Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde

MAYARA COSTA MANSUR TAVARES

ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS E ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE GENES RELACIONADOS À RESPOSTA IMUNE EM RETOCOLITE ULCERATIVA E DOENÇA DE CROHN

Recife
2016

MAYARA COSTA MANSUR TAVARES

ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS E ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE GENES RELACIONADOS À RESPOSTA IMUNE EM RETOCOLITE ULCERATIVA E DOENÇA DE CROHN

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior
Co-orientador: Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão

Recife
2016

Catalogação na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Tavares, Mayara Costa Mansur
Aspectos clínico-epidemiológicos e análise de polimorfismo de genes relacionados à resposta imune em retocolite ulcerativa e Doença de Crohn / Mayara Costa Mansur Tavares- Recife: O Autor, 2016.

73 folhas : il., fig., tab.
Orientador: Mário Ribeiro de Melo Júnior
Coorientador: Lucas André Cavalcanti Brandão
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2016.
Inclui referências e anexos

1. Intestinos- doenças 2. Citocinas 3. Polimorfismo (genética) I. Melo Júnior, Mário Ribeiro (orientador) II. Brandão, Lucas André Cavalcanti (coorientador) III. Título

616.34 CDD (22.ed.) UFPE/CCB-2016-310

ASPECTOS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICOS E ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE GENES RELACIONADOS À RESPOSTA IMUNE EM RETOCOLITE ULCERATIVA E DOENÇA DE CROHN

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 02/09/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Prof. Dr. Mário Ribeiro de Melo Júnior (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho (membro interno)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Profa. Dra. Carina Scanoni Maia (membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Dr. Marcelo Henrique Santos Paiva (membro externo)
Universidade Federal de Pernambuco

_____

Prof. Dr. Maurílio Toscano de Lucena (membro externo)
Hospital Barão de Lucena
UNINASSAU

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter dado todas as condições para que eu chegasse até este momento, fortalecendo e orientando meus passos para concluir esta jornada.

Ao meu marido e amigo Adônis pelo suporte, incentivo e paciência durante os primeiros anos de casados que coincidiram com os anos do doutorado. Por compreender minha ausência devido à importância deste título para mim e tornar meus dias mais felizes.

Aos meus pais Sergio e Nilda e também ao meu avô paterno Murilo (*in memorian)* por acreditarem e tornarem possível uma educação de qualidade além de formarem meu caráter com o exemplo que eles transmitem.

À grande amiga e colaboradora Camilla pela dedicação e suporte em todas as etapas deste trabalho. Seu auxílio foi de extrema importância para realização deste trabalho, além da experiência e conhecimento transmitidos.

À minha irmã Cynara e aos amigos que fiz durante estes anos, por trazerem leveza e alegrias nesta caminhada: Jamilly, Kaliny, Luciana, Sérgio, Arthur, Sabrina, Taciana, Mª Izabel, Ingrid, Abinaésia, Renata, Márcia, Patrícia, Ana Lúcia, Gláucia, Juliana, Isa, Bruno, Ranilson, vocês fazem parte desta conquista pelas parcerias e desabafos compartilhados.

Ao meu orientador Prof. Mário pelo investimento, dedicação, disponibilidade, pelas palavras de motivação e suporte em todas as etapas de construção desse trabalho e por confiar que seria possível executar o projeto mesmo a distância. Uma pessoa admirável!

Ao meu co-orientador Prof. Lucas Brandão pelo suporte técnico e visão estratégica, por aplicar seus ricos ensinamentos na realização deste trabalho.

Ao prof. Luiz de Carvalho pela atenção dispensada, pelo incentivo e atendimento pessoal que dá aos alunos do PPGBAS. A todos os professores do PPGBAS que contribuíram para minha formação. Aos secretários Fábio e Eliete que prestaram gentilmente assistência durante a pós-graduação.

Aos médicos Dr. Maurilio Toscano e Dra. Valéria Martinelli que contribuíram bastante para a realização deste trabalho. Aos membros da banca pelas críticas construtivas e colaborações.

A todos que torceram pela minha vitória, muito obrigada!

RESUMO

Doença inflamatória intestinal descreve um grupo heterogêneo de doenças inflamatórias crônicas do trato gastrointestinal. Os dois principais tipos de DII são retocolite ulcerativa idiopática e doença de Crohn. A patogênese dessas doenças é caracterizada pela inflamação persistente no intestino, envolvendo uma interação entre fatores genéticos, ambientais e imunológicos. Foram investigados aspectos clínico-epidemiológicos e analisados os polimorfismos dos genes da reposta imune em pacientes brasileiros com doença inflamatória intestinal em diferentes formas anátomo-clínicas. Um total de 101 pacientes foram analisados (43 - retocolite ulcerativa idiopática e 58 - doença de Crohn) para os polimorfismos dos genes do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α -308 G/A; rs1800629), interleucina-10 (IL-10 -1082 G/A; rs1800896), domínio do recrutamento e ativação da caspase 15/receptor tipo NOD2 (CARD15/NOD2; rs2066844 e rs2066845), receptor tipo NOD contendo domínio pirina – NLRP1 (rs12150220), NLRP3 (rs35829419) e interleucina -1beta (IL-1β -511T/C; rs16944). A forma anatómica-clínica de DC predominante foi a fistulizante (29,31%), seguida por inflamatória (27,58%) e estenosante (27,58%). O grupo controle foi composto por 91 indivíduos saudáveis. Os genes do receptor tipo NOD contendo domínio pirina 1 e 3 e do domínio do recrutamento e ativação da caspase 15/receptor tipo NOD2 variantes R702W e G908R não foram associados à susceptibilidade a doença inflamatória intestinal. Em relação ao polimorfismo da interleucina 10, nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os genótipos e alelos para a doença inflamatória intestinal comparado aos controles. Fator de necrose tumoral alfa mostrou uma associação estatisticamente significativa entre pacientes e controles de retocolite ulcerativa idiopática que sugere que a presença do alelo A predispõe o aparecimento de retocolite ulcerativa idiopática, mas não doença de Crohn. Verificou-se ainda que o genótipo AG da interleucina 1 foi associado com o desenvolvimento de retocolite ulcerativa idiopática. Os resultados sugerem que os polimorfismos de única base do fator de necrose tumoral alfa e da interleucina 1 estão envolvidos com a retocolite ulcerativa idiopática e podem contribuir para a patogênese na população brasileira estudada.

Palavras-chave: 1. Inflamassoma. 2. Interleucina 1. 3. Fator de Necrose Tumoral alfa. 4. Polimorfismo de Única Base. 5. Doença inflamatória intestinal.

ABSTRACT

Inflammatory bowel disease describes a heterogeneous group of chronic inflammatory diseases of the gastrointestinal tract. The two main types of inflammatory bowel disease are ulcerative colitis and Crohn disease. The pathogenesis of the disease is characterized by unpredictable attacks of inflammation of the intestine, besides involving an interaction between genetic, environmental and immunological factors. Clinical and epidemiological aspects were investigated and the polymorphisms of genes of the immune response in Brazilian patients with inflammatory bowel disease in different anatomic-clinical forms were analyzed. A total of 101 patients were analyzed (43 - ulcerative colitis and 58 - Crohn disease) for the tumour necrosis factor alpha (TNF-α -308 G/A; rs1800629), interleukin-10 (IL-10 -1082 G/A; rs1800896), caspase activation and recruitment domains 15/ NOD like receptor 2 (CARD15/NOD2; rs2066844 and rs2066845), NOD like receptor pyrin domain containing – NLRP1 (rs12150220), NLRP3 (rs35829419) and interleukin-1beta (IL-1β -511T/C; rs16944) genes polymorphisms. The anatomic-clinical form of Crohn disease predominant was the fistulizing (29.31%), followed by inflammatory (27.58%) and stricturing (27.58%). A control group was composed by 91 healthy subjects group. NOD like receptor pyrin domain containing 1 and 3 and caspase activation and recruitment domains 15/ NOD like receptor 2 genes R702W and G908R variants were not associated to inflammatory bowel disease susceptibility. With respect to the polymorphism of interleukin-10, no statistical difference was found between the genotypes and alleles for inflammatory bowel disease compared to controls. Tumour necrosis factor alpha showed a statistically significant association between ulcerative colitis patients and controls which suggests that the presence of A allele predisposes the onset of ulcerative colitis but not Crohn disease. It was found yet that AG genotype of interleukin-1beta was associated with the development of ulcerative colitis. The results suggest that the tumour necrosis factor alpha and interleukin-1beta single nucleotide polymorphisms are involved with ulcerative colitis and may be contributing to pathogenesis in Brazilian population.

Keywords: 1. Inflammasome. 2. Interleukin 1. 3. Tumour Necrosis Factor alpha. 4. Single Nucleotide Polymorphism. 5. Inflammatory bowel disease.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição mundial da incidência da Doença Inflamatória Intestinal.....13

Figura 2 - Regiões intestinais de acometimento da doença de Crohn.....14

Figura 3 - Locais de acometimento da retocolite ulcerativa idiopática.....15

Figura 4 - Após o contato inicial de um antígeno com um receptor de reconhecimento padrão ocorrem sucessivos fatos que desencadeiam a hidrólise da pró-caspase-1 pelo inflamassoma e posterior ativação e liberação da IL-1. 23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização dos pacientes ……..…….29

Tabela 2. Frequências dos genótipos dos polimorfismos dos genes NLRP1, NLRP3, CARD15/NOD2 variante R702W e CARD15/NOD2 variante G908R e sua associação com o risco para as DII (DC e RCUI).....31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM2	- Ausente em melanoma 2
ALB	- Albumina
AP-1	- Proteína ativadora-1
AR	- Artrite reumatóide
CTL	- Lectina tipo C
CARD	- Domínio de recrutamento de caspase ou *caspase activation and recruitment domains*
CRP	Proteína C reativa
DAMP	- Padrão molecular associado ao perigo
DII ou IBD	- Doença Inflamatória Intestinal ou *Inflammatory Bowel Disease*
DC ou CD	- Doença de Crohn ou *Crohn's disease*
HIV	- *Human Immunodeficiency Virus*
IFN	- Interferon
IL	- Interleucina
iRF	- Fator regulatório de interferon
MS	- Esclerose Múltipla
NF-kB	- Fator nuclear kappa B
NLPR	- Receptor tipo NOD contend domínio pirina ou NOD like receptor pyrin domain containing
NOD	- Domínio de oligomerização nucleotídica
PAMP	- Padrão molecular associado a patógeno
PCR-SSP	- *Polymerase Chain Reaction - Sequence Specific Primer*
PRR	- Receptor de reconhecimento padrão
PS	- Psoríase
RCUI ou UC	- Retocolite Ulcerativa Idiopática ou *ulcerative colitis*
SLE	- Lúpus eritematoso sistêmico
SNP	- *Single Nucleotide Polymorphism*
TLR	- Receptor do tipo *toll*
TNF	- Fator de Necrose Tumoral
VHS	- Velocidade de Hemossedimentação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ……..……..11
1.1 REVISÃO DE LITERATURA.....12
1.1.1 Dados Epidemiológicos.....12
1.1.2 Doença de Crohn 14
1.1.2.1 Formas Anátomo-Clínicas na Doença de Crohn 15
1.1.3 Retocolite Ulcerativa Idiopática.....15
1.1.4 Fatores Relacionados às Doenças Inflamatórias Intestinais…….16
1.1.5 Marcadores Séricos e Fecais.....17
1.1.6 Resposta Imunológica.....18
1.1.6.1 Resposta Imune Intestinal.....19
1.1.6.2 Citocinas.....20
1.1.6.3 Inflamassomas.....22
1.1.7 Polimorfismos Genéticos Associados.....23
1.2 OBJETIVOS
1.2.1 Objetivo Geral.....26
1.2.2 Objetivos Específicos.....26
1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....27
2 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....29
3 DISCUSSÃO.....33
4 CONCLUSÃO.....35
REFERÊNCIAS.....36
ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO.....50
ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO.....57
ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....73

1 INTRODUÇÃO

Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) constituem um grupo heterogêneo de doenças cuja manifestação comum é a inflamação do trato gastrointestinal de forma aguda ou crônica (FEAGAN, 2003). A Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI), juntamente com a Doença de Crohn (DC) compõem as DII mais frequentes da atualidade (LANNA et al, 2006). Essas doenças são resultantes da ativação persistente e inadequada do sistema imune mucoso (ROBBINS; CONTRAN, 2005), associando-as a um distúrbio autoimune (NAKAMURA; MATSUTANI; BARRY, 2003).

Apesar de existirem estudos clínicos e experimentais, a etiopatogenia das DII ainda permanece desconhecida. Tanto DC quanto RCUI são doenças multifatoriais causadas pela interação de fatores genéticos e ambientais (FIOCCHI, 1998). Estudos epidemiológicos apontam vários fatores exógenos, tais como agentes infecciosos e fumo que podem contribuir para o risco aumentado em desenvolver as DII (HUGOT et al, 1999). Uma extensa pesquisa sobre imunopatologia do intestino inflamado sugere que a resposta imune do hospedeiro pode desempenhar um papel significativo no desencadeamento e persistência da inflamação (RADFORD-SMITH, 1996).

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

Desta forma, é relevante avaliar aspectos clínico-epidemiológicos e o perfil genético populacional diferenciado que pode estar interferindo na reposta dos pacientes ao mesmo tratamento das DII (PRESCOTT et al, 2010).

Esse trabalho objetivou estudar aspectos clínico-epidemiológicos e analisar o perfil genético de alguns genes de pacientes portadores de doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) e verificar se, alterações em genes da resposta imune estão associadas com a suscetibilidade e comportamento dessas doenças inflamatórias intestinais.

1.1 REVISÃO DE LITERATURA

As Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são de um importante agravo em saúde pública devido à etiologia ainda ser desconhecida (KARLINGER et al, 2000). Além disso, os tratamentos desse grupo de doenças apresentam custos elevados e estão associadas a uma diversidade de fatores genéticos, imunológicos e ambientais (FEAGAN, 2003). A retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) e a doença de Crohn (DC) são as DII mais comuns (LANNA et al, 2006). A inflamação na DC pode envolver qualquer segmento do tubo digestório, desde a boca até o ânus, e pode afetar a mucosa e as camadas mais profundas da parede do aparelho digestório (LAASS; ROGGENBUCK; CONRAD, 2014). As lesões RCUI são contínuas e limitadas à mucosa do intestino grosso, envolvendo o reto e o cólon (PODOLSKY, 1991).

Os principais sintomas dessas doenças são diarreia, dor abdominal e sangramento retal (DAMIÃO; SIPAHI, 2004). A atividade da doença é tipicamente recidivante e remitente, tanto em RCUI como em DC (ISKANDAR; CIORBA, 2012). Atingem pessoas jovens e apresentam diversas formas clínicas de alta gravidade (JEWEL, 2006), com manifestações extraintestinais que afetam as articulações, olhos e / ou pele em até 25% dos pacientes (ISKANDAR; CIORBA, 2012).

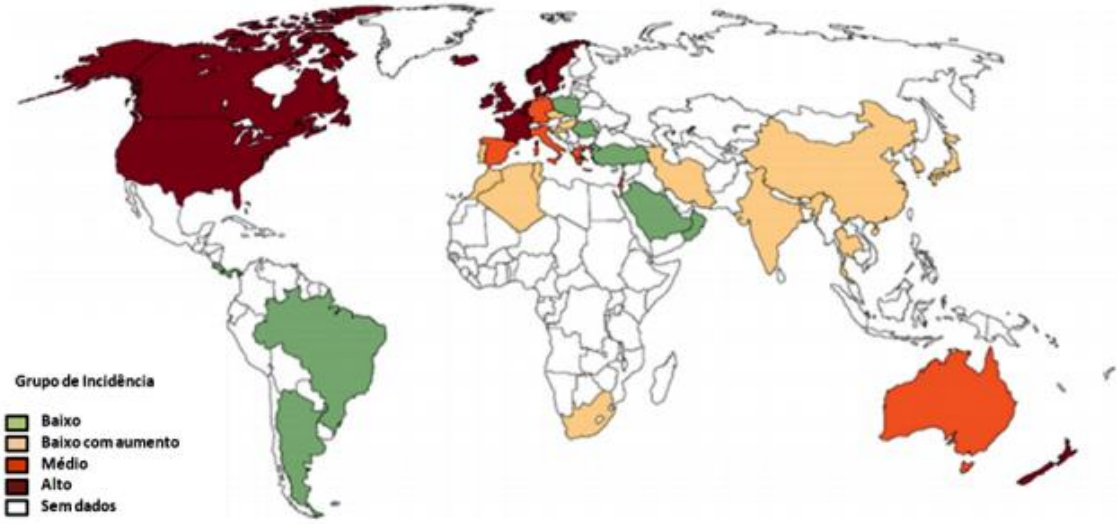
Em aproximadamente 10% dos casos, os sintomas clínicos das duas formas mais comuns de DII se sobrepõem tornando difícil o diagnóstico diferencial (STHERLAND; ROTH; BECK, 2002). Nestes casos, onde a classificação das DII permanece difícil, ferramentas adicionais como dados endoscópicos e achados histológicos auxiliam o diagnóstico (FIOCCHI, 1998).

1.1.1 Dados Epidemiológicos

A prevalência e incidência destas doenças variam de acordo com a região geográfica estudada. Estudos demonstram que a incidência das DII é menor em países em desenvolvimento e está intimamente relacionada com a ocidentalização devido à frequência elevada da referida doença em países ocidentais e rara no Extremo Oriente (apesar de a globalização estar mudando essas estatísticas) (HANSEN et al, 2010) (Figura 1). 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 áreas urbanas e em indivíduos com melhor padrão socioeconômico, levantando a hipótese de que possa

haver associação com higiene e sanitarismo básico, através da alteração da flora intestinal (KRISHNAN; KORZENICK, 2002; LOFTUS, 2004).

Figura 1: Distribuição mundial da incidência da Doença Inflamatória Intestinal



Fonte: COSNES et al, 2011.

As DIIs são mais frequentes em países industrializados apresentando altas taxas de incidência e prevalência (6,5-16,0 / 100.000 e 26-214 pacientes / 100.000 pessoas / ano, respectivamente) em comparação com os países onde o desenvolvimento industrial não é tão forte (0,08-5,0 e 3,6-70,0 pacientes / 100.000 pessoas / ano, respectivamente) (DOBSON, 2002; VICTORIA; SASSAKI; NUNES, 2009).

Atualmente essas doenças afetam mais de 2,2 milhões de pessoas na Europa (LOFTUS, 2004) e 1,4 milhão de americanos (ABRAHAM; CHO, 2009). A alta incidência anual de DC foi determinada em 12,7 casos por 100.000 habitantes/ano na Europa, 5,0 pessoas 100.000 habitantes/ano na Ásia e no Oriente Médio e 20,2 casos por 100.000 habitantes/ano na América do Norte (MOLODECKY et al, 2012).

A RCUI apresenta um aumento da incidência e da prevalência em todo o mundo. A frequência dessas taxas é diferenciada com relação à idade, origem étnica e localização geográfica. A taxa de prevalência para RCUI é de 90 a 505 por 100.000 no norte da Europa e na América do Norte (BOWLUS, 2010; EKBOM, 2003; LOGAN; MOLODECKY et al, 2012). A doença é menos comum no leste e sul da Europa, e pelo menos 10 vezes menos comum em populações asiáticas, africanas e orientais (HANAUER, 2006; LOGAN; BOWLUS, 2010; MOLODECKY et al, 2012).

No Brasil, existem poucos estudos sobre os aspectos epidemiológicos das DII. A maioria deles apenas descreve características clínicas e a frequência de internação por

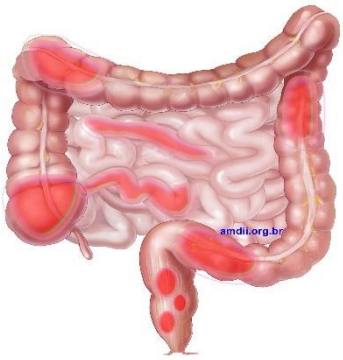
DII, sem referência à incidência e prevalência destas doenças (BERNSTEIN et al, 2006; SOUZA et al, 2002).

A escassez de dados para estudo de prevalência e incidência provavelmente pode ser devido ao impasse de realizar o diagnóstico. A ausência de teste padrão-ouro, a multiplicidade de sintomas, a grande prevalência de diarreias infecciosas e parasitárias e o custo dos exames diagnósticos dificultam o prognóstico (LOFTUS, 2004).

