

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES**  
**Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde**

Renan Garcia Gomes

**POLIMORFISMO GENÉTICO, EXPRESSÃO DE mRNA NA MUCOSA  
INTESTINAL E NÍVEIS CIRCULANTES DA MOLÉCULA HLA-G E  
CITOCINAS IL-10, TNF, E IFN- $\gamma$  EM PACIENTES COM  
DOENÇA DE CROHN E RETOCOLITE ULCERATIVA**

**RECIFE**

**2018**

RENAN GARCIA GOMES

POLIMORFISMO GENÉTICO, EXPRESSÃO DE mRNA NA MUCOSA  
INTESTINAL E NÍVEIS CIRCULANTES DA MOLÉCULA HLA-G  
E CITOCINAS IL-10, TNF, E IFN- $\gamma$  EM PACIENTES COM  
DOENÇA DE CROHN E RETOCOLITE ULCERATIVA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em  
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde, do  
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo  
Cruz para obtenção do título de doutor em  
Ciências.

Área de concentração Imunopatogênese de  
doenças crônicas, infecciosas e parasitárias

Orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

RECIFE

2018

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- G633p      Gomes, Renan Garcia.  
              Polimorfismo genético, expressão de mRNA na mucosa intestinal e níveis circulantes da molécula HLA-G e citocinas IL-10, TNF, e IFN- $\gamma$  em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa / Renan Garcia Gomes. - Recife: [s.n.], 2018.  
              118 p. : ilus., tab., graf., 30 cm.
- Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2018.  
              Orientadora: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva.
1. Doenças Inflamatórias Intestinais. 2. Colite Ulcerativa. 3. Doença de Crohn. 4. Antígenos HLA-G. 5. Interleucina-10. 6. Fator de Necrose Tumoral alfa. 7. Interferon gama. I. Silva, Norma Lucena Cavalcanti Licínio da. II. Título.

---

CDU 577.27

RENAN GARCIA GOMES

POLIMORFISMO GENÉTICO, EXPRESSÃO DE mRNA NA MUCOSA  
INTESTINAL E NÍVEIS CIRCULANTES DA MOLÉCULA HLA-G  
E CITOCINAS IL-10, TNF, E IFN- $\gamma$  EM PACIENTES COM  
DOENÇA DE CROHN E RETOCOLITE ULCERATIVA

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em  
Biociências e Biotecnologia em Saúde, do  
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo  
Cruz para obtenção do título de doutor em  
Ciências.

Aprovado em: 26/07/2018

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva  
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr. Eduardo Antônio Donadi  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

---

Dra. Vláudia Maria Assis Costa  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos  
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

---

Dra. Milena de Paiva Cavalcanti  
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho a Fernanda Lucena (*in memoriam*),  
amada e valorosa amiga. Sua carta enfim chegou.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Sheila e Saulo por todo o carinho, dedicação, apoio, paciência, e investimento na minha formação básica e profissional.

Agradeço a Dra. Norma Lucena, por todos esses anos de aprendizado, parceria e confiança. Minha mentora profissional.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório Sávio, Fernanda, Renata e Rossana pelas trocas e discussões. Minhas mãos e cabeças extras.

Agradeço a Lais pela colaboração e empenho no desenvolvimento deste projeto desde seu estágio inicial. Minha sequenciadora de primeira.

Agradeço a Mauro por toda a ajuda oferecida nesta reta final de conclusão de análises. Meu anotador e leitor oficial.

Agradeço aos meus queridos (as) Elisa, Ligia, Sávio, Heytor, Veruska e Leandro, amigos que ganhei nesta caminhada na pós-graduação, pelo apoio em todos os momentos de alegrias, certezas e incertezas vividos durante esses anos. Minhas obras-primas.

Agradeço a Dr. Carlos Brito e Dra. Valéria Martinelli, médicos responsáveis pelo atendimento clínico no ambulatório do Hospital das Clínicas e a todos os portadores de Retocolite Ulcerativa e Doença de Crohn que aceitaram contribuir com este estudo.

Agradeço ao Instituto de Hemoterapia do Nordeste (IHENE) e todos os doadores de sangue por terem nos recebido e aceitado participar deste trabalho.

Agradeço as Dras. Cássia e Viviane, do Núcleo de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz-PE, por todo o apoio técnico-científico nos sequenciamentos e qPCR.

Agradeço a Gabriel Faienstein pelo suporte e impulso durante esses anos. Meu companheiro nesta jornada.

E obrigado a Deus, por ter guiado meus passos até aqui.

