Luciana P Santos, Graduate student; Hildson D Angelo, MSc; Valéria F Martinelli, MD; Maurílio T Lucena, PhD; Paulo E Souza, PhD; Mário Ribeiro Melo-Júnior, PhD

**Abstract:** Crohn's Disease (CD) is a recurrent chronic inflammatory disease characterized by segmental transmural inflammation that may affect any part of the digestive tract. Polymorphisms in cytokines genes may play an important role in the development and clinical manifestation. Due to this, there is a great interest in the identification of biomarkers that which could quantify the susceptibility and disease activity. A case-control study of 49 CD cases and 132 CD-free adults controls, was performed to analyze whether or not the polymorphisms of the TNF- $\alpha$  gene promoter at positions -308 G/A and IL-10 gene promoter at positions -1082 G/A would alter the risk for CD and clinical manifestations. Genotyping was carried out by polymerase chain reaction, PCR products to TNF- $\alpha$  polymorphism were digested by NcoI restriction enzyme and fractionated after on 2% Agarose gel and visualized posteriorly staining by ethidium bromide, while the PCR products to IL-10 polymorphism were fractionated on 1.5% Agarose gel and visualized posteriorly staining by ethidium bromide. There were not significant differences in the distribution of the TNF- $\alpha$  and IL-10 gene polymorphisms between the CD and control groups. Moreover, no association was observed between genotypic distribution of CD patients and localization or behavior's disease. Our data support the hypothesis that the TNF- $\alpha$ /IL-10 genotypes did not play an important role in pathogenesis of Crohn's disease in Brazilian.

Suggested Reviewers: Maria M Maia PhD

Professor, Biology, Universidade Federal Rural de Pernambuco  
mascenadiniz@hotmail.com  
She works with molecular biology

Paula S Garcia PhD

Professor, Genetics, Universidade Federal de Pernambuco  
paula\_sandrin@yahoo.com.br  
She works with molecular biology and immune disorders

Nicodemos T Pontes-Filho PhD

Professor, Pathology, Universidade Federal de Pernambuco  
nicopontes@gmail.com

## ANEXO F - INSTRUÇÃO/NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS DA REVISTA HUMAM IMMUNOLOGY



### HUMAN IMMUNOLOGY

Official Journal of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics

#### AUTHOR INFORMATION PACK

#### TABLE OF CONTENTS

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| • Description              | p.1 |
| • Audience                 | p.2 |
| • Impact Factor            | p.2 |
| • Abstracting and Indexing | p.2 |
| • Editorial Board          | p.2 |
| • Guide for Authors        | p.4 |



ISSN: 0198-8859

#### DESCRIPTION

*Human Immunology* publishes full-length original articles, brief communications and reviews covering a wide range of subjects including immunogenetics, innate and adaptive immunity, transplantation immunology, autoimmunity, infectious diseases and tumor immunology. The scope of the journal is to disseminate information that may contribute to understanding the mechanisms involved in the genetic control of organ and tissue allograft rejection, alloimmunity, chronic infections and progression of malignant diseases.

Research areas include:

1. Immunogenetic studies on structure and function of molecules involved of immune responses; immunogenetic markers including polymorphism of immunogenetics markers such as HLA, minor histocompatibility antigens, immune receptors (KIR, NK, Toll-like, ILT, MICA/B, PAMPs, etc); population frequencies and disease association studies.
2. Cellular Immunology and Immune Regulation covering the broad areas of in vitro and in vivo studies of innate and adaptive immunity in health and disease.
3. Clinical Immunology including transplantation, cancer immunology, autoimmunity, delayed-type-hypersensitivity, immunological deficiencies, immunologic monitoring, immunotherapy, and immunomodulation.
4. Biotechnological innovations for detection of new genes and gene products including genomics and proteomics strategies.

#### Manuscript Types

##### a) Full-Length Articles

Limit 4000 words excluding references, tables, and figures

Abstract 200 words maximum

References up to 50

##### b) Brief Communications

Limit 2500 words

Abstract 150 words

References up to 30

c) Review Articles  
Limit 5000 words, excluding references, tables, and figures  
Abstract 200 words maximum  
References up to 80

## AUDIENCE

---

Immunologists, Geneticists, Pathologists, Biochemists, Histocompatibility Technologists.