1.1.2 Doença de Crohn

Doença de Crohn (DC) é caracterizada por distribuição descontínua das regiões de inflamação intestinal. Esta doença pode acometer o trato gastrointestinal desde a boca até ânus, porém ocorre mais frequentemente no íleo terminal e cólon (SAWCZENKO; SANDHU, 2003; GRIFFITHS, 2004; VERNIER–MASSOUILLE; BALDE; SALLERON, 2008) (Figura 2).

Figura 2: Regiões intestinais de acometimento da doença de Crohn



Fonte: Associação Mineira dos Portadores de Doenças Inflamatórias Intestinais.

No início das manifestações clínicas, a DC não apresenta sintomas específicos, o que torna seu diagnóstico tardio. Os sintomas mais comuns são dor abdominal (86%), diarreia (78%), ou presença de sangue nas fezes (49%). Em crianças, o paciente pode ser diagnosticado com DC enquanto estiver sendo avaliado para a desnutrição, baixa estatura, puberdade tardia, fadiga ou doença, por vezes fistulizante (SAWCZENKO; SANDHU, 2003; GRIFFITHS, 2004; VERNIER–MASSOUILLE; BALDE; SALLERON, 2008).

1.1.2.1 Formas Anátomo-Clínicas na Doença de Crohn

No exame histopatológico, a inflamação é geralmente transmural que pode afetar todas as camadas, da mucosa à serosa e, pode ser caracterizada por lesões alternadas. Em decorrência disto, as complicações da doença incluem fibrose intestinal, estenoses e formação de fístula (ISKANDAR; CIORBA, 2012).

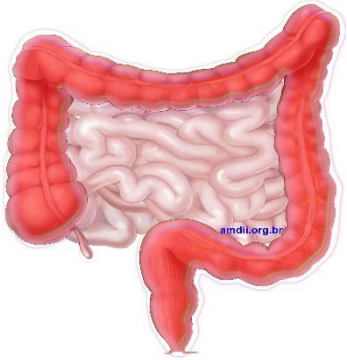
Nos casos de doença inflamatória sem complicações, o padrão clínico é classificado em não-estenosante/não-penetrante (inflamatória). No caso de ocorrência de estreitamentos intestinais ou anorretais de repetição documentados por exames radiológicos, endoscópicos ou cirúrgico-patológicos, com dilatação pré-estenótica ou com sinais ou sintomas de obstrução, sem a presença de doença penetrante, é classificado como estenosante. A doença penetrante (fistulizante) é assim caracterizada nos casos de ocorrência de fístulas intra-abdominais ou perianais, massas inflamatórias e/ou abcessos (ALMEIDA et al, 2004).

Fístulas são ligações formadas em regiões afetadas por ulceração gastrointestinal para outras partes do órgão ou da superfície de uma pele vizinha. (SAWCZENKO; SANDHU, 2003; GRIFFITHS, 2004; VERNIER–MASSOUILLE; BALDE; SALLERON, 2008).

1.1.3 Retocolite Ulcerativa Idiopática

A retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) acomete total ou parcialmente, a extensão do cólon ou reto. No cólon a inflamação está confinada à camada mucosa sem lesão alternada, embora os pacientes possam ter gastrite ou colite distal. Crianças apresentam pancolite mais frequente do que os adultos (Figura 3). (CONRAD; ROGGENBUCK; LAASS, 2014; ROBBINS; CONTRAN, 2005).

Figura 3: Locais de acometimento da retocolite ulcerativa idiopática.



Fonte: Associação Mineira dos Portadores de Doenças Inflamatórias Intestinais

Os sintomas da RCUI podem incluir diarreia, cólicas abdominais, sangue nas fezes e tenesmo. Devido à presença de sangue nas fezes, a atenção médica é procurada muito mais cedo do que em DC (ISKANDAR; CIORBA, 2012).

Outras manifestações extraintestinais, tais como perda de peso, desnutrição e atraso da puberdade são menos comumente observados. Anemia e hipoalbuminemia são comuns em ambos os tipos de DII, mas outros marcadores inflamatórios, como a taxa de sedimentação e proteína C-reativa pode ser normal na RCUI já na DC podem ser elevados (GRIFFITHS, 2004; HYAMS, DAVIS; GRANCHER, 1996; VERNIER–MASSOUILLE; BALDE; SALLERON, 2008).

1.1.4 Fatores Relacionados às Doenças Inflamatórias Intestinais

O histórico familiar aumenta o risco de desenvolver DC e RCUI. O maior risco está em parentes de primeiro grau é mais elevada em pacientes com DC do que naqueles com RCUI. Esse dado foi confirmado em 30% dos pacientes diagnosticados com DC antes dos 20 anos de idade, comparado com 18% aos 29 anos e 13% após 40 anos (SAUER; KUGATHASA, 2009; VAN LIMBERGEN et al, 2008; VERNIER–MASSOUILLE; BALDE; SALLERON, 2008).

A alimentação é um cofator para DC. Foi demonstrado que componentes dietéticos impactam a flora intestinal, e podem afetar diretamente a homeostase do intestino (BOSSCHER; BREYNAERT; PIETERS, 2009; DORÉ; CORTHIER, 2010; FERGUSON, 2010; FLINT; DUCAN; SCOTT, 2007; NEISH, 2009). Dietas com baixo teor de fibras, elevado teor de açúcar e gordura animal, bastante frequente nos países ocidentais conferem susceptibilidade às DII (LAKATOS, 2009).

A distribuição das DII quanto ao sexo é aproximadamente a mesma, embora alguns estudos tenham apresentado uma predominância no sexo masculino (LAKATOS et al, 2011; ZENG et al, 2013). A relação mulher-homem para RCUI difere entre 0,51 e 1,58, indicando que a RCUI não afeta predominantemente um sexo específico (MOLODECKY et al, 2012), enquanto DC é um pouco mais dominante em mulheres (20-30%) (NIV; ABIKSIS; FRASER, 1999; RUSSEL; STOCKBRUGGER, 1996)

Com relação ao hábito de fumar, o tabagismo reduz o risco de RCUI fornecendo um efeito protetor, porém aumenta o risco para DC (RUSSEL; STOCKBRUGGER, 1996). Essa informação, porém, não é uniforme em todo o mundo visto que a incidência de DC é baixa em países com altos índices de fumantes (por exemplo, na Ásia e África) ao passo

que a alta incidência de DC é encontrada em populações com baixos índices de fumo, como Suécia e Canadá (COSNES et al, 2011).

Cerca de um quarto das doenças Inflamatórias Intestinais se manifestam na infância, e os sintomas das DII se confundem de uma forma geral tanto de DC e RCUI do que o observado na doença na idade adulta (HANSEN et al, 2010).

O pico de incidência do diagnóstico ocorre na segunda e terceira década de vida do paciente (TURUNEN et al*,* 2006), enquanto que em RCUI, o diagnóstico é entre os 30 e 40 anos, com um segundo pico da doença entre 60-70 anos (COSNES et al, 2011).

1.1.5 Marcadores Séricos e Fecais

Na inflamação aguda, o Hemograma Completo, a Velocidade de Hemossedimentação (VHS) e a Proteína C Reativa (CRP) podem indicar a presença de inflamação intestinal, sendo, porém, considerados índices não confiáveis de atividade da doença em pacientes com DII confirmados (BASSO; ZAMBON; PLEBANI, 2014; BERNSTEIN et al, 2010).

A inflamação intestinal persistente nas DII está associada com uma reação de fase aguda e migração dos leucócitos para o intestino, desencadeando a produção de várias proteínas, que podem ser detectadas no soro, como a CRP ou nas fezes, como a calprotectina fecal e lactoferrina (GISBERT et al, 2007).

A CRP é produzida pelo fígado em reposta a uma variedade de condições agudas e crônicas (DARLINGTON; WILSON; LACHMAN, 1986). Citocinas pró-inflamatórias estimulam o aumento da CRP em relação aos níveis basais da produção pelos hepatócitos, sendo essa elevação mais comum em pacientes com DC do que em RCUI (SAVERYMUTTU et al, 1986). Esse aumento pode ser verificado também em outras desordens autoimunes, infecções virais e bacterianas e cânceres (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003).

O VHS mede a velocidade que as hemácias sedimentam em um tubo capilar e também é um marcador utilizado para determinar a gravidade das DII (VATAY et al, 2003). O VHS tem valores bastante similares em pacientes com DC e RCUI. (ISKANDAR; CIORBA, 2012).

Biomarcadores fecais são valiosos devido a sua especificidade para o trato gastrointestinal (MENDONZA; ABREU, 2009). São testes de baixo custo de execução e têm demonstrado utilidade no diagnóstico de DII, avaliando a atividade da doença, a previsão de recidiva da doença, assim como a resposta à terapia. (LEWIS, 2011). Os

marcadores mais usados frequentemente são a calprotectina e a lactoferrina e mais recentemente estudada a S100A12 (KAISER et al, 2007).

1.1.6 Resposta Imunológica

Embora a etiologia das DII permaneça desconhecida, evidências apontam que a inflamação contínua resulta da persistência excessivamente agressiva da resposta inflamatória a organismos comensais em um hospedeiro geneticamente susceptível para as DII e que seja susceptível a um iniciador ambiental (por exemplo, infecção, medicamentos, fumo) (KUGATHASAN; AMRE, 2006; SHIH, TARGAN; MCGOVERN, 2008; SILVERBERG et al, 2009; XAVIER; PODOLSKY, 2007)

Uma pesquisa realizada para analisar a imunopatologia do intestino inflamado sugere que a resposta imune do hospedeiro pode desempenhar um papel significativo na perpetuação da inflamação e também, possivelmente, nos eventos que iniciam este processo inflamatório (RADFORD-SMITH, 1996).

A associação entre os fatores genéticos e ambientais permite às bactérias presentes na luz intestinal atravessarem a barreira epitelial levando a sinalização descontrolada das células do sistema imunológico do intestino, resultando no recrutamento e na diferenciação de células T (KUGATHASAN; AMRE, 2006). Diferentes subtipos de células T estão envolvidos na resposta imune exacerbada a bactérias intestinais residentes tanto na DC quanto na RCUI (ABRAHAM; CHO, 2009; SHIH, TARGAN; MCGOVERN, 2008)

A imunidade natural ou inata é o primeiro sistema de proteção do organismo contra infecção por microrganismos. É um mecanismo inespecífico, mas muito importante para ativação da imunidade celular (linfócitos) e humoral (anticorpos) com especificidade para antígenos do patógeno (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009; SUTTERWALA; OGURA; FLAVELL, 2007). No entanto, estudos mais atuais prenunciam que o modelo do perigo (*Danger Model*) (MATZINGER, 2002) preconiza que a resposta imunológica é muito mais dependente da presença do dano ao organismo, do tipo de lesão e do tecido em questão, do que do reconhecimento da partícula quanto a sua origem (próprio / não próprio) (CINEL; OPAL, 2009; FRANCHI et al, 2009; SCHRODER; TSCHOPP, 2010; SIDIROPOULOS et al, 2008).

1.1.6.1 Resposta Imune Intestinal

Existem três mecanismos gerais para defesa do intestino contra o ambiente externo: a camada de mucosa (SANDERSON; WALKER, 1999) e o sistema imune inato e adaptativo (SANDERSON, 2003).

O sistema imune inato do intestino é composto pela barreira física de muco secretado no lúmen intestinal, por uma única camada de células epiteliais intestinais e pela lâmina própria subjacente (JAKAITIS E DENNING, 2014).

A camada única de células epiteliais do intestino é a primeira linha de defesa contra o conteúdo do lúmen intestinal. Esta camada é responsável principalmente pela absorção de água e nutrientes do lúmen. O intestino é exposto a uma grande variedade de antígenos derivados de alimentos, bactérias residentes e microrganismos invasores e por isso a camada de células epiteliais tem como função proteger o hospedeiro de micróbios patogênicos e compostos tóxicos (DEURING et al, 2013; SANDERSON, 2003).

Neste revestimento epitelial podem ser encontrados diferentes tipos de células especializadas, incluindo células caliciformes as quais produzem mucinas responsáveis por proteger, lubrificar e minimizar o contato entre o epitélio e bactérias comensais, células enteroendócrinas que produzem e segregam uma variedade de hormônios, enterócitos absortivos que regulam a absorção de água e nutrientes e células de Paneth que produzem defensinas antimicrobianas (DEURING et al, 2013; JAKAITIS; DENNING, 2014).

O trato gastrointestinal é considerado o maior órgão imunológico devido ao grande número de linfócitos que se depositam no tecido linfoide associado ao intestino (PABST; RUSSELL; BRANDTZAEG, 2008). O sistema imune no intestino está presente como folículos isolados e espalhados por todo o intestino ou como folículos agregados como as placas de Peyer no intestino delgado (MOWAT et al, 2003).

O sistema imune inato envolve uma série de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) codificados nas células germinativas para detectar regiões microbianas invariáveis. Os PRRs são expressos por células da primeira linha de defesa contra infecções, incluindo macrófagos, monócitos, células dendríticas, neutrófilos e células epiteliais, bem como células do sistema imune adaptativo. Nesta família estão inclusos os receptores ligados a membrana *Toll-like Receptors* (TLRs) e lectinas tipo C (CTLs), as quais varrem o meio extracelular e o compartimento endossomal a procura de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). O resultado do reconhecimento de uma PAMP pelos PRRs depende da natureza tanto da célula responsiva, quanto do organismo

invasor. No entanto, sinais de transdução a partir desses receptores convergem para um conjunto comum de módulos sinalizadores, frequentemente incluindo a ativação de fatores de transcrição NF-κB (fator nuclear kappa B) e AP-1 (proteína ativadora-1) que direcionam a produção de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias e membros da família do fator de transcrição iRF que medeiam respostas antivirais do interferon (IFN) tipo I dependentes (SCHRODER; TSCHOPP, 2010). Outro conjunto de PRRs intracelular, distintos dos descritos acima, são os receptores tipo NOD (NLRs) que reconhecem PAMPs, bem como sinais de perigo derivado do hospedeiro (danger-associated molecular patterns, DAMPs) (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

1.1.6.2 Citocinas

Resposta imunitária sistêmica é, em parte, controlada por um grupo de citocinas que permitem que os componentes celulares deste mecanismo de defesa se comuniquem uns com os outros, e que também são capazes de dirigir a natureza da resposta (MAGGI et al, 1992; MOSMANN; COFFMAN, 1989).

As citocinas podem contribuir para os principais efeitos sistêmicos quando liberadas na corrente sanguínea, mas as concentrações nos tecidos locais é provavelmente a mais importante causa do desenvolvimento de lesões encontradas em DC e RCUI. Variações na expressão de certos genes de citocinas na população podem controlar a resposta a um dado insulto intestinal (RADFORD-SMITH, 1996).

As citocinas podem controlar mecanismos pró-inflamatórios que resultam em sequelas clínicas como diarreia e fibrose. Em contrapartida, podem atuar na supressão da inflamação patológica. Elas podem mediar cura e reparação, bem como o crescimento e diferenciação celular normal. Várias interleucinas (IL) têm sido frequentemente utilizadas no tratamento de doenças em especial DII devido aos seus poderosos efeitos no sistema imune (RADFORD-SMITH, 1996).

A ativação de neutrófilos e macrófagos para fagocitar patógenos e para liberação de oxigênio reativo e óxido nítrico é dependente de citocinas pró-inflamatórias tais como a interleucina 1 beta (IL-1β) e a interleucina 18 (IL-18), as quais são produzidas predominantemente por monócitos/macrófagos (DINARELLO, 1996; DINARELLO, 1999).

A interleucina 1 (IL-1) é uma citocina inflamatória chave que medeia efeitos profundos em quase todos os órgãos do corpo. Ela ativa rapidamente a ação da resposta imune inata, é um potente estimulador tanto da hematopoese quanto do sistema imune adaptativo e é responsável por ativar o estado de alerta corporal para lidar com ferimentos

e infecções. A IL-1β como uma das principais citocinas pró-inflamatórias relacionadas com ativação do inflamassoma, constitui uma molécula com potencial atividade de modificar a percepção clínica de muitas doenças, inclusive em estratégias terapêuticas (BRADDOCK; QUINN, 2004; DINARELLO, 2008).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) é uma citocina pró-inflamatória e pleiotrópica que desenvolve um papel essencial na interação e propagação de DC. A TNF-α está inserida dentro do complexo de histocompatibilidade maior (GONZÁLEZ et al, 2003) e é produzida por monócitos e macrófagos ativados. Induz a expressão de IL-1 e IL6 perpetuando a resposta inflamatória (VASSALLI, 1992)

A interlucina 10 (IL-10) é uma citocina imunossupressora envolvida na regulação de muitos aspectos da resposta imune. Ela inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias (MOORE et al, 2001). É produzida principalmente por células T ativadas, monócitos e macrófagos ativados, células B estimuladas e mastócitos (OPAL; DEPALO, 2000). O efeito inibidor da IL-10 é um importante fator limitante da duração e do dano patológico das respostas inflamatórias (COOK et al, 2001; FANG et al, 2005; KENDALL et al, 2001; MOORE et al, 2001).

A interleucina 18 (IL-18) foi a primeira citocina homóloga à IL-1 a ser descoberta (OKAMURA, 1995; BAZAN, 1996) e até recentemente foi caracterizada, além da IL-1. A IL-18 é uma potente indutora do interferon-γ, aumenta a atividade citolítica dos linfócitos citotóxicos e células *natural killers* e promove o desenvolvimento e diferenciação das células T, usualmente para o fenótipo T-helper tipo 1. Além disso, a mesma desempenha um papel importante em doenças inflamatórias crônicas (AKIRA, 2000).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pleiotrópica imunorregulatória que ativa a maquinaria de sinalização da superfície celular composta de IL-6, IL6RA e o sinalizador compartilhado gp130 (BOULANGER et al, 2003). É produzida por uma variedade enorme de células, e desempenha um papel central na defesa do organismo. Esta citocina está envolvida em diferentes processos fisiológicos e patofisiológicos, tais como, metabolismo ósseo, hematopoese, diferenciação e/ou ativação de macrófagos e células T, crescimento e diferenciação terminal das células B, síntese de CRP e carcinogênese (ASSCHERT, 1999; DIEHL, 2002). A expressão da IL-6 é induzida como uma resposta a estímulos inflamatórios de IL-1 e TNF-α (SNICK, 1990). Por sua vez, a IL-6 induz quimiocinas e aumenta o número de moléculas de adesão nas células endoteliais, colaborando na geração de respostas inflamatórias (ROMANO et al, 1995). Além disso, a IL-6 também modula a expressão de genes envolvidos na progressão do ciclo celular e inibição da apoptose (LIN; KARIN, 2007). A presença da IL-6 nos tecidos não é uma ocorrência

anormal, mas sua produção sem controle leva a uma inflamação crônica subsequente, sendo elevados níveis séricos desta citocina associado com o desenvolvimento de diversas doenças (FISHMAN et al, 1998).

1.1.6.3 Inflamassomas

Inflamassomas são plataformas multiproteicas com uma massa molecular de aproximadamente 700kDa (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002), que controlam a ativação da cisteinil-aspartato protease caspase-1 e a clivagem da pró-IL-1β, permitindo a liberação da citocina ativa madura de 17-kDa (FRANCHI et al, 2009; MEYLAN, 2006).

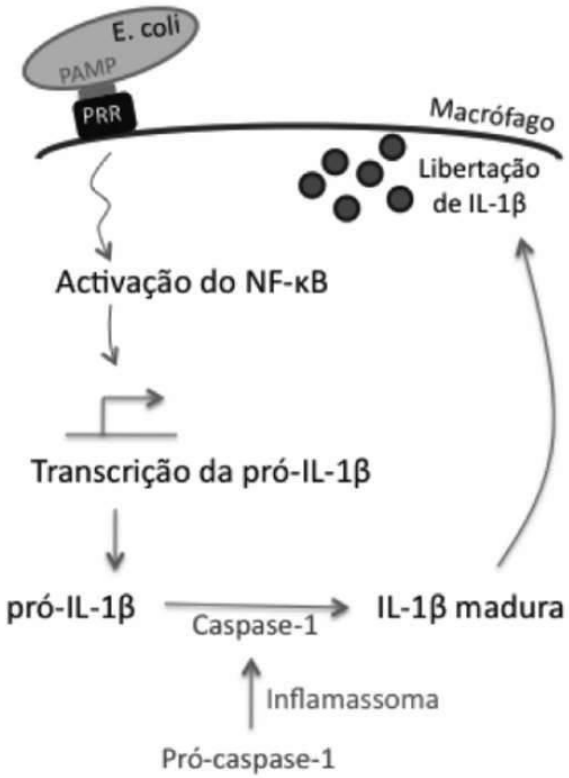
Em resposta a sinais de perigo, inflamassomas são montados por auto-oligomerização de proteínas via interações do domínio NACHT e esse complexo de alto peso molecular desencadeia a autoativação da caspase-1 (SCHRODER; TSCHOPP, 2010).