GOMES, Renan Garcia. **Polimorfismo genético, expressão de mRNA na mucosa intestinal e níveis circulantes da molécula HLA-G e citocinas IL-10, TNF, e IFN- $\gamma$  em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa.** 2018. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

## RESUMO

O HLA-G é uma molécula imunomoduladora, cuja variação nos sítios das regiões 5' reguladora (5'URR) e 3' não-traduzida (3'UTR) foram associadas a diversas patologias, incluindo doenças inflamatórias. A Doença de Crohn (DC) e a Retocolite Ulcerativa (RCU) são caracterizadas por processos inflamatórios crônicos no trato gastrointestinal, com aumento de TNF e IFN- $\gamma$  em DC e de IL-10 em RCU. Neste estudo, foram avaliados pacientes com DC e RCU quanto a: (i) frequência de polimorfismos nas regiões 5'URR e 3'UTR do gene *HLA-G*, região promotora do *TNF* e *IL10* e íntron 1 do *IFNG*; (ii) influência destes *loci* na expressão de mRNA de mucosa e proteína no plasma; (iii) avaliação entre a expressão das moléculas em relação ao grau de inflamação de mucosa. O estudo genético foi realizado por sequenciamento de DNA de 71 pacientes com DC, 140 com RCU e 364 indivíduos saudáveis e o estudo de expressão na mucosa por qPCR em 28 pacientes com DC e 69 com RCU. Em RCU, o alelo *TNF*-863A foi associado ao risco à doença ( $P=0,025$ ), e a expressão tecidual de *TNF* foi associada ao grau de inflamação de mucosa em estudos não pareados ( $P=0,061$ ) e em pareados ( $P=0,005$ ). Em DC, a presença do alelo *IL10*-1082A no modelo dominante aumenta em 4x o risco para DC ( $P=0,014$ ). O microssatélite *IFNG*+875(CA)<sub>n</sub> em homozigose está relacionado a proteção a DC e RCU, sendo a expressão de mRNA de *IFNG* maior nos pacientes com DC ( $P=0,028$ ), porém a expressão em pacientes heterozigotos é semelhante em ambas doenças. Em relação ao HLA-G, 10 sítios da região 5'URR estão associados a proteção à RCU, dos quais o haplótipo -762T-T, -716G-G e -689G-G apresentaram menor expressão de *HLA-G5* ( $P=0,036$ ). Nos pacientes com DC foi observado menor frequência do genótipo +2960(14pb)In-In da região 3'UTR ( $P=0,005$ ). A expressão de mRNA de *HLA-G* no estudo pareado é maior nas amostras mais inflamadas em DC e RCU. Diferentes variantes genéticas estão associadas ao desenvolvimento do processo inflamatório crônico de mucosa na DC e RCU.

**Palavras Chaves:** Doenças Inflamatórias Intestinais. Colite Ulcerativa. Doença de Crohn. Antígenos HLA-G. Interleucina-10. Fator de Necrose Tumoral alfa. Interferon gama.

GOMES, Renan Garcia. **Genetic polymorphism, mRNA expression in the intestinal mucosa and circulating levels of the HLA-G molecule and IL-10, TNF, and IFN- $\gamma$  cytokines in patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis.** 2018. Thesis (Doctorate in Biosciences and Biotechnology in Health) - Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2018.

## ABSTRACT

HLA-G is an immunomodulatory molecule whose variation in the 5' regulatory (5'URR) and 3' untranslated (3'UTR) regions have been associated with several pathologies, including inflammatory diseases. Crohn's Disease (CD) and Ulcerative Colitis (UC) are characterized by chronic inflammatory processes in the gastrointestinal tract, with increased TNF and IFN- $\gamma$  in CD and IL-10 in UC. In this study, patients with CD and UC were evaluated for: (i) polymorphisms frequency in the 5'URR and 3'UTR regions of the *HLA-G* gene, *TNF* and *IL10* promoter and *IFNG* intron 1 region; (ii) influence of these loci on mRNA expression and plasma protein levels; (iii) evaluation of the molecules expression in relation to the degree of mucosal inflammation. The genetic study was performed by DNA sequencing of CD 71 patients, 140 with UC and 364 healthy individuals; and the study of mucosal expression by qPCR in 28 CD patients and 69 with UC. In UC, the TNF-863A allele was associated with disease risk ( $P=0.025$ ), and tissue TNF expression was associated with the degree of mucosal inflammation in non-paired studies ( $P=0.061$ ) and in paired studies ( $P=0.005$ ). In CD, the presence of the IL10-1082A allele in the dominant model increases the risk for CD by 4x ( $P=0.014$ ). The homozygous IFNG+ 875(CA) microsatellite is related to protection against CD and UC, with *IFNG* mRNA expression being higher in patients with CD ( $P=0.028$ ), but the expression in heterozygous patients is similar in both diseases. In relation to HLA-G, 10 sites in the 5'URR region are associated with UC protection, of which the haplotype -762T-T, -716G-G and -689G-G presented lower *HLA-G5* expression ( $P=0.036$ ). In patients with CD, a lower frequency of the +2960(14pb)In-In genotype of the 3'UTR region ( $P=0.005$ ) was observed. The expression of *HLA-G* mRNA in the paired study is greater in the more inflamed samples in CD and UC. Different genetic variants are associated with the development of chronic inflammatory process of mucosa in CD and UC.