## IMPACT FACTOR

---

2011: 2.837 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2012

## ABSTRACTING AND INDEXING

---

BIOSIS  
Chemical Abstracts  
Current Contents/Life Sciences  
EMBASE  
Elsevier BIOBASE  
MEDLINE®  
SIIC Data Bases  
Scopus

## EDITORIAL BOARD

---

### *Editor-in-Chief*

**Nicole Suciu-Foca**, New York, NY, USA

### *Section Editors*

**Frans Claas**, Leiden, Netherlands  
**Adriana Colovai**, New York, NY, USA  
**Marcelo Fernandez-Viña**, Houston, TX, USA  
**Derek Middleton**, Liverpool, UK  
**George Vlad**, New York, NY, USA  
**Adriana Zeevi**, Pittsburgh, PA, USA

### *Editorial Board*

**Luciano Adorini**, Corciano (Perugia), Italy  
**Vincenzo Barnaba**, Rome, Italy  
**Lee Ann Baxter-Lowe**, San Francisco, CA, USA  
**Jan Bubenik**, Prague 4, Czech Republic  
**William Burlingham**, Madison, WI, USA  
**Edgardo Carosella**, Paris Cédex 10, France  
**Dominique Charron**, Paris, France  
**Lucienne Chatenoud**, Paris, France  
**Edward Clark**, Seattle, WA, USA  
**Marco Colonna**, St. Louis, MO, USA  
**Rafaello Cortesini**, New York, NY, USA  
**Julius M. Cruse**, Jackson, MS, USA  
**Roger L. Dawkins**, Canning Vale, WA, Australia  
**René J. Duquesnoy**, Pittsburgh, PA, USA  
**David Eckels**, Milwaukee, WI, USA  
**Soldano Ferrone**, Buffalo, NY, USA  
**Howard Gebel**, Charleston, SC, USA  
**Amy Hahn**, New York, NY, USA  
**Mark Hardy**, New York, NY, USA  
**William Hildebrand**, Oklahoma City, OK, USA  
**Graham A. Hitman**, London, UK  
**Ronald Kerman**, Houston, TX, USA

**Seunghee Kim-Schulze**, New York, NY, USA  
**Malak Kotb**, Cincinnati, OH, USA  
**Lewis Lanier**, San Francisco, CA, USA  
**Mary Leffell**, Baltimore, MD, USA  
**Robert E. Lewis**, Jackson, MS, USA  
**Zhuoru Liu**, New York, NY, USA  
**Steve Mack**, Oakland, CA, USA  
**J.A. Madrigal**, Hampstead, London, UK  
**F. Manca**, Genova, Italy  
**Alberto Mantovani**, Milan, Italy  
**Steven G.E. Marsh**, Hampstead, London, UK  
**Wolfgang Mayr**, Vienna, Austria  
**Diogo Meyer**, São Paulo, Brazil  
**Th. Mohanakumar**, St. Louis, MO, USA  
**Lorenzo Moretta**, Genova, Italy  
**Harriet Noreen**, Minneapolis, MN, USA  
**Gerhard Opelz**, Heidelberg, Germany  
**Peter Parham**, Stanford, CA, USA  
**Giorgio Parmiani**, Milan, Italy  
**Alessandra Pernis**, New York, NY, USA  
**Jeff Platt**, Ann Arbor, MI, USA  
**Lloyd Ratner**, New York, NY, USA  
**Elaine Reed**, Los Angeles, CA, USA  
**Nancy Reinsmoen**, Los Angeles, CA, USA  
**Maria Roncarolo**, Milan, Italy  
**Shimon Sakaguchi**, Kyoto, Japan  
**Federica Sallusto**, Bellinzona, Switzerland  
**Carani Sanjeevi**, Stockholm, Sweden  
**Takehiko Sasazuki**, Tokyo, Japan  
**Michael Schlesinger**, Jerusalem, Israel  
**Alessandro Sette**, La Jolla, CA, USA  
**Ethan Shevach**, Bethesda, MD, USA  
**Richard Single**, Burlington, VT, USA  
**Francesco Sinigaglia**, Milan, Italy  
**Jean-Paul Soulillou**, Nantes, France  
**Peter Stastny**, Dallas, TX, USA  
**Catherine Stravopoulos-Giokas**, Athens, Greece  
**Jack Strominger**, Cambridge, MA, USA  
**Paul I. Terasaki**, Los Angeles, CA, USA  
**John Trowsdale**, Cambridge, UK  
**Dolly Tyan**, PALO ALTO, CA, USA  
**Kathryn J Wood**, Oxford, UK  
**Andrea A. Zachary**, Baltimore, MD, USA

## GUIDE FOR AUTHORS

---

### INTRODUCTION

*Human Immunology*, the official journal of the American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), publishes full-length original articles, brief communications and reviews covering a wide range of subjects including immunogenetics, innate and adaptive immunity, transplantation immunology, autoimmunity, infectious diseases and tumor immunology. The scope of the journal is to disseminate information that may contribute to understanding the mechanisms involved in the genetic control of organ and tissue allograft rejection, alloimmunity, chronic infections and progression of malignant diseases.