Caspases são responsáveis por aspectos cruciais da inflamação e morte celular e podem ser amplamente divididas em duas classes baseadas na sua especificidade ao substrato: as pró-apoptóticas e as pró-inflamatórias. Caspase-1 faz parte do grupo das pró-inflamatórias juntamente com a caspase-4, caspase-5, caspase-11 e caspase-12 (SIEGEL, 2006). A necessidade de dois diferentes estímulos para regular a produção de IL-1β garantem que a IL-1β (ou a citocina IL-18) não seja incorretamente liberada, já que isso pode gerar consequências deletérias para o hospedeiro. Na verdade, o excesso de produção da IL-1β está associado com síndromes hereditárias de febre periódica, bem como doenças autoimunes e inflamatórias, tais como a gota ou artrite reumatoide (MASTERS, 2009; MCDERMOTT, 2007).

Desta forma, dois passos controlam a ativação destas citocinas: primeiro, padrões de reconhecimento de microrganismos pelas células do hospedeiro induzem a transcrição da pró-IL-1β e pró-IL-18; segundo, a ativação do inflamassoma por sinais de perigo, incluindo IL-1, resulta na ativação da caspase-1 e clivagem de pró-citocinas em IL-1β e IL-18 maduras bioativas (LATZ, 2010) (Figura 4).

Muitos complexos inflamassomas usados para ativar caspase-1 têm sido descritos até o momento, tais como receptores tipo NOD contendo domínio pirina - NLRP1 e NLRP3, IPAF e AIM2 (MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009; SCHRODER; TSCHOPP, 2010), entre as quais a NLRP3 é mais bem estudada.

Figura 4: Após o contato inicial de um antígeno com um receptor de reconhecimento padrão ocorrem sucessivos fatos que desencadeiam a hidrólise da pró-caspase-1 pelo inflamassoma e posterior ativação e liberação da IL-1.



Fonte: Oliveira, 2010.

1.1.7 Polimorfismos Genéticos Associados

As variações que ocorrem no genoma são em sua maioria formas de polimorfismos de única base (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism* – SNP), com uma frequência a cada 300-1000 pares de base em todo o genoma e surgem como resultado de defeitos na replicação do DNA. Assim, os SNPs são mutações de ponto que originam duas formas alélicas. Essas variações nos genes são muito úteis para pesquisa de marcadores genéticos humanos e podem ser usadas para identificar genes de susceptibilidade de doenças humanas complexas (HANCHARD, 2005; JOHNSON; TODD, 2000; SACHIDANANDAM et al, 2001).

O gene da IL-1 está localizado no cromossomo humano 2q14. Polimorfismo nos genes codificantes da IL-1 têm sido estudados em diversas doenças devido à importância desta citocina nos processos inflamatórios (UZAN, 2005).

O gene da IL-18 está localizado no cromossomo humano 11q22.2-q22.3. Polimorfismos nos genes da IL-18 também têm papel importante na inflamação e esses

polimorfismos, quando na região promotora, podem levar a uma menor produção e menores níveis séricos dessa citocina (KHRIPKO et al, 2008; SIVALINGAM et al, 2003).

Dois SNPs localizados na região promotora -238 e -308 para a TNF-α foram previamente descritos. A substituição do alelo G pelo alelo A na posição -308 do gene aumenta os níveis de transcrição (HAJEER; HUTCHINSON, 2001; WILSON et al, 1997).

Associações genéticas foram observadas entre estes polimorfismos e a susceptibilidade as DII em alguns estudos (LOUIS et al, 1996; LOUIS et al, 2000; KAWASAKI et al, 2000; NEGORO et al, 1999; PLEVY et al, 1996;). Em outros estudos, porém, não foi verificada essa associação (BOUMA et al, 1996; HAMPE et al, 1999; HERESBACH et al, 1997). Os resultados conflitantes podem ser atribuídos a variações genéticas entre diferentes populações ou a variação de fenótipos dos pacientes dentro do estudo (GONZÁLEZ et al, 2003).

O gene da IL-10 está localizado no cromossomo 1. Três SNPs na região promotora do gene IL-10 foram identificados nas posições -1082 G/A, -819 C/T e -592 C/A. O polimorfismo na região –1082G/A tem se mostrado importante na determinação da produção alta, média e baixa da interleucina 10 (RAM et al, 2003). O alelo G no -1082 e haplótipos contendo este alelo foram associados com a produção elevada de IL- 10, enquanto que o alelo A e haplótipo ATA foram associados com baixa produção de IL-10 (OUMA et al, 2008; TURNER et al, 1997)

Várias evidências sugerem que a IL-10 influencia a susceptibilidade a DC (ROH et al, 2002). Vários estudos têm demonstrado o possível envolvimento de IL-10 na patogênese da DC, bem como sua associação com prognóstico (TAGORE et al, 1999; KLEIN et al, 2000). Alguns estudos sobre associação polimorfismo IL-10 com DII e com outras doenças têm sido publicados, relatando resultados diferentes (ANDERSEN et al, 2010; FERNANDEZ et al, 2005; FOWLER; ERI; HUME, 2005; KLEIN et al, 2000; SANCHEZ et al, 2009; WANG et al, 2011).

O inflamassoma NLRP1 humano foi o primeiro complexo proteico a ser identificado (MARTINON; BURNS; TSCHOPP, 2002). NLRP1 fornece uma plataforma para a organização do inflamassoma que também ativa caspases 1 e 5, que, posteriormente, promove a transformação e maturação das citocinas inflamatórias, pró-IL-1b, IL-18 e IL-33 (MACALUSO et al, 2007; MARTINON et al, 2007; MARTINON; MAYOR; TSCHOPP, 2009; MARTINON; TSCHOPP, 2004; TING; DAVIS, 2005;). Polimorfismos de base única no gene da NLRP1, localizado no cromossomo humano 17p13.2, têm sido relacionados com diversas desordens imunes, tais como doenças autoimunes múltiplas relacionadas

ao vitiligo (JIN et al, 2007) e com a doença autoimune de Addison e diabetes tipo 1 (MAGITTA et al, 2009).

NLRP3 é uma proteína de 1016 aminoácidos transcrita a partir do gene cias1, o qual está localizado no cromossomo humano 1q44 e consiste de 9 éxons. Os SNP no gene da NLRP3 têm sido associados com desregulações inflamatórias (VERMA et al, 2008), com a estabilidade do mRNA (HITOMI et al, 2009) e mais recentemente com a suscetibilidade a infecção por HIV (PONTILLO et al, 2010). NLRP3 compartilha a presença de um domínio NOD central (também chamado de domínio NBD ou NACHT) com outros membros da família NLR (KANNEGANTI; LAMKANFI; NUNEZ, 2007). NLRP3 tem sido amplamente estudado, em parte, por causa das descobertas de variações genéticas localizados em NLRP3 que resultam em inflamação descontrolada mediada por IL-1β (ROSENZWEIG; PLANCK; ROSENBAUN, 2011).

O gene que codifica o domínio de recrutamento de caspases (de *caspase-recruiting domain*) contendo proteína 15 (CARD15), anteriormente citados como NOD2, é o primeiro gene de susceptibilidade para DC que foi identificado. As três variantes comuns associadas a DC (R702W, G908R e L1007FsinsS) estão localizados na porção C-terminal. Os estudos funcionais sugerem que estas variantes levam a uma resposta inadequada a componentes bacterianos que alteram as vias de sinalização do sistema imune inato causando finalmente a inflamação intestinal (BONEN et al, 2003).

Outros componentes do complexo proteico inflamassoma e moléculas associadas ao seu correto funcionamento também podem sofrer interferência de SNP, como é o caso do domínio de recrutamento associado à caspase - CARD-8 e do Fator Nuclear κB (NF-κB), localizados nos cromossomos 19q13.33 e 13q14, respectivamente. Estudos anteriores demonstraram que a expressão constante do CARD-8 em monócitos THP-1 causou um decréscimo na secreção da IL-1, provavelmente devido à interação física com a caspase-1 (RAZMARA et al, 2002). Outras funções relacionadas ao CARD-8 incluem a regulação da apoptose (PATHAN et al, 2001) e propriedades inibitórias do NF-κB (BOUCHIER-HAYES et al, 2001; RAZMARA et al, 2002). Polimorfismos no NF-κB têm sido relacionadas com uma atividade promotora atenuada, o que pode levar a problemas na produção e nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (KARBAN et al, 2004).

Mais recentemente, o SNP no gene que codifica o receptor de NOD-like (NLR) um membro da família NLRP3, outras mutações de NOD2 dentro do domínio LRR e um SNP localizado no promotor do gene IL-1 foram ligadas à patogênese de inflamação intestinal e suscetibilidade DC (BAUER et al, 2007; HUGOT et al, 2001; SIEGMUND et al, 2001; SIEGMUND, 2002; SIVAKUMAR et al, 2002)

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Analisar os polimorfismos dos genes da resposta imune na inflamação intestinal em pacientes com retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) e doença de Crohn (DC) com diferentes formas anátomo-clínicas.

1.2.3 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos do trabalho correspondem às ações desenvolvidas para atingir o objetivo geral:

a) Determinar a frequência dos polimorfismos nos genes da TNF-α, IL-10, IL-1, NLRP1, NLRP3, e CARD15-NOD2 em pacientes com RCUI;
b) Determinar a frequência dos polimorfismos nos genes da TNF-α, IL-10, IL-1, NLRP1, NLRP3, e CARD15-NOD2 em pacientes com DC (fistulizante, inflamatória e estenosante).

1.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Um estudo transversal foi realizado em pacientes afetados pelas DII. Os pacientes foram recrutados do Ambulatório de Gastroenterologia Clínica do Hospital Barão de Lucena / SES / PE e do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco entre junho de 2013 e janeiro de 2014. O diagnóstico de DII foi baseado na avaliação clínica, laboratorial, imagem, endoscopia e características histológicas de acordo com os critérios do Lennard-Jones (1989). As informações de tempo de diagnóstico, localização da DC e comportamento da doença foram organizadas de acordo com a Classificação de Viena (GASCHE et al, 2000). As amostras de sangue foram colhidas em tubos contendo anticoagulante com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). As análises genéticas foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco.

Foram incluídos noventa e cinco pacientes entre 14 e 81 anos (média: 42,07 / mediana: 41 anos / σ = 13,92740738). Os dados clínicos coletados foram a idade no momento do diagnóstico e comportamento da doença (estenosante, inflamatória ou fistulizante). O gênero predominante foi semelhante entre homens (47/95; 49,47%) e mulheres (48/95; 50,53%). A idade no momento do diagnóstico da doença predominou em indivíduos com menos de 40 anos (55,79%).

Dos 95 casos, 41 (43,16%) tiveram RCUI e 54 (56,84%) tiveram DC. De todos os 54 diagnósticos de DC em nosso estudo, 19 pacientes (35,18%) foram diagnosticados como portadores de não-estenosante DC / não-fistulizante, 15 pacientes (27,77%) com DC estenosante, 19 (35,18%), com DC fistulizante e 1 (1,85%) paciente com ambos, estenosante e DC fistulizante. Todos os dados estão incluídos na Tabela 1.

O grupo controle foi composto de 91 indivíduos submetidos à endoscopia e que não tinham nenhuma evidência clínica ou laboratorial de doença inflamatória intestinal. Noventa e um voluntários foram analisados para NLRP1, 85 indivíduos do mesmo grupo foram genotipados para NLRP3, 83 para CARD15 variante R702W, 80 para CARD15 variante G908R e 84 voluntários para a IL-1.

1.3.1 Problemas éticos

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP / CCS / UFPE) (protocolo

222/2010), e todos os pacientes concordaram em participar, assinando o Livre e Esclarecido de Consentimento.

1.3.2 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído de 250µL de sangue periférico usando o protocolo rápido Mini Salting Out e digestão com proteinase K, apresentado em Tecnical Handbook of Twelfith Oficina Hisyocompatibility Wokshop and Conference (1996), com modificações para quantidades utilizadas.

1.3.3 SNPs Seleção e Genotipagem

Foram analisadas 2 variantes no gene CARD15 / NOD2 (R702W e G908R, correspondendo, respectivamente, a rs2066844 e rs2066845), 1 em gene NLRP1 (rs12150220), 1 em gene NLRP3 (rs35829419) e 1 SNP em IL-1 gene (rs16944). A genotipagem foi realizada por meio de alelos fluorogênico com sondas específicas comercialmente disponíveis (Taqman sondas, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) com a plataforma ABI7500 Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Discriminação alélica seguiu conforme recomendado pelo fabricante e analisada utilizando o software SDS 2.3 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA)

1.3.4 Análise estatística

A análise estatística e o equilíbrio de Hardy-Weinberg foram realizados utilizando o programa R. A influência de cada polimorfismo no risco de desenvolvimento a doença inflamatória intestinal foi estimada pelo OR, utilizando um intervalo de confiança de 95% para os parâmetros.

2 ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise estatística univariada indicou que as mulheres têm uma idade mais avançada do diagnóstico do que os homens (p = 0,003463) (Tabela 1).

As formas anátomo-clínicas não mostraram associação com polimorfismos estudados por análise univariada (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização dos pacientes

	RCUI n=41 (43,16%)	DC n=54 (56,84%)
Sexo		
Homem	21 (51,22%)	26 (48,15%)
Mulher	20 (48,78%)	28 (51,85%)
Idade no diagnóstico		
< 40 anos	17 (41,46%)	25 (46,3%)
≥ 40 anos	24 (58,54%)	29 (53,7%)
Histórico Familiar	6 (14,63%)	5 (9,26%)
Nenhum Histórico Familiar	35 (85,37%)	49 (90,74%)
Hábitos Alimentares		
Dieta	29 (70,73%)	21 (38,89%)
Não faz dieta	12 (29,27%)	33 (61,11%)
Características Clínicas em DC		
Formas anátomo-clinicas		
Inflamatória		19 (35,18%)
Estenosante		15 (27,77%)
Fistulizante		19 (35,18%)
Mais de uma forma		1 (1,85%)

As distribuições de genótipos de CARD15/NOD2, NLRP1, NLRP3 e IL-1 estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg, exceto o grupo saudável para NLRP1 (p = 0,0082) e os pacientes do grupo de IL-1 (DII e RCUI, ambos p = 0,0000).

O alelo presença C no gene NLRP3 mostrou ser muito frequente, no entanto, não houve diferença estatística entre os grupos analisados (Tabela 2).

O mesmo pode ser visto na presença de alelo C na variante R702W do gene CARD15/NOD2 e também a presença de alelo G no gene CARD15/NOD2 variante G908R (Tabela 2).

Observamos nenhuma relação significativa entre o gene CARD15/NOD2 variante R702W e variante G908R variante em ambos os controles e pacientes com DII (Tabela 2).

Tabela 2. Frequências dos genótipos dos polimorfismos dos genes NLRP1, NLRP3, CARD15/NOD2 variante R702W e CARD15/NOD2 variante G908R e sua associação com o risco para as DII (DC e RCUI).

SNP		HC	DII	DII DC	DII RCUI	HCXDII		HCXDC		HCXRCUI	
	Alelos / Genótipos	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	OR (CI 95%)	Valor de p	OR (CI 95%)	Valor de p	OR (CI 95%)	Valor de p
NLRP1	A	118 (65)	118 (68)	60 (65)	58 (71)	1	0,6294	1	0,9431	1	0,4241
	T	64 (35)	56 (32)	32 (35)	24 (29)	0,88 (0,56-1,36)		0,98 (0,58-1,66)		0,76 (0,43-1,34)	
	AA	44 (48)	39 (45)	20 (43)	19 (46)	1		1		1	
	AT	30 (33)	40 (46)	20 (43)	20 (49)	1,5 (0,79-2,85)	0,2758	1,47 (0,68-3,18)	0,4391	1,54 (0,71-3,37)	0,3715
	TT	17 (19)	8 (9)	6(13)	2 (5)	0,53 (0,21-1,37)	0,2735	0,78 (0,27-2,26)	0,8427	0,27 (0,06-1,3)	0,1560
NLRP3	C	168 (99)	138 (99)	61 (98)	77 (99)	1		1		1	
	A	2 (1)	2 (1)	1 (2)	1 (1)	1,22 (0,17-8,75)	0,7566	1,38 (0,12-15,46)	0,6919	1,09 (0,1-12,21)	0,5790
	CC	83 (98)	68 (97)	30 (97)	38 (97)	1		1		1	
	CA	2 (2)	2 (3)	1 (3)	1 (3)	1,22 (0,12-15,82)	0,7551	1,38 (0,12-15,82)	0,6900	1,09 (0,1-12,42)	0,5766
	AA	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
NOD2/ R702W	C	151 (91)	128 (93)	57 (92)	71 (93)	1		1		1	
	T	15 (9)	10 (7)	5 (8)	5 (7)	0,79 (0,34-1,81)	0,7219	0,88 (0,31-2,54)	0,9742	0,71 (0,25-2,03)	0,6944
	CC	70 (84)	60 (87)	27 (87)	33 (87)	1		1		1	
	CT	11 (13)	8 (12)	3 (10)	5 (13)	0,85 (0,18-2,73)	0,9327	0,71 (0,18-2,73)	0,8550	0,96 (0,31-3)	0,8218
	TT	2 (2)	1 (1)	1 (3)	0 (0)	0,58 (0,05-6,59)	0,8844	1,30 (0,11-14,89)	0,6571		0,8433
NOD2/ G908R	G	159 (99)	123 (99)	59 (98)	64 (1)	1		1		1	
	C	1 (1)	1 (1)	1 (2)	0 (0)	1,29 (0,08-20,88)	0,5933	2,69 (0,17-43,79)	0,9422		0,6345
	GG	79 (99)	61 (98)	29 (97)	32 (1)	1		1		1	
	GC	1 (1)	1 (2)	1 (3)	0 (0)	1,30 (0,16-44,99)	0,5920	2,72 (0,16-44,99)	0,9419	ND	0,6337
	CC	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IL-1	G	90 (54)	88 (47)	49 (47)	39 (48)	1		1		1	
	A	78 (46)	98 (53)	55 (53)	43 (52)	1,28 (0,85-1,95)	0,2847	1,30 (0,79-2,11)	0,3627	1,27 (0,75-2,16)	0,4484
	GG	25 (30)	9 (1)	9 (17)	0 (0)	1		1		1	
	GA	40 (48)	70 (75)	31 (60)	39 (95)	4,86 (0,88-5,27)	**0,0003**	2,15 (0,88-5,27)	0,1382	ND	0,0000
	AA	19 (23)	14 (15)	12 (23)	2 (5)	2,05 (0,73-5,72)	0,2637	1,75 (0,61-5,01)	0,4305	ND	0,3942

ND = Não determinado

Polimorfismo do gene NLRP1 não mostrou associação significativa entre as frequências genotípicas e alélicas nos grupos estudados (HC x DII/ HC x DC /HC x RCUI) (Tabela 2).

Através da análise univariada e multivariada verificou-se que o genótipo AG de IL-1 foi associado com o desenvolvimento de RCUI (GAXAA, p-valor = 0,0003; GAXAA, p-valor = 10 -4). A IL-1 está envolvida com DII (GAXAA, p-valor = 0,0003) (Tabela 2).

3 DISCUSSÃO

Vários complexos inflamassomas ativados e a liberação de IL-1β foram descritos (CHEN; NUÑEZ, 2011; ROSENZWEIG et al, 2011; SCHRODER; TSCHOPP, 2010.). Polimorfismos genéticos em inflamassomas têm sido associados à susceptibilidade a doenças comuns.

O polimorfismo do gene da IL-1 -511T em pacientes brasileiros com periodontite foi associado com a doença em pacientes brancos e pardos (TREVILATTO et al, 2011). rs1143634 em IL-1 também foi significativamente associado à infecção pelo HIV-1 na população brasileira (PONTILLO et al, 2012b). Em nosso estudo, verificou-se esta associação em RCUI.

Enquanto o inflamassoma NLRP3 regula uma variedade de doenças inflamatórias e autoimunes, a produção de IL-1β contribui para a inflamação intestinal. Recentemente, a indução de IL-1β induzida por NLRP3 tem sido associada a uma proteção contra a colite (ZAKI et al, 2011).