**Keywords:** Inflammatory Bowel Diseases. Colitis, Ulcerative. Crohn Disease. HLA-G Antigens. Interleukin-10. Tumor Necrosis Factor-alpha. Interferon-gamma.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Primeira descrição da estrutura do gene HLA-6.0.....	17
<b>Figura 2-</b> Isoformas do HLA-G.....	18
<b>Figura 3-</b> Estrutura genética do HLA-G.....	19
<b>Figura 4-</b> Sítio polimórficos da região 3' não-traduzida do gene <i>HLA-G</i> .....	20
<b>Figura 5-</b> Sítio polimórficos observados na Região 5'URR do gene <i>HLA-G</i> de sequencias disponíveis na base de dados 1000 genomes.....	23
<b>Figura 6-</b> Sítio polimórficos da região promotora do gene <i>TNF</i> .....	33
<b>Figura 7-</b> Sítio polimórficos da região promotora do gene <i>IFNG</i> .....	34
<b>Figura 8-</b> Sítio polimórficos da região promotora do gene <i>IL10</i> .....	34
<b>Figura 9-</b> Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da região 5' reguladora do gene <i>HLA-G</i> .....	40
<b>Figura 10-</b> Cromatogramas do sequenciamento da região 5' reguladora do gene <i>HLA-G</i> .....	41
<b>Figura 11-</b> Comparação entre grau de inflamação intestinal e expressão de mRNA de <i>HLA-G5</i> em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa.....	60
<b>Figura 12-</b> Comparação entre a expressão de mRNA de <i>HLA-G5</i> na mucosa intestinal em relação a haplótipos em homozigose da região 5'URR do gene <i>HLA-G</i> em pacientes com Retocolite Ulcerativa.....	61
<b>Figura 13-</b> Comparação entre grau de inflamação intestinal e expressão de mRNA de <i>TNF</i> em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa.....	65
<b>Figura 14-</b> Comparação dos níveis circulantes de TNF entre pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa.....	67
<b>Figura 15-</b> Comparação entre grau de inflamação intestinal e expressão de mRNA de <i>IL10</i> em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa.....	69
<b>Figura 16-</b> Comparação dos níveis circulantes de IL-10 entre pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa.....	70
<b>Figura 17-</b> Comparação entre genótipos dos sítios +874T/A e +875(CA) <sub>n</sub> do gene <i>IFNG</i> e os níveis de IFN- $\gamma$ circulante em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite ulcerativa.....	73
<b>Figura 18-</b> Comparação entre genótipos dos sítios +874T/A e +875(CA) <sub>n</sub> do gene <i>IFNG</i> e a expressão de <i>IFNG</i> na mucosa intestinal de pacientes com Doença de Crohn e Retocolite ulcerativa.....	75
<b>Figura 19-</b> Comparação entre o grau de inflamação intestinal e a expressão de mRNA de <i>IFNG</i> na mucosa de pacientes com Doença de Crohn e Retocolite ulcerativa.....	76

<b>Figura 20-</b> Comparação entre grau de inflamação intestinal e expressão de mRNA de <i>HLA-G5</i> em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal.....	77
<b>Figura 21-</b> Níveis de proteína HLA-G intestinal em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal .....	79
<b>Figura 22-</b> Comparação entre o grau de inflamação intestinal e os níveis de proteína HLA-G em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal.....	80
<b>Figura 23-</b> Comparação entre os graus de inflamação intestinal e os níveis de expressão de mRNA de <i>TNF</i> e <i>IL10</i> em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal.....	81
<b>Figura 24-</b> Análises de correlação entre a expressão de mRNA de <i>HLA-G5</i> , <i>TNF</i> e <i>IL10</i> e níveis globais de proteína HLA-G de acordo com o tipo de doença, Retocolite Ulcerativa e Doença de Crohn, e o grau de inflamação na mucosa intestinal .....	82