Research areas include: Immunogenetic studies on structure and function of molecules involved of immune responses; immunogenetic markers including polymorphism of immunogenetics markers such as HLA, minor histocompatibility antigens, immune receptors (KIR, NK, Toll-like, ILT, MICA/B, PAMPs, etc); population frequencies and disease association studies. Cellular Immunology and Immune Regulation covering the broad areas of in vitro and in vivo studies of innate and adaptive immunity in health and disease. Clinical Immunology including transplantation, cancer immunology, autoimmunity, delayed-type-hypersensitivity, immunological deficiencies, immunologic monitoring, immunotherapy, and immunomodulation. Biotechnological innovations for detection of new genes and gene products including genomics and proteomics strategies.

#### *Types of paper*

##### a) Full-Length Articles

Limit 4000 words excluding references, tables, and figures

Abstract 200 words maximum

References up to 50

##### b) Brief Communications

Limit 2500 words

Abstract 150 words

References up to 30

##### c) Review Articles

Limit 5000 words, excluding references, tables, and figures

Abstract 200 words maximum

References up to 80

The manuscript should include the following sections: Title Page, Abstract (not more than 200 words), Keywords (up to 5), Abbreviations (list of abbreviations used), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Figure Legends, and Figures.

The title page should include the names and affiliations of the authors, the complete address, e-mail address, and telephone and facsimile numbers of the corresponding author, five keywords, and an abbreviated title of not more than 45 characters and spaces. Footnotes in the text should be defined on the page on which they appear and be numbered consecutively with superscript Arabic numerals.

#### *Contact details for submission*

Submission of manuscripts to this journal proceeds totally online, by means of the electronic submission tool (EES) at <http://ees.elsevier.com/him>

#### **Page charges**

This journal has no page charges.

### BEFORE YOU BEGIN

#### **Ethics in publishing**

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

### **Policy and ethics**

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)* for experiments involving humans <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU for animal experiments* [http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab\\_animals/legislation\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm); *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

### **Conflict of interest**

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

### **Submission declaration**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### **Contributors**

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

### **Changes to authorship**

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

*Before the accepted manuscript is published in an online issue:* Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

*After the accepted manuscript is published in an online issue:* Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

### **Clinical trial results**

In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors, the journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results in other circumstances (e.g., investors' meetings) is discouraged and may jeopardise consideration of the manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of results of the same or closely related work.

### **Reporting clinical trials**

All randomised controlled trials submitted for publication should include a completed Consolidated Standards of Reporting Trials (CONSORT) flow chart. Please refer to the CONSORT statement website at <http://www.consort-statement.org> for more information. This journal has adopted the proposal from the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) which require, as a condition of consideration for publication of clinical trials, registration in a public trials registry. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. For this purpose, a clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more

health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration. Further information can be found at <http://www.icmje.org>.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

### **Retained author rights**

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

### **Funding body agreements and policies**

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

### **Language and language services**

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

### **Patient details**

Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission. For further information see <http://www.elsevier.com/patientphotographs>.

### **Submission**

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

### **Submit your article**

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/him/>

## Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

## PREPARATION

### Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

### Article structure

#### *Subdivision - numbered sections*

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced, with details of supplier and catalogue number when appropriate. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

### Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

## Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 5 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

## Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

## Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

## Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving their readers one-click access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalized (see example below). This combination of letters and format will enable the typesetter to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example: GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. **BE675048** ), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117** ).

In the final version of the *printed article*, the accession number text will not appear bold or underlined. In the final version of the *electronic copy*, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases, enabling readers to go directly to that source from the article.

## Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, footnotes in the text should be defined on the page on which they appear. Do not include footnotes in the Reference list.

## Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

## Electronic artwork

### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### *Formats*

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

#### **Please do not:**

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

#### *Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

#### *Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

#### *Tables*

Each table should be typed double-spaced on a separate page, and numbered consecutively in accordance with their appearance in the text. Table titles should be informative, with detailed information appearing as footnotes. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Use only horizontal rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

### **References**

#### *Citation in text*

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

#### *Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

### Reference style

**Text:** Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

**List:** Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

### Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

### Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

### Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

### Supplementary material captions

Each supplementary material file should have a short caption which will be placed at the bottom of the article, where it can assist the reader and also be used by search engines.

### Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

#### Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address

- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

## AFTER ACCEPTANCE

### *Use of the Digital Object Identifier*

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*):

<http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

### *Proofs*

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author or a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

### *Offprints*

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

## AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You

can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>