Nossos resultados sugerem que os polimorfismos de genes no NLRP3 e CARD15 / NOD2 variante G908R e variante R702W não foram associados à susceptibilidade as DII.

Vários estudos relatam a influência do polimorfismo do gene NLRP3 em várias doenças, mas os resultados têm sido contraditórios. Não há nenhuma evidência da associação de NLRP3 rs35829419 com pacientes aneurismas da aorta abdominal era de Nova Zelândia (ROBERTS et al, 2011). Um estudo realizado em Norte da China, menor alelo de rs35829419 estava ausente em pacientes com doença de Alzheimer e apenas presente em controlos, sugerindo que o alelo confere proteção contra o risco de desenvolvimento tardio da doença de Alzheimer (TAN et al, 2013). O mesmo pode ser visto no estudo de Pontillo (2012b). Os resultados deste trabalho sugerem um efeito protetor contra a infecção por HIV-1 do rs10754558, mas para o rs35829419 não está associado com a infecção pelo HIV. Os resultados conflituosos podem ser atribuídos a variações genéticas entre diferentes populações ou fenótipos variantes de pacientes no estudo (GONZALEZ et al, 2003).

No entanto, um estudo realizado no Japão em pacientes com doenças alérgicas avaliou dois polimorfismos associados ao gene NLRP3 (rs4612666 e rs10754558) e encontrou que estes polimorfismos foram associados com choque anafilático induzido por alimentos. Em nosso estudo não obtivemos nenhum resultado estatisticamente

significante. Este polimorfismo pode aumentar a produção de IL-1 beta e favorecer o desenvolvimento de DII.

Uma investigação conduzida nos Países Baixos, a DC foi associada com R702W (p = 0,008) para os heterozigotos (OOSTENBRUG et al, 2006). Outro estudo realizado no sul da Itália, pacientes com DC mostrou a mutação CARD15 /NOD2 variante R702W significativamente mais frequente quando comparado com o grupo controle e pacientes RCUI (p = 0,001 e p = 0,03, respectivamente) (RIGOLI et al, 2010). Nossos resultados não sugerem correlação com DII, em pacientes brasileiros.

Na literatura, não encontramos nenhuma associação entre o gene CARD15/ NOD2 variante G908R e doenças de diferentes grupos de populações estudadas (PONTILLO et al, 2012a; RIGOLI et al, 2010). Em nosso estudo, não observamos associação estatisticamente significativa.

O polimorfismo do gene NLRP1 não foi associado com a infecção ao HIV-1 de acordo com o estudo de Pontillo (2012b). No entanto, em outro estudo de Pontillo (2012a) em pacientes com lúpus eritematoso, houve uma associação de NLRP1 rs2670660 com a predisposição para a doença. No presente estudo, o gene NLRP1 não contribui para a patogênese de DII na população brasileira.

Poucos estudos de associação entre os polimorfismos dos genes de resposta imune e doença inflamatória do intestino têm sido conduzidos no momento. Os dados sobre esta doença na população brasileira são escassos. Assim, é importante para avaliar diferentes aspectos de perfil genético população que possam interferir na resposta do paciente ao tratamento de DII (PRESCOTT et al, 2010).

Nossos dados sugerem uma associação entre o polimorfismo do gene IL-1 e o desenvolvimento de retocolite ulcerativa idiopática.

Este estudo mostrou informações atuais e importantes de polimorfismos de genes de inflamassomas na doença inflamatória intestinal. É necessário desenvolver outros estudos envolvendo grande quantidade de indivíduos e associar aspectos socioeconômicos, clínicos e epidemiológicos.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, podemos concluir que:

- A alteração no gene IL-1 (-511T/C) está associada com o desenvolvimento de retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) na população brasileira.
- Não foi verificada associação entre o polimorfismo dos genes NLRP1, NLRP3, CARD15/NOD2 variantes G908R e R702W e a susceptibilidade as DII, sugerindo que estes genes não têm relação com o desenvolvimento da doença na população estudada.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, C.; CHO, J. H. Inflammatory bowel disease. **The New England Journal of Medicine,** v.361, p.2066–78, 2009.

AKIRA S. The role of IL-18 in innate immunity. **Current Opinion in Gastroenterology,** v. 12, p.59-63, 2000.

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

ANDERSEN, V.; ERNST, A.; CHRISTENSEN, J.; ØSTERGAARD, M.; JACOBSEN, B. A.; 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 Medical Genetics,** v.11, n.82, 2010.

ASSCHERT, J. G.; VELLENGA, E.; RUITERS, M. H.; DE VRIES, E. G. Regulation of spontaneous and TNF/IFN-induced IL-6 expression in two human ovarian-carcinoma cell lines. **International Journal of Cancer**, v.82, p.244–9, 1999.

ASSOCIAÇÃO MINEIRA DOS PORTADORES DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS. **Doença de Crohn**. 2010. Disponível em: <http://www.amdii.org.br/site/index.php/d-i-i/doenca-de-crohn>. Acesso em: 15 jul. 2014.

ASSOCIAÇÃO MINEIRA DOS PORTADORES DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS. **Retocolite Ulcerativa**. 2010. Disponível em: <http://www.amdii.org.br/site/index.php/d-i-i/retocolite-ulcerativa>. Acesso em: 16 jul. 2014.

BAMIAS, G.; COMINELLI, F. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: current concepts. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.23, p.365-369, 2007.

BASSO, D.; ZAMBON, C. F.; PLEBANI, M. Inflammatory bowel disease: from pathogenesis to laboratory testing. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v.52, n.4, p.471-481, 2014.

BAUER, C.; LOHER, F.; DAUER, M.; MAYER, C.; LEHR, H. A.; SCHÖNHARTING, M.; HALLWACHS, R.; ENDRES, S.; EIGLER, A. The ICE inhibitor pralnacasan prevents DSS-induced colitis in C57BL/6 mice and suppresses IP-10 mRNA but not TNF-alpha mRNA expression. **Digestive Diseases and Sciences**, v.52, p.1642-1652, 2007.

BAZAN, J. F.; TIMANS, J. C.; KASTELEIN, R.A. A newly defined interleukin-1? **Nature**, p.379:591, 1996.

BERNSTEIN, C. N.; FRIED, M.; KRABSHUIS, J. H.; COHEN, H.; ELIAKIM, R.; FEDAIL, S. et al. World gastroenterology organization practice guidelines for the diagnosis and management of IBD in 2010. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.16, p.112-24, 2010.

BERNSTEIN, C. N.; WAJDA, A.; SVENSON, L. W. et al. The epidemiology of inflammatory bowel disease in Canada: a population-based study. **The American Journal of Gastroenterology**, v.101, p.1559 –1568, 2006.

BONEN, D. K.; OGURA, Y.; NICOLAE, D. L.; INOHARA, N.; SAAB, L.; TANABE, T. et al. Crohn's disease-associated NOD2 variants share a signaling defect in response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. **Gastroenterology**, v.124, p.140-146, 2003.

BOSSCHER, D.; BREYNAERT, A.; PIETERS, L. et al. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. **Journal of Physiology & Pharmacology**, v.60, p.5–11, 2009.

BOUCHIER-HAYES, L.; CONROY, H.; EGAN, H.; ADRAIN, C.; CREAGH, E. M.; MACFARLANE, M.; MARTIN, S. J. Cardinal, a novel caspase recruitment domain protein, is an inhibitor of multiple NF-kappa B activation pathways. The **Journal of Biological Chemistry,** v.276, p.44069-77, 2001.

BOULANGER, M. J.; CHOW, D. C.; BREVNOVA, E. E.; GARCIA, K. C. Hexame-ric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. **Science**, v.300, n.4, p.2101–21. 2003.

BOUMA, G.; XIA, B.; CRUSIUS, J. B. A.; BIOQUE, G.; KOUTROUBAKIS, I.; VON BLOMBERG, B.M.E.; MEUWISSEN, S.G.M.; PERA, A.S. Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). **Clinical & Experimental Immunology**, v.103, p.391-396, 1996.

BRADDOCK, M.; QUINN, A. Targeting IL-1 in inflammatory disease: new opportunities for therapeutic intervention. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 3, n. 4, p.330-339, apr. 2004.

CHEN, G. Y.; NÚÑEZ, G. Reviews in basic and clinical gastroenterology and hepatology. Inflammasomes in Intestinal Inflammation and Cancer. **Gastroenterology**, v.141, p.1986-1999, 2011.

CINEL, I.; OPAL, S. M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. **Critical Care Medicine**, New York, v.37, n.1, p.291-304, jan. 2009.

CONRAD, K.; ROGGENBUCK, D.; LAASS, M. W. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. **Autoimmunity Reviews**, v.13, p.463–466, 2014.

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

COSNES, J.; GOWER-ROUSSEAU, C.; SEKSIK, P.; CORTOT, A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.20, n. 6, e.4, p.1785-1794, 2011.

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

DARLINGTON, G. J.; WILSON, D. R.; LACHMAN, L. B. Monocyte-conditioned medium, interleukin-1, and tomur necrosis factor stimulate the acute phase response in human hepatoma cells in vitro. **The Journal of Cell Biology,** v.103, p.787-93, 1986.

DEURING, J. J.; DE HAAR, C.; KUIPERS, E. J.; PEPPELENBOSCH, M. P.; VA DER WOUDE, C. J. The cell biology of the intestinal epithelium and its relation to inflammatory bowel disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,** v. 45, p.798-806, 2013.

DIEHL, S.; RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Molecular Immunol**, v.39, p.531–6, 2002.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood,** v.87, p.2095 – 2147, 1996.

DINARELLO, C. A. IL-18: a Th1-inducing, proinflammatory cytokine and a new member of the IL-1 family. **Journal of Allergy and Clinical Immunology,** v.103, p.11 –24, 1999.

DINARELLO, C. A. Inflammation in human disease: anticytokine therapy. **Biology blood marrow transplant**, Charlottesville, v.15, n.1, p.134-136, jan. 2008.

DOBSON, A. J. Na introduction to generalized lienar models. London: Chapmam & Hall; 2002.

DORÉ, J. CORTHIER, G. **Gastroentérologie Clinique et Biologique,** v.34, n.1, p.7–15, 2010.

EKBOM, A. The changing faces of Crohn's disease and ulcerative colitis. In: Targan SR, Shanahan F, Karp LC, editors. Inflammatory bowel disease: from bench to bedside. 2nd ed. Dordrecht/Boston/London: Kluwer Academic Publishers, p. 5–20, 2003.

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.420-4428, 2005.

FEAGAN, B. G.; SY, R. Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease. In: Lichtenstein GR, editor.**The clinician guide to inflammatory bowel disease.** Thorofare: SLACK, p.1-8, 2003.

FERGUSON, L. R. Nutrigenomics and inflammatory bowel diseases. **Expert Review of Clinical Immunology,** v.6, p.573–583, 2010.

FERNANDEZ, L.; MARTINEZ, A.; MENDOZA, J. L.; URCELAY, E.; FERNANDEZ-ARQUERO, M.; GARCIA-PAREDES, J. et al. Interleukin-10 polymorphisms in Spanish patients with IBD. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.11, n.739, 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. **Current Opinion in Gastroenterology,** v.23, p.363-364, 2007.

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFERY, R.; MOHAMEND-ALI, V.; YUDIN, J.S.; HUMPHRIES, S.; WOO, P. The effect of novel polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene on the IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **Journal of Clinical Investigation,** v.102, p.1369-1376, 1998.

FLINT, H. J.; DUNCAN, S.H.; SCOTT, K.P. et al. Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. **Environmental Microbiology**, v.9, p.1101–11, 2007.

FOWLER, E. V.; 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. **Journal of Medical Genetics**, v.42, n.523, 2005.

FRANCHI, L.; EIGENBROD, T.; MUÑOZ-PLANILLO, R.; NUÑEZ, G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. **Nature Immunology**, New York, v. 10, n.3, p.241, 2009.

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.

GASCHE, C.; SCHOLMERICH, J.; BRYNSKOV, J.; D'HAENS, G.; HANAUER, S. B.; IRVINE, E. J.; et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. **Inflammatory Bowel Disease**, v.6, p.8, 2000.

GONZÁLEZ, S.; RODRIGO, L.; MARTÍNEZ-BORRA, J.; LÓPEZ-VÁZQUEZ, A.; FUERTES, D.; NIÑO, P.; CADAHÍA, V.; SARO, C.; DIEGUEZ, M. A.; LÓPEZ-LARREA, C. TNF- α -308A promoter polymorphism is associated with enhanced TNF- α Production and Inflammatory Activity in Crohn1s Patients with Fistulizing Disease. **American Journal of Gastroenterology**, v.98, n.5, p.1101-1106, 2003.

GRIFFITHS, A. M. Specificities of inflammatory bowel disease in childhood. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology,** v.18, p.509–23, 2004.

HAJEER, A. H.; HUTCHINSON, I. V. Influence of TNF alpha gene polymorphisms on TNF alpha production and disease. **Human Immunology**, v.62, p.1191, 2001.

HAMPE, J.; SHAW, S. H.; SAIZ, R.; LEYSENS, N., LANTERMANN, A.; MASCHERETTI, S.; LYNCH, N. J.; MACPHERSON, A. J. S.; BRIDGER, S.; VAN DEVENTER, S.; STOKKERS, P.; MORIN, P.; MIRZA, M. M.; FORBES, A.; LENNARD-JONES, J. E.; MATHEW, C. G.; CURRAN, M. E.; SCHREIBER, S. LINKAGE of Inflammatory Bowel Disease to Human Chromosome 6p. **The American Journal of Human Genetics,** v.65, p.1647–1655, 1999.

HANAUER, S. B. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.12, p.3–9, 2006.

HANCHARD, N. A. Genetic susceptibility and single-nucleotide polymorphism. Seminars in Fetal & **Neonatal Medicine**, v.10, p.283-289, 2005.

HANSEN, R.; CAMERON, F. L.; HOLD, G. L.; EL-OMAR, E. M.; RUSSEL, R. K. Inflammatory bowel disease. **Paediatrics and Child Health,** v.20, n.10, p.473-478, 2010.

HERESBACH, D.; ABABOU, A.; BOURIENNE, A.; ALIZADEH, M.; QUELVENNEC, E.; PAGENAULT, M.; DABADIE, A.; BERRE, N. H.; CAMPION, J. P.; LAUNOIS, B.; GOSSELIN, M.; GENETET, B.; BRETAGNE, J. F.; SEMANA, G. Polymorphism of the microsatellites and tumor necrosis factor genes in chronic inflammatory bowel diseases. **Gastroenterologie Clinique et Biologique** , v.21, n.8-9, p.555-561, 1997.

HITOMI, Y.; EBISAWA, M.; TOMIKAWA, M.; IMAI, T.; KOMATA, T. et al. Associations of functional NLRP3 polymorphisms with susceptibility to food-induced anaphylaxis and aspirin-induced asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.124, p.779–785, 2009.

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

HUGOT, J. P.; ZOUALI, H.; LESAGE, S.; THOMAS, G. Etiology of the inflammatory bowel diseases. **International Journal of Colorectal Disease**, v.14, p.2–9, 1999.

HYAMS, J. S.; DAVIS, P.; GRANCHER, K. Clinical outcome of ulcerative colitis in children. **Journal of Pediatrics**, v.129, p.81–8, 1996.

ISKANDAR, H. N.; CIORBA, M. A. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. **Translational Research**, v.159, n.4, p.313 -325, 2012.

JAKAITIS, B. M.; DENNING, P. W. Human Breast Milk and the gastrointestinal Innate Immune System. **Clinics in Perinatology,** v.41, p.423-435, 2014.

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

JIN, Y.; MAILLOUX, C. M.; GOWAN, K.; RICCARDI, S. L.; LABERGE, G. et al. NALP1 in vitiligo-associated multiple autoimmune disease. **The New England Journal of Medicine**, v.356, p.1216–1225, 2007.

JOHNSON, G. C. L.; TODD, J. A. Strategies in complex disease mapping. **Current Opinion in Genetics & Development,** v.10, p.330, 2000.

KAISER, T.; LANGHORST, J.; WITTKOWSKI, H. et al. Fecal S100A12 as a noninvasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. **Gut**, v.56, p.1706-13, 2007.

KANNEGANTI, T. D.; LAMKANFI, M.; NUNEZ, G. Intracellular NOD-like receptors in host defense and disease. **Immunity**, v.27, p.549–59, 2007.

KARBAN, A. S.; OKAZAKI, T.; PANHUYSEN, C. I.; GALLEGOS, T.; POTTER, J. J. et al. Functional annotation of a novel NFKB1 promoter polymorphism that increases risk for ulcerative colitis. **Human Molecular Genetics**, v.13, p.35-45, 2004.

KARLINGER, K.; GYÖRKE, T.; MAKÖ, E.; MESTER, A.; TARJÁN, Z. The epidemiology and the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **European Journal of Radiology**, v.35, n.3, p.154-67, sep. 2000.

KAWASAKI, A.; TSUCHIYA, N.; HAGIWARA, K.; TAKAZOE, M.; TOKUNAGA, K. Independent contribution of HLA-DRB1 and TNF alpha promoter polymorphisms to the susceptibility to Crohn's disease. **Genes and Immunity**, v.1, n.6, p.351-357, 2000.

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

KHRIPKO, O. P.; SENNIKOVA, N. S.; LOPATNIKOVA, J. A.; KHRIPKO, J. I.; FILIPENKO, M. L.; et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the IL-18 gene with production of IL-18 protein by mononuclear cells from healthy donors, **Mediators of Inflammation,** p. 1-6, 2008.

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**, v.21, p.3578, 2000.

KRISHMAN, A.; KORZENIK, J. In Inflammatory Bowel Disease and environmental influences. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.31, p.21-39, 2002.

KUGATHASAN, S.; AMRE, D. Inflammatory bowel disease-environmental modification and genetic determinants. **Pediatric Clinics of North America, v.**53, p.727–49, 2006.

LAASS, M. W.; ROGGENBUCK, D.; CONRAD, K. Diagnosis and classification of Crohn's disease. **Autoimmunity** Reviews, v.13, n.4-5, p.467-71, 2014.

LAKATOS, P. L. Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress? **Digestive Diseases,** v.27, p.215–25, 2009.

LAKATOS, L.; KISS, L. S.; DAVID, G.; PANDUR, T.; ERDELYI, Z.; MESTER, G.; BALOGH, M.; SZIPOCS, I.; MOLNAR, C.; KOMAROMI, E.; LAKATOS, P. L. Incidence, disease phenotype at diagnosis, and early disease course in inflammatory bowel diseases in western Hungary, 2002-2006. **Inflammatory Bowel Diseases,** v.17, p.2558-2565, 2011.

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

LATZ, E. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.22, p.28–33, 2010.
LENNARD-JONES, J. E. Classification of inflammatory bowel disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology,** v.170, n.2, 1989.

LEWIS, J. D. The Utility of biomarkers in the diagnosis and therapy of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.140, p.1817-26, 2011.

LIN, W. W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. **Journal of Clinical Investigation**, v.117, p.1175–83, 2007.

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

LOGAN, I.; BOWLUS, C. L. The geoepidemiology of autoimmune intestinal disease**. Autoimmunity Reviews**, v.9, p.372–8, 2010.

LOUIS, E.; PEETERS, M.; FRANCHIMONT, D.; SEIDEL, L.; FONTAINE, F.; DEMOLIN, G.; CROES, F.; DUPONT, P.; DAVIN, L.; OMRI, S.; RUTGEERTS, P.; BELAICHE, J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism in Crohn's disease (CD): influence on disease behaviour? **Clinical & Experimental Immunology,** v.119, n.1, p.64–68, 2000.

LOUIS, E.; SATSANGI, J.; ROUSSOMOUSTAKAKI, M.; PARKES, M.; FANNING, G.; WELSH, K.; JEWELL, D. Cytokine gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. **Gut,** v.39, p.705-710, 1996.

MACALUSO, F.; NOTHNAGEL, M.; PARWEZ, Q.; PETRASCH-PARWEZ, E.; BECHARA, F. G.; EPPLEN, J. T.; et al. Polymorphism in NACHT-LRR (NLR) genes in atopic dermatitis. **Experimental Dermatology**, v.16, p.692-698, 2007.

MAGGI, E.; PARRONCHI, P.; MANETTI, R.; et al. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. **Journal of Immunology**, v.148, n.7, p.2142-2147, 1992.

MAGITTA, N. F.; BØE WOLFF, A. S.; JOHANSSON, S.; SKINNINGSRUD, B.; LIE, B. A.; et al. A coding polymorphism in NALP1 confers risk for autoimmune Addison's disease and type 1 diabetes. **Genes & Immunity** v.10, p.120–124, 2009.

MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-β. **Molecular Cell,** v.10, p.417-426, 2002.

MARTINON, F.; GAIDE, O.; PETRILLI, V.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. NALP inflammasomes: a central role in innate immunity. **Seminars in Immunopathology**, v.29, p.213-229, 2007.

MARTINON, F.; MAYOR, A.; TSCHOPP, J. The inflammasomes: guardians of the body. **Annual Review of Immunology**, v.27, p.229–265, 2009.

MARTINON, F.; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to autoinflammatory disease. **Cell**, v.177, p.561-574, 2004.

MASTERS, S. L.; SIMON, A.; AKSENTIJEVICH, I.; KASTNER, D. L. Horror autoinflammaticus: the molecular pathophysiology of autoinflammatory disease. **Annual Review of Immunology**, v.27, p.621–668, 2009.

MATZINGER, P. The danger model: a renewed sense of self. **Science**, v.296, n. 5566, p.301-305, apr. 12, 2002.

MCDERMOTT, M. F.; TSCHOPP, J. From inflammasomes to fevers, crystals and hypertension: how basic research explains inflammatory diseases. **Trends in Molecular Medicine,** v.13, p.381–388, 2007.

MENDONZA, J. L.; ABREU, M. T. Biological markers in inflammatory bowel disease: practical consideration for clinicians. **Gastroentérologie Clinique et Biologique,** v.33, suppl 3, p.158-73, 2009.

MEYLAN, E.; TSCHOPP, J.; KARIN, M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. **Nature**, v.442, p.39–44, 2006.

MOLODECKY, N.A.; SOON, I.S.; RABI, D.M.; GHALIWA FERRISM, CHERNOFF, G; et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology,** v.142, p.46–54, 2012.

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.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. THl and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, v. 7, n.l, p.145-173, 1989.

MOWAT AM, DONACHIE AM, PARKER LA, ROBSON NC, BEACOCK-SHARP H, MCINTYRE LJ, MILLINGTON O, CHITDO F. Th role of dendritic cells in regulating mucosal immunity and tolerance. Novartis found. Symp, v.252, p.291-302, 2003.

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.

NEGORO K, KINOUCHI Y, HIWATASHI N, TAKAHASHI S, TAKAGI S, SATOH J, SHIMOSEGAWA T, TOYOTA T. Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene. **Gastroenterology**, v.117, n.5, p.1062–1068, 1999.

NEISH, A. S. Microbes in gastrointestinal health and disease. **Gastroenterology**, v.136, p.65–80, 2009.

NIV, Y.; ABIKSIS, G.; FRASER, G. M. Epidemiology of Crohn's disease in Israel: a survey of Israeli kibbutz settlements. **The American Journal of Gastroenterology,** v.94, p.2961-5, 1999.

OKAMURA, H.; TSUTSI, H.; KOMATSU, T.; YUTSUDO, M.; HAKURA, A.; et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-γ production by T cells. **Nature**, v.378, p.88-91, 1995.

OLIVEIRA, M. C. de. **Caracterização bioquímica e funcional de complexos proteicos associados ao 3'UTR de mRNAs alvo**. 2010. 63f. Dissertação. (Mestrado em Bioquímica). Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa. 2010.

OPAL, S. M.; DEPALO, V. A. Anti-inflammatory cytokines. **Chest,** v.117, n.4, p. 1162-72, 2000.

OOSTENBRUG LE, NOLTE IM, OOSTEROM E, VAN DER STEEGE G, TE MEERMANC GJ, VAN DULLEMEN HM, DRENTH JPH, DE JONG DJ, VAN DER LINDE K, JANSEN PLM, KLEIBEUKER JH. CARD15 in inflammatory bowel disease and Crohn's disease phenotypes: An association study and pooled analysis. **Digestive and Liver Disease** v.38, p.834–845, 2006.

OUMA, C.; DAVENPORT, G. C.; WERE, T.; OTIENO, M. F.; HITTNER, J.B.; VULULE, J. M.; et al. Haplotypes of IL-10 promoter variants are associated with susceptibility to severe malarial anemia and functional changes in IL-10 production. **Human Genetics**, v.124, p.515-524, 2008.

PABST, R.; RUSSELL, M. W.; BRANDTZAEG, P. Tissue distribuition of lynphocytes and plasma cell and the role of the gut. **Trends in Immunology**, v.29, p.206-208, 2008.

PATHAN, N.; MARUSAWA, H.; KRAJEWSKA, M.; MATSUZAWA, S.; KIM H,. OKADA, K.; TORII, S.; KITADA, S.; KRAJEWSKI, S.; WELSH, K.; PIO, F.; GODZIK, A.; REED, J. C. TUCAN, an antiapoptotic caspase-associated recruitment domain family protein overexpressed in cancer. **Journal of Biological Chemistry**, v.273, p.32220-29, 2001.

PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **Journal of Clinical Investigation,** v.111, p.1805-12, 2003.

PLEVY, S. E.; TARGAN, S. R.; YANG, H.; FERNANDEZ, D.; ROTTER, J. I.; TOYODA, H. Tumor necrosis factor microsatellites define a Crohn's disease- associated haplotype on chromosome 6. **Gastroenterology,** v.110, n.4, p.1053–1060, 1996.

POLDOSKY, D. K. Inflammatory bowel disease. **The New England Journal of Medicine**, v.32, n.5, p.928-937, 1991.

PONTILLO, A.; OSHIRO, T. M.; GIRARDELLI, M.; KAMADA, A. J.; CROVELLA, S.; DUARTE, A. J. Polymorphisms in inflammasome' genes and susceptibility to HIV-1 infection. **Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes**, v.59, n. 2, p.121-125, 2012a.

PONTILLO, A.; GIRARDELLI, M.; KAMADA, A. J.; PANCOTTO, J. A. T.; DONADI, E. A.; CROVELLA, S.; GARCIA, P. A. Polymorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to Systemic Lupus Erythematosus. **Autoimmunity**, v.45, n.4, p.271-278, 2012b.

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.

RADFORD-SMITH, G.; JEWELL, D. P. Cytokines and inflammatory bowel disease. **Baillière's Clinical Gastroenterology,** v10, n.1, 1996.

RAM, S.; BASS, K.; ABREO, K.; BAIER, R. J.; KRUGER, T. E. Tumor necrosis fator-alpha -308 gene polymorphism is associated with synthetic hemodialysis graft failure. **Journal of Investigative Medicine**, v.52, p.19-26, 2003.

RAZMARA, M.; SRINIVASULA, S. M.; WANG, L.; POYET, J. L.; GEDDES, B. J.; DISTEFANO, P. S.; BERTIN, J.; ALNEMRI, E. S. CARD-8 protein, a new CARD Family member that regulates caspase-1 activation and apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v.277, p.13952-58, 2002.

RIGOLI, L.; ROMANO, C.; FRIES, W.; PROCOPIO, V.; AMORINI, M.; LO GIUDICE, G.; SALPIETRO, C. NOD2/CARD15 and TLR4 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in a cohort population with inflammatory bowel disease from south of Italy: survey of genotype–phenotype correlations. **Anticancer Research,** v.30, p.513-518, 2010.

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

ROBERTS, R. L.; RIJ, A. M. V.; PHILLIPS, L. V.; YOUNG, S.; MCCORMICK, S. P. A.; MERRIMAN, T. R.; Jones, G. T. Interaction of the inflammasome genes CARD8 and NLRP3 in abdominal aortic aneurysms. **Atherosclerosis,** v.218, p.123–126, 2011.

ROH, J. W.; KIM, M. H.; SEO, S. S.; KIM, S.H.; KIM, J. W.; PARK, N. H.; et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and cervical cancer risk in Korean women. **Cancer Letters**, v.184, p.57, 2002.

ROMANO, M.; SIRONI, M.; TONIATTI, C.; POLENTARUTTI, N.; FRUSCELLA, P.; GHEZZI, P.; FAGGIONI, R.; LUINI, W.; VAN HINSBERGH, V.; SOZZANI, S.; BUSSOLINO, F.; POLI, V.; CILIBERTO, G.; MANTOVANI, A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leucocyte recruitment. **Immunity,** v.6, p.315–25, 1997.

ROSENZWEIG, H. L.; PLANCK, S. R.; ROSENBAUM, J. T. NLRs in immune privileged sites. **Current Opinion in Pharmacology**, v.11, p.423-428, 2011.

RUSSEL, M. G.; STOCKBRUGGER, R. W. Epidemiology of inflammatory bowel disease, an update. **Scandinavian Journal of Gastroenterology,** v.31, p.417-27, 1996.

SACHIDANANDAM R.; WEISSMAN, D.; SCHMIDT, S. C.; KAKOL, J. M.; STEIN, L. D.; MARTH, G.; et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. **Nature**, v.409, p.928-933, 2001.

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

SANDERSON, I. R. The innate immune system of the gastrointestinal tract. **Molecular Immunology,** v.40, p.393-394, 2003.

SANDERSON I. R.; WALKER, W. A. Mucosal barrier. In: Ogra R, Mestecky J, McGhee J, Bienenstock J, Lamm M, Strober W. (Eds), Handbook of Mucosal Immunology, second ed. Academic Press New York, pp 5-11, 1999.

SAUER, C. G.; KUGATHASA, S. Pediatric inflammatory bowel disease: highlighting pediatric differences in IBD. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.38, p.611–28, 2009.

SAVERYMUTTU, S. H.; HODGSON, H. J.; CHADWICK, V. S.; PEPYS, M. B. Differing acute phase response in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Gut**, v. 27, p.809-13, 1986.

SAWCZENKO, A.; SANDHU, B. Presenting features of inflammatory bowel diseases in children. **Archives of Disease in Childhood**, v.88, p.995–1000, 2003.

SCHRODER, K.; TSCHOPP, J. The inflammasomes. **Cell,** v.140, p.821–832, 2010.

SHIH, D. Q.; TARGAN, S. R.; MCGOVERN, D. Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology. **Current Gastroenterology Reports**, v.10, p.568–75, 2008.

SIDIROPOULOS, P. I.; GOULIELMOS, G.; VOLOUDAKIS, G. K.; PETRAKI, E.; BOUMPAS, D. T. Inflammasomes and rheumatic diseases: evolving concepts. **Annals of the Rheumatic Diseases**, London, v.67, n.10, p.1382-1399, oct. 2008.

SIEGEL, R. M. Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. Nature **Reviews Immunology**, v.6, p.308, 2006.

SIEGMUND, B. Interleukin-1beta converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. **Biochemical Pharmacology,** v.64, p.1-8, 2002.

SIEGMUND, B.; FANTUZZI, G.; RIEDER, F.; GAMBONI-ROBERTSON, F.; LEHR, H. A.; HARTMANN, G.; DINARELLO, C. A.; ENDRES, S.; EIGLER, A. Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, p.1264-1273, 2001.

SILVERBERG, M. S.; CHO, J. H.; RIOUX, J. D. et al. Ulcerative colitis-risk loci on chromosomes 1p36 and 12q15 found by genome association-wide study. **Nature Genetics,** v.;41, p.216–20, 2009.

SIVAKUMAR, P. V.; WESTRICH, G. M.; KANALY, S.; GARKA, K.; BORN, T. L.; DERRY, J. M.; VINEY, J. L. Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. **Gut**, v.50, p.812-820, 2002.

SIVALINGAM, S. P.; YOON, K. H.; KOH, D. R.; FONG, K. Y. Single-nucleotide polymorphisms of the interleukina-18 gene promoter region in rheumatoid arthritis patients: protective effect of AA genotype. **Tissue Antigens**, v.62, p.498-504, 2003.

SNICK V. Interleukin 6: an overview. **Annual Review of Immunology,** v.8, p.253-78, 1990.

SOUZA, M. H.; TRONCON, L. E.; RODRIGUES, C. M.; VIANNA, C. F.; ONOFRE, P. H.; MONTEIRO, R. A.; PASSOS, A. D.; MARTINELLI, A. L.; MENEGHELLI, U. G. Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in the southeastern Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.39, p.98-105, 2002.

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.

SUTTERWALA, F. S.; OGURA, Y.; FLAVELL, R. A. The inflammasome in pathogen recognition and inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, Winston-Salem, v.82, n.2, p.259-64, aug. 2007.

TAGORE, A.; GONSALKORALE, W. M.; PRAVICA, V.; HAJEER, A. H. MCMAHON, R.; WHORWELL, P. J. et al. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. **Tissue Antigens,** v.54, p.386, 1999.

TAN, M. S.; YUA, J. T.; JIANG, T.; ZHU, X. C.; WANG, H. F.; ZHANG, W.; WANG, Y. L.; JIANG, W.; TAN, L. NLRP3 polymorphisms are associated with late-onset Alzheimer's disease in Han Chinese. **Journal of Neuroimmunology,** v.265, p.91–95, 2013.

TING, J. P.; DAVIS, B. K. CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases. **Annual Review of Immunology**, v.23, p.387-414, 2005.

TREVILATTO PC, PARDO APS, SCAREL-CAMINAGA RM, BRITO JR RB, ALVIM-PEREIRA F, ALVIM-PEREIRA CC., PROBST CM, GARLET GP, SALLUM AW, LINE SRP. Association of IL1 gene polymorphisms with chronic periodontitis in Brazilians. **Archives of Oral Biology**, v.56, p.54-62, 2011.

TURUNEN, P.; KOLHO, K.L.; AUVINEN, A. et al. Incidence of inflammatory bowel disease in Finnish children, 1987–2003. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.12, p.677, 2006.

TURNER, D. M.; WILLIAMS, D. M.; SANKARAN, D.; LAZARUS, M.; SINNOTT, P. J.; HUTCHINSON, I. V. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European Journal of Immunogenetics,** v. 24, p.1-8, 1997.

UZAN, M.; TANRIVERDI, T.; BAYKARA, O.; KAFADAR, A.; SANUS, G. Z. et al. Association between interleukin-1 beta (IL-1beta) gene polymorphism and outcome after head injury: an early report. **Acta Neurochirurgica,** Wien, v.147, n.7, p.715-20, 2005.

VAN LIMBERGEN, J.; RUSSELL, R. K.; DRUMMOND, H. E. et al. Definition of phenotypic characteristics of childhood-onset inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.135, p.1114–22, 2008.

VASSALLI, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. **Annual Review of Immunology**, v.42, p.227-34, 1992.

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

VERMA, D.; LERM, M.; BLOMGRAN JULINDER, R.; ERIKSSON, P.; SÖDERKVIST, P.; SÄRNDAHL, E. Gene polymorphisms in the NALP3 inflammasome are associated with interleukin-1 production and severe inflammation: relation to common inflammatory diseases? **Arthritis & Rheumatology,** v. 58, n.3, p. 888-94, mar. 2008.

VERNIER–MASSOUILLE, G.; BALDE, M.; SALLERON, J. Natural history of pediatric Crohn's disease. A population-based cohort study. **Gastroenterology**, v.135, p.1106–13, 2008.

VICTORIA, C. R. SASSAKI LY NUNES, H. R. C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in Midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia,** v.46, p.20-25, 2009.

WANG, A. H.; LAM, W. J.; HAN, D. Y.; DING, Y.; HU R FRASER, A. G.; et al. The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. **Human Immunology,** v.72, p.431, 2011.

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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,** v.94, p.3195, 1997.

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

ZAKI, M. H.; LAMKANFI, M.; KANNEGANTI, T. The Nlrp3 inflammasome: contributions to intestinal homeostasis. **Trends in Immunology**, v.32, n.4, p.171-179, 2011.

ZENG, Z.; ZHU, Z.; YANG, Y.; RUAN, W.; PENG, X.; SU, Y.; PENG, L.; CHEN, J.; YIN, Q.; ZHAO, C.; ZHOU, H.; YUAN, S.; HAO, Y.; QIAN, J.; NG, S. C.; CHEN, M.; HU, P. incidence and clinical characteristics of inflammatory bowel disease in a developed region of guangdong province, China: a prospective population-based study. **Journal of Gastroenterology and Hepatology,** v.28, p.1148-1153, 2013.

ZHERNAKOVA, A.; VAN DIEMEN, C. C.; WIJMENGA, C. Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. **Nature Reviews Genetics**, v.10, p.43–55, 2009.

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO

INTERNATIONAL JOURNAL OF IMMUNOGENETICS

doi: 10.1111/iji.12289

Tumour necrosis factor-alpha (-308G/A) promoter polymorphism is associated with ulcerative colitis in Brazilian patients

M. Tavares*, C. de Lima†, W. Fernandes‡, V. Martinelli§, M. de Lucena¶, F. Lima, A. Telles††, L. Brandão†† & M. de Melo Júnior††**

Summary

Inflammatory bowel disease consists of multifactorial diseases whose common manifestation is inflammation of the gastrointestinal tract and their pathogenesis remains unknown. This study aimed to analyse the gene polymorphisms in Brazilian patients with inflammatory bowel disease. A total of 101 patients diagnosed with inflammatory bowel disease were analysed for the tumour necrosis factor-alpha (-308 G/A; rs1800629) and interleukin-10 (-1082 G/A; rs1800896) gene polymorphisms. Genotyping was performed through polymerase chain reaction–sequence-specific primer, then fractionated on 2% agarose gel and visualized after staining by ethidium bromide. The anatomic–clinical form of Crohn's disease (CD) predominant was the inflammatory (32.75%), followed by fistulizing (29.31%) and 27.58% stricturing. As control group, a total of 136 healthy subjects, from the same geographical region, were enrolled. The statistical analyses were performed using R program. The frequency of the A allele at tumour necrosis factor-alpha was high in ulcerative colitis (UC) patients (51%) than in controls (22%; $P > 0.01$). No statistical difference was found with the genotypic and allelic frequencies of CD patients compared to controls ($P = 0.54$). The polymorphism -1082G/A of interleukin-10 was not statistical different between the diseases compared to controls. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-α) (-308G/A) is associated with UC onset, suggesting that the presence of -308A allele could confer a relative risk of 3.62 more to develop UC in general population. Further studies, increasing the number of individuals, should be performed to ratify the role of TNF-α in the inflammatory bowel disease pathogenesis.

*Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil, †Laboratory of Immunopathology Keizo Asami and Department of Genetics, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil, ‡Master in Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil, §Department of Gastroenterology, University Hospital, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil, ¶Maurílio Toscano de Lucena, Department of Proctology, Barão de Lucena Hospital, Recife, Brazil, **Department of Surgery, University Hospital, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil and ††Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

Received 2 December 2015; revised 13 June 2016; accepted 28 July 2016

Correspondence: Mayara Costa Mansur Tavares, Master in Biology Applied to Health, Laboratory of Immunopathology Keizo Asami – Federal University of Pernambuco (UFPE), Apodi Street, n.492, apartment 1202, Natal – Rio Grande do Norte, 59.020-130, Brazil. Tel: + 55 84 998279798; Fax: +55 81 21268000; E-mail: mayaramansur@gmail.com

Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) describes a heterogeneous group of chronic gastrointestinal tract inflammatory. The two main types of IBD are (UC) and Crohn's disease (CD) (Richard Hansen *et al.*, 2010; Nosratollah *et al.*, 2014). The main symptoms related to IBD are abdominal pain, diarrhoea, weight loss, haematochezia including other extra intestinal manifestations (Szigethy *et al.*, 2010). Regarding the manifestation of CD according to the sex, it is observed a higher male prevalence in childhood, when compared to adult (with a female predominance). In UC, the frequency is the same, so there is no difference in frequency between men and women (Richard Hansen *et al.*, 2010).

The IBD pathogenesis is complex and involves an interaction between genetic, environmental and immunological factors. In fact, in genetically susceptible individuals to IBD, an environmental trigger (e.g. infection, medication, smoking) may be the inciting event.

Many patients carrying genetic predisposition alleles to IBD could manifest an overactive immune response to bacteria, located in the gastrointestinal tract, presenting the IBD symptoms (Shih *et al.*, 2008). The IBD is characterized by unpredictable inflammation attacks in the intestine across an infiltration of the lamina propria by innate immune cells (neutrophils, macrophages, dendritic and NK cells) and adaptive immune cells (B and T cells). Increased number and activation of these cells in the intestinal mucosa could

© 2016 John Wiley & Sons Ltd

enhance local levels of tumour necrosis factor (TNF), which is located in the IBD3 region (6p21.1-23), and other pro-inflammatory interleukins (van Heel *et al.*, 2004; López-Hernández *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2011; Bouguen *et al.*, 2011; Muro *et al.*, 2014).