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1-</b> Sítios de variação da região 5'URR do gene <i>HLA-G</i> .....	22
<b>Quadro 2-</b> Condições da reação e ciclagem para amplificação da sequência 5'Reguladora do gene <i>HLA-G</i> .....	40
<b>Quadro 3-</b> Lista de iniciadores utilizados na amplificação e sequenciamento da região 5'reguladora do gene <i>HLA-G</i> .....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Distribuição alélica e genotípica dos sítios polimórficos da região 5'URR do gene <i>HLA-G</i> em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil .....	50
<b>Tabela 2-</b> Distribuição alélica e genotípica dos sítios polimórficos da região 3'UTR do gene <i>HLA-G</i> em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil .....	55
<b>Tabela 3-</b> Distribuição haplotípica da região 3'UTR do gene <i>HLA-G</i> em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil .....	56
<b>Tabela 4-</b> Comparação dos sítios polimórficos da região 3'UTR do gene <i>HLA-G</i> em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite ulcerativa em Recife, Brasil .....	58
<b>Tabela 5-</b> Distribuição alélica e genotípica dos sítios polimórficos da região promotora do gene <i>TNF</i> em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil .....	64
<b>Tabela 6-</b> Comparação entre genótipos do gene <i>TNF</i> com a expressão de mRNA na mucosa intestinal e com a proteína TNF no plasma de pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa.....	66
<b>Tabela 7-</b> Distribuição alélica e genotípica dos sítios polimórficos da região promotora do gene <i>IL10</i> em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil .....	68
<b>Tabela 8-</b> Comparação entre genótipos do gene <i>IL10</i> com a expressão de mRNA na mucosa intestinal e com a proteína IL-10 e no plasma de pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa.....	69
<b>Tabela 9-</b> Distribuição alélica e genotípica dos sítios polimórficos do íntron 1 do gene <i>IFNG</i> em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil.....	72

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'URR	Região 5' reguladora
3'UTR	Região 3' não-traduzida
APC's	Células apresentadoras de antígeno
BeWo	Células de linhagem de coriocarcinoma
B-LCL	Linhagem de células linfoblastóides B
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CIITA	Transativador de classe II
Cq	Ciclo de quantificação
CRE	Elemento de resposta ao cAMP
CtBP-1/2	Proteína de ligação c-terminal 1 ou 2
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais
DM-1	Diabetes mellitus tipo 1
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxinucleotídeos
EM	Algoritmo de maximização de expectativa
EnhA	<i>Enhancer A</i>
GAS	Sítio de ativação por interferon- $\gamma$
HCl	Ácido clorídrico
HCMV	Citomegalovírus humano
HC-UFPE	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
HCV	Vírus da Hepatite C
HDAC1	Histona desacetilase 1
HE	Hematoxilina-eosina
HIV-1	Vírus da imunodeficiência humana 1
HLA-G	Antígeno leucocitário humano G
HSE	Elemento de choque térmico
HSF1	Fator de choque térmico 1
IFNG	Interferon-gama
IHENE	Instituto de Hemoterapia do Nordeste
IL-10	Interleucina-10
ILT-2	Transcrito semelhante à imunoglobulina

IMGT/HLA	<i>International immunogenetics database</i>
IRF-1	Fator regulatório de interferon-gama
ISRE	Elemento de resposta ao estímulo de interferon
KCl	Cloreto de potássio
KIR2DL4	<i>Killer cell immunoglobulin-like receptor</i>
LCR	Região de Controle de Locos
LES	Lúpus eritematoso sistêmico
LINE 1	Elemento longo intercalado 1
LPS	Lipopolissacarídeo
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA	RNA mensageiro
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for biotechnology information</i>
Células NK	Células Matadoras naturais
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PR	Receptor de progesterona
PRE	Elemento de resposta a progesterona
qPCR	PCR quantitativa ou PCR em tempo real
RCU	Retocolite Ulcerativa
RNA	Ácido ribonucleico
RRBP-1	Proteína de ligação ao elemento responsivo a Ras 1
RRE	Elemento de resposta a Ras
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único
SNV	Variação de nucleotídeo único
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
T <sub>m</sub>	Temperatura de dissociação
TNF	Fator de necrose tumoral
T <sub>reg</sub>	Células T reguladoras