A growing number of different genes have been implicated in the etiopathogenesis of IBD. The majority genes involved in CD pathogenesis are linked with innate immunity, manly with an inflammatory property (Szigethy *et al.*, 2010). Cytokines are proteins that regulate inflammation response, and the release of proinflammatory cytokines could explain most of local and systemic components of acute and chronic inflammatory diseases during IBD activation (Guimbaud *et al.*, 1998).

Tumour necrosis factor-alpha (TNF-α) is an important pro-inflammatory, pleiotropic and immunoregulatory cytokine, produced by activated monocytes and macrophages, that plays a key role in initiation, regulation and perpetuation of the inflammatory response (Koss *et al.*, 2000; González *et al.*, 2003). Some single-nucleotide polymorphisms (SNP) in the promoter region of TNF-α gene, located at nucleotides -238 and -308, are known to affect the level of gene expression (Yang *et al.*, 2006). Such variations in the TNF-α promoter region have previously been associated with susceptibility to a range of immune disorders, including CD (Louis & Belaiche, 2000; Kim *et al.*, 2003; Vatay *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2009).

Interleukin-10 (IL-10) is an anti-inflammatory cytokine that plays a role in limiting and terminating the body's inflammatory responses, blocking the pro-inflammatory cytokine secretion and regulating the differentiation and proliferation of several immune cells (Garza-González *et al.*, 2010). Three SNPs at position -1082 G/A, -819 C/T and -592 C/A have been recently described, which influence a differential IL-10 production (Klein *et al.*, 2000; Hajeer & Hutchinson, 2001; Fernandez *et al.*, 2005). Studies have shown the involvement of IL-10, both genetic polymorphisms as cytokine production in the pathogenesis of inflammatory diseases, as well as its association with prognosis (Stewart *et al.*, 1994; Lech-Maranda *et al.*, 2004). Some studies on IL-10 polymorphism association with IBD and with other diseases have been published, reporting controversial results of how the gene is involved in IBD pathogenesis (Lech-Maranda *et al.*, 2004; Fernandez *et al.*, 2005; Fowler *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011).

The understanding of these cytokines in IBD onset not only provides a better comprehension into the pathogenesis of IBD but also sheds light on various clinical applications. Thus, the aim of this study was to analyse the association between the -308 G/A (rs1800629) and -1082G/A (rs1800896) SNPs, at *TNF-α* and *IL-10* genes, respectively, with IBD onset in a Brazilian population and evaluate the relation between these polymorphisms with susceptibility and behaviour of CD and UC.

Materials and methods

Patients and controls

A case–control study was performed with 101 Brazilian patients presenting IBD from the Gastroenterology Clinic of the Barão de Lucena Hospital/SES/PE and Hospital das Clínicas of Pernambuco, Federal University of Pernambuco.

The diagnosis of IBD was based on clinical, laboratory, imaging, endoscopic (colonoscopy) and histological evidences (Lennard-Jones, 1989). The CD and UC patients were diagnosed according to the criteria of the Lennard-Jones (1989) and classified according to the Vienna classification (Gasche *et al.*, 2000). Clinical data were collected from all patients [i.e. age at diagnosis and disease behaviour (structuring, inflammatory or fistulizing)]. Blood samples were collected in tubes containing anticoagulated with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) from June 2013 to January 2014.

The mean age of participants was 41 years (mean: 42.26/median: 41 years old/σ = 13.79), and the predominant gender was similar between male (50/101; 49.5%) and female (51/101; 50.5%). The majority of patients were diagnosed for disease under 40 years of age (57.42%).

Of the 101 cases, 43 (42.57%) had UC and 58 (57.42%) had CD. Among the 58 CD patients diagnosed in our study, 19 patients (32.75%) were diagnosed as having nonstructuring/nonfistulizing CD, 17 patients (29.31%) with fistulizing CD and 16 (27.58%) with structuring CD. The other 6 (10.34%) showed more than one disease behaviour.

The control group comprised subjects who underwent endoscopy and who had no clinical or laboratory evidence of IBD. One hundred and eighteen individuals of the control group were genotyped for TNF-α, and 136 individuals of the control group were genotyped for IL-10 (mean: 33.63 median: 32 years old and mean: 33.52 median: 29 years old).

Ethical issues

The Ethics Committee of the Health Sciences Center of Federal University of Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) approved this study (protocol 222/2010), and all patients agreed to participate by signing the free and informed consent form.

Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from 250 μL of peripheral blood using rapid protocol mini salting out method and digestion with proteinase K, presented in Technical Handbook of the Twelfth International

© 2016 John Wiley & Sons Ltd

Histocompatibility Workshop (1996), with modifications to amounts used.

TNF-α and IL-10 genes polymorphisms analysis

Genotyping was performed by the polymerase chain reaction–sequence-specific primer (PCR-SSP) method as described by Perrey *et al.* (1999). TNF-α and IL-10 SNPs genotyping were performed following protocols from the literature (Kim *et al.*, 2003; Kamali-Sarvestani *et al.*, 2005). The PCR product was fractionated on 2% agarose gel and visualized after staining by ethidium bromide (10 mg mL^{-1}) on ultraviolet light.

Statistical analysis

Statistical analysis was realized using the R program. The influence of each polymorphism on the risk of developing IBD was estimated by odds ratio (OR) using a confidence interval (CI) of 95% for the parameters. Hardy–Weinberg equilibrium was tested. The prevalence of different genotypes in patients and controls was analysed by the Fisher. Bonferroni test was performing to multiple-significance-test correction, and only values less than 0.025 were considered statistically significant.

Results

In this study, we investigated 101 patients with IBD, regarding to clinical aspects, habits (Table 1), in order to associate functional polymorphisms at TNF-α and IL-10 genes. Unfortunately, two patients were excluded in IL-10 analysis.

The distributions of -308 G/A and -1082G/A genotypes of TNF-α and IL-10 gene, respectively, are in agreement with the prediction under the condition of Hardy–Weinberg equilibrium. However, patient group to UC in both TNF-α and for IL-10 gene polymorphisms was not in Hardy–Weinberg equilibrium ($P = 0.01$) (Table 2).

The polymorphism -308A (rs1800629) in the promoter region was very common in IBD patients than in healthy individuals ($P = 0.02$). When we classified IBD patients in the groups, CD and UC, we verified an elevated frequency of -308A in UC when compared with other groups (51% UC vs. 33% IBD, 19% CD and 22% control). The association with UC × control was statistically significant ($P < 0.01$; OR = 3.60, IC = 2.07–6.29). In contrast, the -308G was a little more frequent in CD patients than in healthy persons, but not statistical different ($P = 0.54$).

The frequency of genotypes G/G, G/A and A/A for TNF-α showed a statistically significant association when compared UC with the control group ($P < 0.01$).

The distribution of -1082G/A (rs1800896) at IL-10 gene was not statistical different (IBD × control $P = 0.51$; CD × control $P = 0.29$, UC × control $P = 0.80$).

Phenotypic analysis demonstrated no significant association between genotypes and alleles TNF-α and IL-10 genes with CD behaviour ($P > 0.05$; Table 3).

Table 1. General characteristics of the patients and control groups

General characteristics	Patients *n* = 101 (%)	General characteristics	Control *n* = 136 (%)
Age at diagnosis		Age	
<40 years	43 (42.57%)	≤30 years	56 (41.18%)
≥40 years	58 (57.42%)	≤40 years	50 (36.76%)
		>40 years	30 (22.06%)
Sex		Sex	
Male	50 (49.5%)	Male	19 (13.97%)
Female	51 (50.5%)	Female	117 (86.03%)
Eating habits			
Diet	53 (52.47%)		
No diet	48 (47.52%)		
Family history	12 (11.88%)	Family history	0 (0%)
No family history	89 (88.11%)	No family history	136 (100%)
Clinical characteristics CD	Patients CD		
Anatomo-clinical form	*n* = 58 (%)		
Nonstricturing/Nonfistulizing	19 (32.75%)		
Fistulizing	17 (29.31%)		
Stricturing	16 (27.58%)		
More than one form	6 (10.34%)		
Extraintestinal manifestations	*n* = 22		
Arthritis/artralgia	17 (29.31%)		
Psoriasis	1 (1.72%)		
Ankylosing spondylitis	1 (1.72%)		
Pyodermitis	2 (3.45%)		
Erythema nodosum	1 (1.72%)		

Complete clinical information according to the Vienna classification (Gasche *et al.*, 2000) modified.

© 2016 John Wiley & Sons Ltd

Table 2. Frequencies genotypic and allelic of -308 G/A of TNF-α and -1082G/A of IL-10 in the patients and control groups classified according to Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC)

TNF (-308)	IBD	CD	UC	Control	IBD × Control		CD × Control		UC × Control	
Allele	*n* = 202 (Freq.)	*n* = 116 (Freq.)	*n* = 86 (Freq.)	*n* = 236 (Freq.)	OR (CI 95%)	*P* value	OR (CI 95%)	*P* value	OR (CI 95%)	*P* value
A	66 (0.33)	22 (0.19)	44 (0.51)	53 (0.22)	Ref.		Ref.		Ref.	
G	136 (0.67)	94 (0.81)	42 (0.49)	183 (0.78)	1.68 (1.1–2.56)	0.02	0.81 (0.46–1.41)	0.54	3.60 (2.07–6.29)	0.000002
Codominant	*n* = 101 (Freq.)	*n* = 58 (Freq.)	*n* = 43 (Freq.)	*n* = 118 (Freq.)						
G/G	45 (0.45)	40 (0.69)	5 (0.12)	70 (0.59)	Ref.	0.05	Ref.	0.23	Ref.	0.000000392
G/A	46 (0.46)	14 (0.24)	32 (0.74)	43 (0.36)	1.66 (0.95–2.91)	0.1	0.57 (0.28–1.17)	0.17	10.42 (3.77–28.78)	0.000000845
A/A	10 (0.1)	4 (0.07)	6 (0.14)	5 (0.04)	3.11 (1–9.7)	0.08	1.4 (0.36–5.52)	0.9	16.8 (3.77–74.84)	0.000075978
IL-10 (-1052)	IBD	CD	UC	Control	IBD × Control		DC × Control		UC × Control	
Allele	*n* = 198 (Freq.)	*n* = 112 (Freq.)	*n* = 86 (Freq.)	*n* = 272 (Freq.)	OR (CI 95%)	*P* value	OR (CI 95%)	*P* value	OR (CI 95%)	*P* value
G	95 (0.48)	58 (0.52)	37 (0.43)	122 (0.45)	Ref.		Ref.		Ref.	
A	103 (0.52)	54 (0.48)	49 (0.57)	150 (0.55)	1.33 (0.77–1.66)	0.51	1.32 (0.83–2.10)	0.29	0.93 (0.55–1.56)	0.80
Codominant	*n* = 99 (Freq.)	n = 56 (Freq.)	*n* = 43 (Freq.)	*n* = 136 (Freq.)						
G/G	16 (0.16)	12 (0.21)	4 (0.09)	17 (0.13)	Ref.	0.67	Ref.	0.26	Ref.	0.93
G/A	63 (0.64)	34 (0.61)	29 (0.67)	88 (0.65)	1.31 (0.57–2.99)	0.56	1.81 (0.75–4.54)	0.18	0.71 (0.16–2.44)	0.78
A/A	20 (0.2)	10 (0.18)	10 (0.23)	31 (0.23)	1.45 (0.54–3.87)	0.49	2.16 (0.69 – 6.93)	0.19	0.73 (0.14–3.05)	0.75

We also performed a logistic regression to access a multivariate analysis, including gender, age, age at diagnose, clinical characteristic and genotype information. None of these variables were involved, together or individually, in the onset of IBD, CD or UC, except the TNF-α -308AA, which was associated with IBD and UC.

Discussion

In this study, we tested the hypothesis that cytokine genetic polymorphisms might influence in the development of inflammatory bowel disease. The role of TNF-α and IL-10 gene polymorphisms on the susceptibility to many inflammatory diseases has been well documented; however, the results obtained are contradictory.

Our findings indicate that the presence of A allele (rs1800629) polymorphism predisposes the onset of UC but was not associated with risk of Crohn's disease. However, our study did not find an association between the polymorphism of IL-10 (-1082G/A) and IBD, suggesting that this polymorphism do not contribute to pathogenesis of IBD in Brazilian population.

TNF-α and TNF-β are key cytokines known to play a role in inflammatory responses, and the loci for these genes are found in the IBD3 region on chromosome 6p21, which is known to be associated with an increased risk of IBD (Muro *et al.*, 2014).

The TNF-α is a key cytokine in the immune response, playing an important role in the pathogenesis of IBD (Guimbaud *et al.*, 1998). A number of studies have been published on TNF-α polymorphisms in several populations (Tagore *et al.*, 1999; Mendonza *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006), mainly focusing in the promoter region of the gene. In some of these, their results indicated that the TNF-α gene contributes to the risk of developing in Belgian (Louis & Belaiche, 2000), Hungarian (Vatay *et al.*, 2003), Korean (Kim *et al.*, 2003), Danish (Bank *et al.*, 2014), Mexican (Yamamoto-Furusho *et al.*, 2004) and Moroccan (Senhaji *et al.*, 2016) populations.

However, other studies in Australian (Fowler *et al.*, 2005), Canadian (Zipperlen *et al.*, 2005), Korean (Yang *et al.*, 2006), Caucasians (Koss *et al.*, 2000), Spanish (González *et al.*, 2003; López-Hernández *et al.*, 2015) and Iranian (Nosratollah *et al.*, 2014) population found that rs1800629 promoter polymorphism was not associated with risk of Crohn's disease. In this sense, our results are in agreement with these data because the association between CD and controls was not statistically significant.

In our study, the frequency of TNF-α -308A was higher in UC compared with control group ($P = 0.00$). We found that patients from our studied population who carry the genotype AA of TNF-α are by 16.8 times in risk to develop UC (OR = 16.8 (CI 95%); 3.77–74.84; $P = 0.00$). Our findings suggest that the presence of A allele predisposes the onset of UC.

© 2016 John Wiley & Sons Ltd

Table 3. Relation between the control group and disease behaviour in CD patients in relation to *TNF-α* (-308 G/A) and *IL-10* (-1082G/A) genes

	Control × Fistulizing CD	Control × Nonstructuring/nonfistulizing CD	Control × Structuring CD
TNF-α			
GG X GA X AA	$P = 0.02$	$P = 0.22$	$P = 0.53$
G X A	$P = 0.13$	$P = 0.13$	$P = 0.25$
	OR = 0.53	OR = 2.45	OR = 2.02
	95% CI (0.23–1.26)	95% CI (0.82–9.95)	95% CI (0.66–8.28)
IL-10			
GG X GA X AA	$P = 0.86$	$P = 0.76$	$P = 0.579$
G X A	$P = 0.5884$	$P = 0.86$	$P = 1$
	OR = 1.23	OR = 1.10	OR = 0.95
	95% CI (0.56–2.68)	95% CI (0.53–2.31)	95% CI (0.42–2.13)

In fact, the actions of cytokines may be deeply conditioned by the presence of other cytokines, particularly in the case IL-10 and TNF-α, which are mutually regulated and play opposing functional roles in inflammatory responses. Whereas TNF-α is a prototype of a proinflammatory molecule, IL-10 is mainly recognized for its anti-inflammatory activity; thus, IL-10 is a key player in the homoeostasis 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 (Andersen *et al.*, 2010). 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 TH1-mediated disease (Fernandez *et al.*, 2005).

Studies on IL-10 polymorphisms associated with IBD and other diseases have been published, however, reporting conflicting results (Klein *et al.*, 2000; Fernandez *et al.*, 2005; Fowler *et al.*, 2005; Sanchez *et al.*, 2009; Andersen *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Several lines of evidence suggest that IL-10 influences susceptibility to CD (Garza-González *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Some studies show that the IL-10 -1082A allele results in a lower production of IL-10 protein compared with the -1082G allele (Gibson *et al.*, 2001), and it is known that patients with low IL-10 levels have a high CD susceptibility (Klein *et al.*, 2000; Gibson *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2011). Similarly, the substitution of the G allele for A allele at position -308 of the gene *TNF-α* increases transcription levels (Wilson *et al.*, 1997; Hajeer & Hutchinson, 2001).

Previous studies were able to find association between CD susceptibility and the IL-10 promoter polymorphism in Mexican (Garza-González *et al.*, 2010), New Zealand (Wang *et al.*, 2011) and United Kingdom (Tagore *et al.*, 1999) population. On the other hand, no association was found between the IL-10 -1082 G/A polymorphism with CD or UC in Caucasians of United Kingdom (Koss *et al.*, 2000), Korean (Kim *et al.*, 2003), Canadian (Sanchez *et al.*, 2009), German (Klein *et al.*, 2000), Danish (Perrey *et al.*, 1999 and Andersen *et al.*, 2010) and Spanish population (Vatay *et al.*, 2003; Mendonza *et al.*, 2006; López-Hernández *et al.*, 2015).

In conclusion, we did not find any statistically significant association between the frequency of alleles and genotypes for rs1800896 in IBD patients and control groups (both UC and CD), which suggests that a -1082 IL-10 polymorphism does not contribute to pathogenesis of IBD in Brazilian population. On the other hand, we can hypothesize that the -308A TNF-α allele, known to increase production of TNF-α, is associated with the development of UC in the Brazilian population but does not have significant relationship with behaviour CD.

Competing interests

No conflict of interest to declare.

Acknowledgements

We thank the patients and their families, whose collaboration and understanding have made this work possible. We are also grateful for the facilities of the Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, where the experiments were performed. This study was supported by The National Council of Scientific and Technological Development (CNPQ), Brazil.

References

Almeida, A.C., Ferreira, P., Canedo, F., Pereira, C., Figueiredo, R., Seruca, J.C. *et al.* (2004) Diferentes subtipos clinico patológicos da doença de Crohn podem ser definidos por variantes dos genes Nod2/Card15 e TNFa. *Journal of Portuguesa Gastrenterology*, **11**, 302.

Andersen, V., Ernst, A., Christensen, J., Østergaard, M., Jacobsen, B.A., Tjønneland, A. *et al.* (2010) 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*, **11**, 82.

Anderson, C.A., Boucher, G., Lees, C.W., Franke, A., D'Amato, M., Taylor, K.D. *et al.* (2011) Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nature Genetic*, **43**, 246.

Bank, S., Andersen, P.S., Burisch, J., Pedersen, N., Roug, S., Galsgaard, J. *et al.* (2014) Polymorphisms in the inflammatory

© 2016 John Wiley & Sons Ltd

pathway genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG are associated with susceptibility of Inflammatory Bowel Disease in a Danish cohort. *PLoS One*, **9**, e98815.

Bouguen, G., Chevaux, J.B. & Peyrin-Biroulet, L. (2011) Recent advances in cytokines: therapeutic implications for inflammatory bowel diseases. *World Journal of Gastroenterology*, **17**, 547.

Fernandez, L., Martinez, A., Mendoza, J.L., Urcelay, E., Fernandez-Arquero, M., Garcia-Paredes, J. *et al.* (2005) Interleukin-10 polymorphisms in Spanish patients with IBD. *Inflammatory Bowel Diseases*, **11**, 739.

Ferreira, A.C., Almeida, S., Tavares, M., Canedo, P., Pereira, F., Regalo, G. *et al.* (2005) NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, **11**, 331.

Fowler, E.V., Eri, R., Hume, G., Johnstone, S., Pandeya, N., Lincoln, D. *et al.* (2005) TNF-alpha and IL10 SNPs act together to predict disease behaviour in Crohn's disease. *Journal of Medical Genetics*, **42**, 523.

Garza-González, E., Pérez-Pérez, G.I., Mendonza-Ibarra, S.I., Flores-Gutiérrez, J.P. & Bosques-Padilla, F.J. (2010) Genetic risk factors for inflammatory bowel disease in a North-eastern Mexican population. *International Journal of Immunogenetics*, **37**, 355.

Gasche, C., Scholmerich, J., Brynskov, J., D'Haens, G., Hanauer, S.B., Irvine, E.J. *et al.* (2000) A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. *Inflammatory Bowel Diseases*, **6**, 8.

Gibson, A.W., Edberg, J.C., Wu, J., Westendorp, R.G., Huizinga, T.W. & Kimberly, R.P. (2001) Novel single nucleotide polymorphism in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *Journal of Immunology*, **166**, 3915.

González, S., Rodrigo, L., Martínez-Borra, J., López-Vázquez, A., Fuertes, D., Niño, P., Cadahía, V., Saro, C., Dieguez, M.A. & López-Larrea, C. (2003) TNF- α -308A promoter polymorphism is assoaciated with enhanced TNF- α production and inflammatory activity in Crohn1s patients with fistulizing disease. *American Journal of Gastroenterology* (No. *5*) , **98**, 1101.

Guimbaud, R., Bertrand, V., Chauvelot-Moachon, L., Quartier, G., Vidon, N., Giroud, J., Couturier, D. & Chaussade, S. (1998) Network of inflammatory cytokines and correlation with disease activity in ulcerative colitis. *The American Journal of Gastroenterology*(No. 12), **93**, 2397.

Hajeer, A.H. & Hutchinson, I.V. (2001) Influence of TNF alpha gene polymorphisms on TNF alpha production and disease. *Human Immunology*, **62**, 1191.

van Heel, D.A., Fisher, S.A., Kirby, A., Daly, M.J., Rioux, J.D. & Lewis, C.M. (2004) Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Human Molecular Genetics*, **13**, 763.

Kamali-Sarvestani, E., Gharesi-Fard, B., Sarvari, J. & Talei, A.A. (2005) Association of TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphism with steroid receptor expression in breast cancer patients. *Pathology and Oncology Research*, **11**, 99Epub 2005 Jul 1.

Kim, T.H., Kim, B.G., Shin, H.D., Kim, J.W., Kim, C.G., Kim, J.S. *et al.* (2003) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms in Korean patients with inflammatory bowel disease. *The Korean Journal of Gastroenterology*, **42**, 377.

Klein, W., Tromm, A., Griga, T., Fricke, H., Folwaczny, C., Hocke, M. *et al.* (2000) The IL-10 gene is not involved in the predisposition to inflammatory bowel disease. *Electrophoresis*, **2**, 3578.

Koss, K., Satsangi, J., Fanning, G.C., Welsh, K.I. & Jewell, D.P. (2000) Cytokine (TNFα, LTα and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel disease and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes and Immunity*, **1**, 185.

Lech-Maranda, E., Baseggio, L., Bienvenu, J., Charlot, C., Berguer, F., Rigal, D. *et al.* (2004) Interleukin-10 gene promotor polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, **13**, 3529.

Lennard-Jones, J.E. (1989) Classification of inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* , Suppl **170**, 2.

López-Hernández, R., Valdés, M., Lucas, D., Campillo, J.A., Martínez-Garcia, P., Salama, H. *et al.* (2010) Association analysis of MICA gene polymorphism and MICA-129 dimorphism with inflammatory bowel disease susceptibility in a Spanish population. *Human Immunology*, **71**, 512.

López-Hernández, R., Valdés, M., Campillo, J.A., Martínez-García, P., Salama, H., Bolarin, J.M. *et al.* (2015) Pro- and anti-inflammatory cytokine gene single-nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease. *International Journal of Immunology*, **42**, 38.

Louis, E. & Belaiche, J. (2000) Genetics of Crohn's disease behavior. *Acta Gastroenterologica Belgica*, **63**, 377.

Mendonza, J.L., Urcelay, E., Lana, R., Martínez, A., Taxonera, C., de la Concha, E.G. & Díaz-Rubio, M. (2006) Polymorphism in the interleukin-10 gene and relation to phenotype in patients with ulcerative colitis. *Revista Española de Enfermedades Digestivas (Madrid)*, **98**, 93.

Muro, M., López-Hernández, R. & Mrowiec, A. (2014) Immunogenetics biomarkers in inflammatory bowel disease: role of the IBD3 region. *World Journal of Gastroenterology*, **20**, 15037.

Nosratollah, N., Alma, F., Tahereh, D., Manijeh, H., Hedie, B., Farzad, F., Aydin, M., Masoumeh, S. & Mohammadreza, Z. (2014) Association of tumor necrosis factor alpha gene polymorphisms with inflammatory bowel disease in Iran. *Iranian Journal of Public Health*, **43**, 630.

Perrey, C., Turner, S.J., Pravica, V., Howell, W.M. & Hutchinson, I.V. (1999) ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms. *Transplant Immunology*, **7**, 127.

Richard Hansen, R., Cameron, F.L., Hold, G.L., El-Omar, E.M. & Russel, R.K. (2010) Inflammatory bowel disease. *Paediatrics and Child Health*, **20**, 473.

Sanchez, R., Levy, E., Costea, F. & Sinnett, D. (2009) IL-10 and TNF-alpha promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location. *World Journal of Gastroenterology*, **15**, 3776.

Senhaji, N., Serrano, A., Badre, W., Serbati, N., Karkouri, M., Zaid, Y., Nadifi, S. & Martin, J. (2016) Association of inflammatory cytokine gene polymorphisms with inflammatory bowel disease in a Moroccan cohort. *Genes and Immunity*, **17**, 60.

Shih, D.Q., Targan, S.R. & McGovern, D. (2008) Recent advances in IBD pathogenesis: genetics and immunobiology. *Current Gastroenterology Reports*, **10**, 568.

Stewart, J.P., Behm, F.G., Arrand, J.R. & Rooney, C.M. (1994) Differential expression of viral and human interleukin-10 (IL-10) by primary B cell tumors and B cell lines. *Virology*, **200**, 724.

Szigethy, E., Laura McLafferty, L. & Goyal, A. (2010) Inflammatory bowel disease. *Child and Adolescent Psychiatric Clinics of North America*, **19**, 301.

Tagore, A., Gonsalkorale, W.M., Pravica, V., Hajeer, A.H., McMahon, R., Whorwell, P.J. *et al.* (1999) Interleukin-10

© 2016 John Wiley & Sons Ltd

(IL-10) genotypes in inflammatory bowel disease. *Tissue Antigens*, **54**, 386.

Vatay, A., Bene, L., Kovács, A., Prohászka, Z., Szalai, C., Romics, L. *et al.* (2003) Relationship between the tumor necrosis factor alpha polymorphism and the serum C-reactive protein levels in inflammatory bowel disease. *Immunogenetics*, **55**, 247.

Wang, A.H., Lam, W.J., Han, D.Y., Ding, Y., Hu, R., Fraser, A.G. *et al.* (2011) The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. *Human Immunology*, **72**, 431.

Wilson, A.G., Symons, J.A., McDowell, T.L., McDevitt, H.O. & Duff, G.W. (1997) Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 3195.

Yamamoto-Furusho, J.K., Uscanga, L.F., Vargas-Alarcón, G., Rodríguez-Pérez, J.M., Zuñiga, J. & Granados, J. (2004) Polymorphisms in the promoter region of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) and the HLA-DRB1 locus in Mexican Mestizo patients with ulcerative colitis. *Immunology Letters*, **95**, 31.

Yang, S.K., Lee, S.G., Cho, Y.K., Lim, J., Lee, I. & Song, K. (2006) Association of TNF-α/LTA polymorphisms with Crohn's disease in Koreans. *Cytokine*, **35**, 13.

Zipperlen, K., Peddle, L., Melay, B., Hefferton, D. & Rahman, P. (2005) Association of TNF-α Polymorphisms in Crohn Disease. *Human Immunology*, **66**, 56.

© 2016 John Wiley & Sons Ltd

ANEXO B – ARTIGO PUBLICADO

PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E LABORATORIAL DE PACIENTES COM DIFERENTES FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CROHN: SÉRIE DE CASOS DE UM HOSPITAL REGIONAL DO NORDESTE DO BRASIL

Mayara Costa Mansur Tavares[1]
Maria Izabel Siqueira de Andrade[2]
Valéria Ferreira Martinelli[3]
Mário Ribeiro de Melo Júnior[4]
Regiane Maio[5]
Keila Fernandes Dourado[6]

RESUMO

Com o objetivo de caracterizar o perfil epidemiológico e laboratorial de pacientes com doença de Crohn (DC), conduziu-se a presente série de casos, englobando 26 indivíduos atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Coletaram-se dados epidemiológicos, clínicos e bioquímicos, incluindo a relação Proteína C-Reativa (PCR) /Albumina. A amostra apresentou idade de 41,3±13,2 anos e 100,0% estava em remissão da DC. A relação PCR/Albumina foi elevada em 76,9% dos participantes, principalmente naqueles com menor tempo da DC e com alta Velocidade de Hemossedimentação ($p \leq 0,05$). Os indivíduos desta casuística revelaram características típicas da DC e valores elevados da relação PCR/Albumina.

Palavras-chave: Doença de Crohn. Perfil de saúde. Albuminas.

---

[1] Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal Rural de Pernambuco e Mestre em Biologia Aplicada à Saúde pela Universidade Federal de Pernambuco. Está atualmente vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada a Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco, nível doutorado.

[2] Nutricionista graduada pela Universidade Federal de Pernambuco/Centro Acadêmico de Vitória-UFPE/CAV (2011), Especialista em Nutrição Clínica pelo Programa de Residência do Hospital das Clínicas-HC/UFPE (2014), Pós-graduanda em Nutrição Clínica Funcional pela Universidade Cruzeiro do Sul-UNICSUL, Mestre em Nutrição pelo Programa de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE (2016) e Doutoranda em Nutrição, pela Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, na área de Nutrição e Saúde Pública.

[3] Possui graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado) pela Universidade Federal de Pernambuco - UFPE (2000), Mestrado em Patologia pela UFPE (2003) e Doutorado em Ciências Biológicas (Biotecnologia) pela UFPE (2006). Atualmente é Professor Adjunto III do Departamento de Patologia (DepPat), pesquisador do setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA (UFPE) e Docente-orientador dos Programas de Pós-graduação em Patologia (POSPAT) e Biologia aplicada a saúde (PPGBAS).

[4] Possui graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado) pela Universidade Federal de Pernambuco - UFPE (2000), Mestrado em Patologia pela UFPE (2003) e Doutorado em Ciências Biológicas (Biotecnologia) pela UFPE (2006).

[5] Possui graduação em Nutrição pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas (1993), mestrado (1999) e doutorado (2005) em Fisiopatologia em Clínica Médica, área Metabolismo e Nutrição, pela Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu (Unesp).

[6] Professora Adjunta III do Núcleo de Nutrição do Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão (CAV) - UFPE na área de Nutrição Clínica. Coordenadora da Instituição Formadora da Residência em Nutrição Clínica do Hospital Barão de Lucena. Doutora em Nutrição (2010), Mestre em Nutrição (2005) pela UFPE e Especialista em Nutrição pelo Programa de Residência em Nutrição do Hospital das Clínicas- UFPE (2003).

1 INTRODUÇÃO

A doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória intestinal (DII) crônica e recidivante que afeta qualquer porção do trato gastrointestinal desde a boca até o ânus (LAASS; ROGGENBUCK; CONRAD, 2014). Atinge principalmente pessoas jovens, apresentando diversas formas clínicas de alta complexidade (JEWEL, 2006).

Os sintomas mais comuns são dor abdominal (86%), diarreia (78%), ou presença de sangue nas fezes (49%), entretanto, no início das manifestações clínicas, a DC não apresenta sintomas específicos, o que torna o seu diagnóstico tardio (SAWCZENKO; SANDHU, 2003; GRIFFITHS, 2004; VERNIER-MASSOUILLE; BALDE; SALLERON, 2008).

No exame histopatológico, a inflamação é geralmente do tipo transmural afetando todas as camadas da parede intestinal, da mucosa à serosa, e pode ser caracterizada por lesões alternadas. Em decorrência disto, as complicações da doença incluem fibrose intestinal, estenoses e formação de fístulas (ISKANDAR; CIOBA, 2012).

Baseando-se em tais aspectos histopatológicos, pode-se classificar o padrão anátomo-clínico da DC. A doença inflamatória sem complicações é considerada como não-estenosante/não-penetrante (inflamatória). Em casos de estreitamentos intestinais ou anorretais de repetição, a doença é classificada como estenosante. Já a doença penetrante (fistulizante) é assim caracterizada quando ocorrem fístulas intra-abdominais ou perianais, massas inflamatórias e/ou abcessos (ALMEIDA et al, 2004).

A etiopatogenia da DC, e das DII de maneira geral, ainda permanece desconhecida. No entanto, sabe-se que a doença apresenta origem multifatorial, sendo causada pela interação de fatores genéticos e ambientais, como histórico familiar, agentes infecciosos, fumo, microbiota intestinal, estilo de vida e hábitos alimentares (GUAGNOZZI et al, 2012; KEYASHIAN et al, 2012).

Outras variáveis podem conferir uma maior susceptibilidade ao aparecimento da DC na população, como, por exemplo, o *status* socioeconômico, o nível de escolaridade e a área residencial. Em adição, alterações em variáveis clínicas, englobando parâmetros bioquímicos (Proteína C-Reativa (PCR) e Albumina (Alb)), hematológicos (Velocidade de Hemossedimentação (VHS)) e antropométricos (índice de Massa Corpórea (IMC)) podem estar associadas à gravidade e agudização da doença. A análise desses fatores de risco e a frequência com que eles aparecem em pacientes atendidos ambulatorialmente é capaz de fornecer um perfil do portador da DC (LOCHS et al, 2006; ELIA et al, 2007).

Diante do exposto, o presente estudo objetivou caracterizar o perfil epidemiológico e clínico-laboratorial de pacientes ambulatoriais com diferentes formas anátomo-clínicas da DC.

2 MÉTODO

Desenho do estudo e População

Série de casos englobando 26 pacientes adultos e idosos de ambos os sexos, recrutados para este estudo com diagnóstico prévio de DC. Os pacientes foram atendidos no período compreendido entre julho e setembro de 2013 no Serviço de Gastroenterologia/Proctologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

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 tempo de diagnóstico, gênero, localização e comportamento da DC foram organizadas de acordo com a Classificação de Vienna modificado (GASCHE et al, 2000).

Como critérios de exclusão, foram dispensados da pesquisa pacientes com Retocolite Ulcerativa Inespecífica (RCUI) ou colite indeterminada; que tenham sofrido qualquer procedimento cirúrgico, devido a distúrbios gastrointestinais, em períodos recentes à entrevista; pacientes incapazes de serem submetidos à avaliação de peso e altura e indivíduos com ascite e/ou retenção hídrica. Também foram excluídos da pesquisa aqueles pacientes que não nasceram no Brasil.

Aspectos Éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco – CEP/UFPE: Parecer nº: 222/2010 / CAAE: 0223.0.172.000-10, e todos os indivíduos que foram selecionados e aceitaram participar do estudo, de acordo com os critérios de elegibilidade previamente citados, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Aspectos Epidemiológicos e Clínicos

Foram obtidas informações relativas ao gênero, idade, escolaridade e doenças associadas através da análise da ficha clínica dos pacientes. Foram levantados também 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 da Atividade da Doença de Crohn (CDAI), o qual foi utilizado para classificar a DC em remissão (CDAI<150) ou em atividade (CDAI ≥150) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE COLOPROCTOLOGIA, 2011).

Informações com relação ao tratamento medicamentoso, histórico familiar e manifestações extraintestinais também foram obtidas no momento da entrevista com os pacientes.

As medidas de peso e altura foram coletadas e mensuradas conforme a técnica recomendada por Lohman, Roche e Martorell (1991). Os participantes foram pesados utilizando-se uma balança eletrônica digital, tipo plataforma, da marca Filizola®, com capacidade máxima de 150Kg e precisão de 100g e a estatura foi medida por meio de estadiômetro acoplado à balança plataforma com capacidade para 1,90m e precisão de 1mm. Com as medidas de peso e altura foi calculado o índice de massa corporal (IMC), o qual foi classificado de acordo com os valores indicados pela Organização Mundial da Saúde (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1998).

Coletaram-se ainda dados comportamentais relativos ao uso de bebidas alcóolicas e tabaco, sendo obtidos com base em relato do próprio paciente durante a entrevista. Para fins de classificação, os indivíduos considerados alcoolistas foram aqueles que consumiram quantidades superiores a 60g/dia de etanol nos sete dias anteriores à pesquisa, os não alcoolistas foram aqueles que não fizeram uso de bebidas alcóolicas ou que ingeriram pequenas quantidades de etanol (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2011) e os ex-alcoolistas ou abstêmios foram os indivíduos que não utilizaram o álcool nos 12 meses prévios ao estudo (BERTOLOTE, 2010).

Quanto ao tabagismo, os pacientes foram classificados em tabagistas, quando relatavam que faziam uso regular de pelo menos um dos produtos do tabaco fumado, independentemente do tempo; ex-tabagistas, sendo aqueles que já fizeram uso do tabaco em períodos anteriores à pesquisa (BRASIL, 2011) e não tabagistas, aqueles indivíduos que nunca fumaram.

Estudo Bioquímico

Foram colhidos através de punção venosa à vácuo, 6mL de sangue em tubo seco com gel separador. Após a formação do coágulo, o material foi submetido à centrifugação de 1107 x g durante 5 minutos para obtenção do soro.

As análises bioquímicas foram realizadas no setor de bioquímica do laboratório de análises clínicas do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) da Universidade de Pernambuco (UPE).

A dosagem bioquímica da PCR ultrassensível (VR: 0,0 a 5,0 mg/dL) foi processada por metodologia automatizada de nefelometria e a dosagem da Alb (VR: 35 a 52g/L - 3,5 a 5,2 mg/dL) foi processada por metodologia automatizada de imunoturbidimetria, e ambas as análises foram realizadas no equipamento COBAS INTEGRA 400 PLUS da marca ROCHE®.

Com os valores séricos de PCR e Alb foi calculada a relação PCR/Alb. Segundo a relação, os pacientes foram classificados como sem risco de complicações infecciosas e inflamatórias quando a relação fosse<0,4 ou com risco quando a relação fosse ≥0,4 (CORRÊA et al, 2002).

Análise da VHS

Foram colhidos através de punção venosa à vácuo, 5mL de sangue, em tubo com anticoagulante EDTA para obtenção de sangue total. A dosagem do VHS foi realizada pela metodologia manual (método de Wintrombe) no setor de hematologia do laboratório de análises clínicas do PROCAPE/UPE. O nível de normalidade considerado para o VHS foi de 20mm/h.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram efetuadas com o SPSS versão 13.0 para *Windows* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e pelo programa Epi-Info versão 7.0.

As variáveis quantitativas contínuas foram testadas quanto ao caráter da normalidade pelo teste de *Kolmogorov Smirnov*, sendo os dados das variáveis de distribuição normal expressos como média e desvio padrão.

Na descrição das proporções, procedeu-se uma aproximação da distribuição binomial à distribuição normal pelo intervalo de confiança de 95% ($IC_{95\%}$). Diferenças significativas foram constatadas a partir da análise da sobreposição dos respectivos $IC_{95\%}$.

Para a avaliação das diferenças entre as médias foi empregado o teste "t" de *student* para dados não pareados. O nível de significância utilizado na decisão dos testes estatísticos foi de 5,0%.

3 ANÁLISE DE RESULTADOS

A amostra foi constituída por indivíduos portadores de DC com idade média de 41,3 ± 13,2 anos. A análise evidenciou uma distribuição bimodal da idade, sendo observado um pico da DC aos 40 anos e outro aos 60 anos. As frequências da distribuição relativas ao sexo foram similares, com 69,2% de pacientes do sexo feminino (n=18; $IC_{95\%}$: 48,2-85,7) e 30,8% do sexo masculino (n=8; $IC_{95\%}$: 14,3-51,8).

Os dados referentes à caracterização socioeconômica e comportamental dos pacientes analisados no estudo estão expostos na tabela 1, onde se observa que a maior parte dos sujeitos avaliados residia na Região Metropolitana do Recife (RMR) (69,2%) e havia frequentado a escola regular por mais de 8 anos (73,1%). Na análise dos fatores comportamentais foram verificadas maiores frequências de pacientes não tabagistas (73,1%) e não etilistas (84,6%).

Tabela 1 - Caracterização demográfica, socioeconômica e comportamental de pacientes ambulatoriais com DC atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE, Recife, 2015.

Variáveis	N=26	%	$IC_{95\%}$
Sexo			
Masculino	8	30,8	14,3-51,8
Feminino	18	69,2	48,2-85,7
Área Residencial			
RMR	18	69,2	48,2-85,7
Interior	5	19,2	6,5-39,3
Outras cidades	3	11,5	2,4-30,1
Escolaridade			
≤8 anos	7	26,9	11,6-47,8
>8 anos	19	73,1	52,2-88,4
Tabagismo			
Tabagista	2	7,7	0,9-25,1
Ex-tabagista	5	19,2	6,5-39,3
Não	19	73,1	52,2-88,4
Etilismo			
Ex-etilista	4	15,4	4,3-34,9
Não	22	84,6	65,1-95,6

DC=Doença de Crohn; RMR=Região Metropolitana do Recife; IC=Intervalo de Confiança.
Fonte: Dados da pesquisa (2013)

No tocante aos dados clínicos, 100,0% dos pacientes estavam em remissão da doença. O histórico familiar não foi representativo da DC na população estudada (88,5%). Exames clínicos demonstraram que as formas anátomo-clínicas da DC e as manifestações extraintestinais foram distribuídas igualitariamente, sendo 10 (38,4%) pacientes diagnosticados com DC do tipo inflamatória, 8 (30,8%) indivíduos com doença fistulizante e 8 (30,8%) com DC estenosante. O tratamento medicamentoso administrado aos pacientes foi feito a partir do uso de imunossupressores, corticoides ou anti-inflamatórios, sendo recomendados de forma isolada ou simultaneamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Caracterização clínica de pacientes ambulatoriais com DC atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE, Recife/2015.

Variáveis N=26		%	IC95%
História familiar de DC			
Sim	3	11,5	2,4-30,1
Não	23	88,5	69,8-97,5
Forma anátomo-clínica			
Inflamatória	7	26,9	11,6-47,8
Fistulizante	7	26,9	11,6-47,8
Estenosante	8	30,8	14,3-51,8
Fistulizante+Estenosante	1	3,8	0,1-19,6
Inflamatória+Fistulizante	3	11,5	2,4-30,1
Medicamentos			
Imunossupressor	10	38,5	20,2-59,4
Anti-inflamatório	4	15,4	4,3-34,9
Imunossupressor+Anti-inflamatório	7	26,9	11,6-47,8
Imunossupressor+Anti-inflamatório+Corticóide	1	3,8	0,1-19,6
Imunossupressor+Corticóide	1	3,8	0,1-19,6
Não usa	3	11,5	2,4-30,1

DC=Doença de Crohn; IC=Intervalo de Confiança.
Fonte: Dados da pesquisa (2013)

Ao analisar os valores do IMC, as frequências dos diferentes diagnósticos nutricionais a partir do parâmetro antropométrico foram similares. De acordo com os dados hematológicos e bioquímicos avaliados, houve maior frequência de indivíduos com VHS elevado (84,6%) e 100,0% dos pacientes estavam com valores normais da Alb. Segundo a relação PCR/Alb, a maioria dos indivíduos (76,9%) apresentou risco de desenvolver complicações infecciosas e inflamatórias (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização antropométrica e bioquímica de pacientes ambulatoriais com DC atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE, Recife/2015.

Variáveis	N=26	%	IC95%
IMC			
Desnutrição	3	11,5	2,4-30,1
Eutrofia	11	42,3	23,3-63,1
Excesso de peso	12	46,2	26,6-66,6
VSH			
Normal	4	15,4	4,3-34,9
Alto	22	84,6	65,1-95,6
PCR			
Normal	9	34,6	17,2-55,6
Alto	17	65,4	44,3-82,8
Albumina			
Normal	26	100,0	86,7-100,0
Relação PCR/Alb			
Com risco	20	76,9	56,3-91,0
Sem risco	6	23,1	8,9-43,6

DC=Doença de Crohn; IC=Intervalo de Confiança; IMC=Índice de massa corporal; VSH=Velocidade de Hemossedimentação; PCR=Proteína C Reativa; Alb=Albumina.

Fonte: Dados da pesquisa (2013)

Foram observadas diferenças estatisticamente significantes da relação PCR/Alb com o tempo da doença e o VHS, onde os pacientes classificados com risco de complicações infecciosas e inflamatórias apresentaram menor tempo da DC e maiores valores de VHS (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição do IMC e parâmetros clínicos e bioquímicos segundo a Relação PCR/Albumina de pacientes com DC atendidos no Hospital das Clínicas da UFPE, Recife/2015.

Variáveis	Com Risco (n=20)	Sem Risco (n=6)	p-valor*
IMC (kg/m^2)	26,1 ± 6,50	22,8 ± 3,38	0,253
Tempo da doença (anos)	7,80 ± 4,91	15,8 ± 7,17	0,004*
CDAI	52,4 ± 43,9	45,8 ± 39,1	0,744
VSH	34,7 ± 15,2	14,3 ± 8,2	0,050*

DC=Doença de Crohn; IMC=Índice de Massa Corporal; CDAI=Índice de Atividade da Doença de Crohn; VSH=Velocidade de Hemossedimentação. Teste T de *Student.**p<0,05.
Fonte: Dados da pesquisa (2013)

4 DISCUSSÃO

Estudos que avaliem o perfil epidemiológico de pacientes com DC, segundo as formas anátomo-clínicas, são escassos na literatura. De uma maneira geral, as DII acometem pessoas de diferentes classes socioeconômicas, idade e sexo (LOFTUS, 2004).

Em estudo realizado por Salviano, Burgos e Santos (2007) em Recife, com pacientes internados portadores de DC ou RCUI, foi observada uma maior frequência de homens (58,3%) na amostra avaliada. Por outro lado, na população curitibana (SILVA et al, 2010), a frequência do sexo feminino foi de 58% e em um estudo realizado no Rio de Janeiro (ELIA et al, 2007), esta frequência também foi elevada em pacientes com DII (69,8%).

No presente estudo, a distribuição percentual entre os sexos foi similar, quando avaliada pelas faixas dos respectivos $IC_{95\%}$. Apesar disso, estudos revelam que a distribuição da DC quanto ao sexo é um pouco mais dominante em mulheres (20-30%), fato que pode ocorrer como efeito da atuação de fatores hormonais no desenvolvimento da doença intestinal (RUSSEL; STOCKBRUGGER, 1996; NIV; ABIKSIS; FRASER, 1999; LOFTUS, 2004).

A distribuição bimodal da idade na DII é evento já confirmado pelos estudos relativos ao tema, sendo evidenciado um primeiro pico da doença entre os 15 e os 25 anos de idade e outro na faixa dos 50 aos 80 anos (SALVIANO; BURGOS; SANTOS, 2007; ESCOTT et al, 2009). Em virtude da composição amostral da presente investigação, a qual englobou indivíduos mais adultos, os picos encontrados da DC foram mais proeminentes em idades mais avançadas do que aquelas descritas pela literatura.

No que diz respeito à área residencial, morar na zona urbana, em cidades industrializadas, pode aumentar o risco de desenvolver DC e RCUI (SOON et al, 2012),

evento que pode explicar a maior frequência da DC em pacientes residentes da RMR no presente estudo.

Semelhante à pesquisa em questão, verifica-se que no trabalho de Salviano, Burgos e Santos (2007), a maior parte dos pacientes residia na RMR e 50% não havia cursado o 2º grau. O grau de escolaridade mais frequente também foi o ensino fundamental (37,3%) no estudo de Elia et al (2007). Vale salientar que, quando se trata de uma população de hospital universitário, a distribuição dos pacientes com DII quanto à escolaridade parece refletir mais a condição da população assistida por este tipo de instituição do que uma característica das doenças estudadas (GUIMARÃES; YOSHIDA, 2008).

Segundo a classificação de Vienna, relatada por Gasche et al (2000), as principais variáveis consideradas para a DC são: idade de início, história familiar de DII, localização, comportamento e manifestações extraintestinais.

Nesta casuística, apenas três indivíduos (11,5%) relataram histórico familiar de DC. Em outros estudos, o histórico familiar foi confirmado em 30% dos pacientes diagnosticados com DC antes dos 20 anos de idade, comparado com 18% aos 29 anos e 13% após 40 anos (VERNIER-MASSOUILLE; BALDE; SALLERON, 2008; VAN LIMBERGEN et al, 2008; SAUER; KUGATHASA, 2009).

O corticoide foi a medicação com maior administração em pacientes residentes no Rio de Janeiro, segundo estudo de Elia et al (2007), enquanto que, no presente estudo, os imunossupressores e os anti-inflamatórios também foram receitados para o tratamento. Pelo fato de todos os pacientes analisados estarem em remissão da DC, infere-se que o uso do corticoide pode ser reservado para condições de maior atividade da doença.

No que diz respeito à fase da doença, estudo de corte transversal, comparando aspectos clínicos e psicológicos de pacientes com DC e RCUI, realizado por Pelá (2007), observou que 80% dos pacientes com DC estavam com controle clínico da doença. O autor considera que esta condição pode estar relacionada ao fato de que os indivíduos acompanhados em nível ambulatorial apresentam maior estabilidade e controle clínico efetivo da doença, achados que corroboram com o estudo em questão, onde todos os pacientes analisados nesta pesquisa estavam em remissão da DC.

A fase de remissão evidenciada também pode contribuir para a manutenção de um estado nutricional predominantemente dentro dos valores de normalidade (LOCHS et al, 2006), visto o maior percentual de pacientes com eutrofia e excesso de peso, segundo o IMC. Apesar da maior parte dos estudos (GOH; O'MORAIN, 2003; LOCHS et al, 2006; FLORA;

DICHI, 2006) relatarem frequências elevadas de desnutrição em pacientes com DC, investigações mais recentes já demonstram uma alteração na composição corporal desses indivíduos, com taxas crescentes de excesso de peso e obesidade (CABRAL; CARVALHO; MISZPUTEN, 2001; NGUYEN; STEINHART, 2008; STEED; WALSH; REYNOLDS, 2009; HARTMANN; ELIAKIM; SHAMIR, 2009; ANDRADE et al, 2015).

A presença do diagnóstico nutricional de excesso de peso e obesidade ainda contribui para a exacerbação do perfil inflamatório na DC. Níveis de Interleucina-1β (IL-1β), Fator de Necrose Tumoral α (TNFα) e Interleucina-6 (IL-6) são encontrados elevados na mucosa intestinal inflamada (CABRAL; CARVALHO; MISZPUTEN, 2001).

Além disso, a IL-6 é responsável pelo aumento na síntese de proteínas plasmáticas referidas como proteínas de fase aguda positiva, como a PCR, e pela diminuição na produção de proteínas de fase aguda negativa, como a Alb (CASTELL et al, 1990; GARIBALLA; FORSTER, 2006).

De acordo com Corrêa et al (2002), embora a resposta de fase aguda não seja específica, pode ser usada na prática clínica como parte do diagnóstico, tanto na avaliação da intensidade da atividade inflamatória como na classificação de doenças inflamatórias das não-inflamatórias.

Este mesmo autor sugere a utilização da relação PCR/Alb para reconhecimento do grau de inflamação dos pacientes com DII. Por ser um método simples e de baixo custo, esse índice pode ser utilizado em substituição ao Índice de Prognóstico Inflamatório e Nutricional (IPIN), proposto por Ingenbleek e Carpentier (1985).

No presente estudo, a relação PCR/Alb pôde identificar um maior percentual de pacientes com risco de complicações infecciosas e inflamatórias (76,9%). A relação ainda foi inversamente significante para o tempo da doença e diretamente para o VHS.

Não há estudos disponíveis na literatura que fizeram uso da relação PCR/Alb em pacientes com DC. Entretanto, sugere-se que o diagnóstico mais recente da DC pode estar associado a um maior perfil inflamatório da DC por menor controle clínico. Além disso, tais mecanismos inflamatórios ainda podem elevar o VHS, refletindo o aumento de proteínas de fase aguda positiva, como a PCR (ROSA NETO; CARVALHO, 2009; CABRAL; ABBY, 2012), que também estava elevada na maior parte dos pacientes avaliados neste estudo.

Algumas limitações referentes a presente investigação merecem ser destacadas, como o delineamento do estudo, que não permite validar associação causal; o número reduzido de participantes e a falta de um grupo controle. Apesar disso, este estudo permitiu uma análise do

perfil epidemiológico e clínico-laboratorial dos pacientes atendidos no ambulatório de um hospital universitário local, fato que auxilia na decisão de condutas clínicas mais voltadas à realidade dos pacientes atendidos.

Em síntese, os pacientes ambulatoriais com DC atendidos em hospital universitário do Recife apresentaram características semelhantes às já constatadas pela literatura nacional nos indivíduos com DII. No entanto, chama-se atenção para o perfil inflamatório dos pacientes analisados, que apesar de estarem em remissão da DC, ainda assim apresentaram risco de complicações infecciosas e inflamatórias, segundo a relação PCR/Alb, fato que incentiva o uso da relação no acompanhamento clínico de tais pacientes.

EPIDEMIOLOGICAL AND LABORATORY PROFILE OF OUTPATIENTS WITH DIFFERENT CLINICAL FORMS OF CROHN'S DISEASE: CASE SERIES FROM A REGIONAL HOSPITAL AT NORTHEAST OF BRAZIL

ABSTRACT

In order to characterize the epidemiological and laboratory profile of patients with Crohn's disease (CD), this case-series was conducted, involving 26 patients treated at Hospital das Clinicas, Federal University of Pernambuco. Epidemiological, clinical and biochemical data were collected, including the C-Reactive Protein (CRP)/Albumin ratio. The sample had mean age of 41.3 ± 13.2 years and 100.0% were in remission of CD. CRP/Albumin ratio was elevated in 76.9% of the patients, especially in those with shorter duration of CD and higher values of erythrocyte sedimentation rate ($p \leq 0.05$). The patients of this study showed typical characteristics of CD and high CRP/Albumin ratio.

Keywords: Crohn's disease. Health Profile.Albumins.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos pacientes e suas famílias, cuja colaboração e compreensão fizeram este trabalho possível. Esta pesquisa foi apoiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil. Também agradecemos ao Departamento de Gastroenterologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Pernambuco, onde foram realizados os experimentos.

REFERENCIAS

ALMEIDA, S. et al. Diferentes subtipos clinicopatológicos da Doença de Crohn podem ser definidos por variantes dos genes NOD2/CARD15 e TNF alfa. **Jornal Português de Gastrenterologia,** v. 11, p.302-310, 2004.

ANDRADE, M. I. S. et al. Excessive weight – muscle depletion paradox and cardiovascular risk factors in outpatients with inflammatory bowel disease. **Arquivos de Gastroenterologia,** São Paulo, v. 52, n. 1, p.37-45, 2015.

BERTOLOTE, J. M. Secretaria Nacional de Políticas sobre Drogas. **Glossário de álcool e drogas**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Organização Pan Americana de Saúde (OPAS). **Pesquisa especial de tabagismo - PETab**: relatório Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011.

CABRAL, M. G.; ABBY, F. Diagnóstico das doenças inflamatórias intestinais. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto,** v. 11, n. 4, p. 17-21, 2012.

CABRAL, V. L. R.; CARVALHO, L.; MISZPUTEN, S. J. Importância da albumina sérica na avaliação nutricional e de atividade inflamatória em pacientes com Doença de Crohn. **Arquivos de Gastroenterologia, São Paulo,** v. 38, p. 104-108, 2001.

CASTELL, J. V. et al. Acute–phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin–6. **Hepatology,** v. 12, p. 1179-86, 1990.

CORRÊA, C. R. et al. Comparação entre a relação PCR/albumina e o índice prognóstico inflamatório nutricional (IPIN). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial,** Rio de Janeiro, v. 38, n. 3, p. 183-190, 2002.

ELIA, P. P. et al. Análise descritiva dos perfis social, clínico, laboratorial e antropométrico de pacientes com Doenças Inflamatórias Intestinais, internados no Hospital Universitário Clementino Grafa Filho, Rio de Janeiro**. Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 332-339, 2007.

ESCOTT, G. M. et al. Prevalência de anemia nas doenças inflamatórias intestinais. **Ciência em Movimento,** Porto Alegre, v.11, n.1, p.75-80, 2009.

FLORA, A. P. L.; DICHI, I. Aspectos atuais na terapia nutricional da doença inflamatória intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v. 21, n. 2, p. 131-137, 2006.

HARTMANN, C.; ELIAKIM, R.; SHAMIR, R. Nutritional status and nutritional therapy in inflammatory bowel diseases. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 21, p. 2570-78, 2009.

INGENBLEEK, Y.; CARPENTIER, Y. A. A prognostic inflammatory and nutritional index scoring critically ill patients. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research,** v. 55, p. 91-101, 1985.

ISKANDAR, H. N.; CIORBA, M. A. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. **Translational Research**, v. 159, n. 4, p. 313-325, 2012.

GARIBALLA, S.; FORSTER, S. Effects of acute-phase response on nutritional status and clinical outcome of hospitalized patients. **Nutrition**, v. 22, n. 7-8, p. 750-57, 2006.

GASCHE, C. et al. A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 6, p. 8, 2000.

GRIFFITHS, A. M. Specificities of inflammatory bowel disease in childhood. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, p. 509–523, 2004.

GOH, J.; O'MORAIN, C. A. Review article: nutrition and adult inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 17, n. 3, p. 307-320, 2003.

GUAGNOZZI, D. et al. Nutritional treatment in inflammatory bowel disease. An update. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 104, n. 9, p. 479-88, 2012.

GUIMARÃES, L. P. M.; YOSHIDA, E. M. P. Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa Inespecífica: Alexitimia e adaptação. **Psicologia: Teoria e Prática**, São Paulo, v. 10, p. 52-63, 2008.

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

KEYASHIAN, K. et al. Management of inflammatory bowel disease: past, present and future. **Expert Review of Clinical Immunology**, v. 8, n. 4, p. 303-5, 2012.

LAASS, M. W.; ROGGENBUCK, D.; CONRAD, K. Diagnosis and classification of Crohn's disease. **Autoimmunity Reviews,** v.13, n.4-5, p.467-71, 2014. doi: 10.1016/j.autrev.2014.01.029.

LENNARD-JONES, J. E. Classification of inflammatory bowel disease. **Scandinavian Journal Gastroenterology Supplements**, v. 170, supl. 2, 1989.

LOCHS, H. et al. ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Gastroenterology. **Clinical Nutrition**, v. 25, p. 260-274, 2006.

LOFTUS, E. V. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v. 126, p. 1504–17, 2004.

LOHMAN, T. G.; ROCHE, A. F.; MARTORELL, R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign: **Human Kinetics Books**, 1991.

NGUYEN, G. C.; STEINHART, A. H. Nationwide patterns of hospitalizations to centers with high volume of admissions for inflammatory bowel disease and their impact on mortality. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.14, p.1688-94, 2008.

NIV, Y.; ABIKSIS, G.; FRASER, G. M. Epidemiology of Crohn's disease in Israel: a survey of Israeli kibbutz settlements. **The American Journal of Gastroenterology**, v.94, p.2961-5, 1999.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS. Department of Mental Health and Substance Abuse.Global status report on alcohol and health. Geneva: **World Health Organization**. 2011.

_____. Obesity: preventing and managing the global epidemic of obesity: report of a WHO consultation on obesity. Geneva: **World Health Organization**. 1998.

PELÁ, E. C. B. Estresse e modos de enfrentamento em portadores de doenças inflamatórias intestinais. Dissertação de Mestrado. 2007.

ROSA NETO, N. S.; CARVALHO, J. F. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 49, n. 4, p. 413-30, 2009.

RUSSEL, M. G.; STOCKBRUGGER, R.W. Epidemiology of inflammatory bowel disease, an update. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 31, p. 417-27, 1996.

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. **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 99-106, 2007.

SAUER, C. G.; KUGATHASA, S. Pediatric inflammatory bowel disease: highlighting pediatric differences in IBD. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 38, p. 611–628, 2009.

SAWCZENKO, A.; SANDHU, B. Presenting features of inflammatory bowel diseases in children. **Archives of Disease Childhood**, v. 88, p. 995–1000, 2003.

SILVA, A. F. et al. Relação entre estado nutricional e atividade inflamatória em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, São Paulo, v. 23, n. 3, p. 154-158, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE COLOPROCTOLOGIA, Colégio Brasileiro de Cirurgia Digestiva, Sociedade Brasileira de Patologia, Colégio Brasileiro de Radiologia. Intestinal Crohn's disease: management. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 57, n. 1, p. 10-13, 2011.

STEED, H.; WALSH, S.; REYNOLDS, N. A brief report of the epidemiology of obesity in the inflammatory bowel disease population of Tayside, Scotland. **Obesity Facts**, v. 2, n. 6, p. 370–372, 2009.

SOON, I. S. et al. The relationship between urban environment and the inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. **BMC Gastroenterology**, v. 12, p. 51, 2012.

VAN LIMBERGEN, J. et al. Definition of phenotypic characteristics of childhood-onset inflammatory bowel disease. **Gastroenterology,** v. 135, p. 1114–22, 2008.

VERNIER–MASSOUILLE, G.; BALDE, M.; SALLERON, J. Natural history of pediatric Crohn's disease. A population-based cohort study. **Gastroenterology,** v. 135, p. 1106–13, 2008.

Submetido em: 25/05/2016
Aceito para publicação em: 20/08/2016

ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

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 – 349873
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