## SUMÁRIO

<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	16
<b>1.1 Descoberta do HLA-G</b> .....	16
<b>1.2 Estrutura gênica do <i>HLA-G</i></b> .....	17
<u>1.2.1 Região codificadora</u> .....	18
<u>1.2.2 Região 3' não traduzida</u> .....	20
<u>1.2.3 Região 5' reguladora</u> .....	21
<b>1.3 Expressões fisiológica e patológica de HLA-G</b> .....	25
<u>1.3.1 Função inibitória do HLA-G</u> .....	25
<u>1.3.2 Expressão de HLA-G no câncer</u> .....	26
<u>1.3.3 Expressão de HLA-G em infecções</u> .....	27
<u>1.3.4 Expressão de HLA-G em doenças autoimunes</u> .....	28
<b>1.4 Doenças Inflamatórias Intestinais</b> .....	29
<u>1.4.1 Patogenia das Doenças Inflamatórias Intestinais</u> .....	30
1.4.1.1 Fatores ambientais .....	30
1.4.1.2 Fatores genéticos .....	30
1.4.1.3 Fatores imunológicos .....	31
<b>1.5 Citocinas</b> .....	31
<u>1.5.1 Fator de Necrose Tumoral</u> .....	32
<u>1.5.2 Interferon-<math>\gamma</math></u> .....	33
<u>1.5.3 Interleucina-10</u> .....	34
<b>1.6 Justificativa</b> .....	35
<b>2 OBJETIVO</b> .....	36
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	36
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	36
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	37
<b>3.1 Avaliação do grau de inflamação</b> .....	37
<b>3.2 Procedimentos laboratoriais</b> .....	38
<u>3.2.1 Separação de células periféricas mononucleadas</u> .....	38
<u>3.2.2 Extração de DNA genômico</u> .....	38
<u>3.2.3 Padronização da reação de amplificação e análise dos polimorfismos da região 5'URR do gene <i>HLA-G</i></u> .....	39

<u>3.2.4 Análise de polimorfismo das regiões reguladoras dos genes <i>HLA-G</i>, <i>TNF</i>, <i>IL10</i> e <i>IFNG</i></u>	41
<u>3.2.5 Extração de RNA</u>	43
<u>3.2.6 Síntese de cDNA</u>	43
<u>3.2.7 Estudo de expressão gênica de <i>HLA-G</i>, <i>TNF</i>, <i>IL10</i> e <i>IFNG</i></u>	43
<u>3.2.8 Quantificação da Proteína HLA-G em cortes histológicos</u>	44
<u>3.2.9 Detecção de HLA-G solúvel</u>	45
<u>3.2.10 Detecção das citocinas TNF, IL-10 e IFN-<math>\gamma</math> circulantes</u>	46
<b>3.3 Análise estatística</b>	46
<u>3.3.1 Dados de variabilidade genética</u>	46
<u>3.3.2 Dados de expressão de mRNA e Proteínas na mucosa intestinal</u>	46
<b>4 RESULTADOS</b>	48
<b>4.1 Perfil dos pacientes com DII no estado de Pernambuco</b>	48
<b>4.2. Estudo do polimorfismo do gene <i>HLA-G</i> e da expressão da molécula HLAG</b>	48
<u>4.2.1 Variabilidade genética da região 5'URR do gene <i>HLA-G</i></u>	48
<u>4.2.2 Variabilidade genética da região 3'UTR no gene <i>HLA-G</i></u>	49
<u>4.2.3 Expressão de <i>HLA-G</i> na mucosa intestinal de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</u>	59
<u>4.2.4. Nível de HLA-G solúvel (sHLA-G) circulante em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</u>	62
<b>4.3 Estudo da região promotora do gene <i>TNF</i> e expressão de TNF em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</b>	63
<u>4.3.1 Variabilidade genética da região promotora no gene <i>TNF</i></u>	63
<u>4.3.2 Expressão de TNF na mucosa intestinal de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</u>	64
<u>4.3.3 Nível de TNF circulante em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</u>	65
<b>4.4 Estudo da região promotora do gene <i>IL10</i> e expressão de IL-10 em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</b>	66
<u>4.4.1 Variabilidade genética da região promotora no gene <i>IL10</i></u>	67
<u>4.4.2 Expressão de <i>IL10</i> na mucosa intestinal de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</u>	68
<u>4.4.3 Nível de IL-10 circulante em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</u>	70
<b>4.5 Estudo do íntron 1 do gene <i>IFNG</i> e expressão de IFN-<math>\gamma</math> em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</b>	71
<u>4.5.1 Variabilidade genética da região do íntron 1 do gene <i>IFNG</i></u>	71



<u>4.5.2 Nível de IFN-<math>\gamma</math> circulante em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</u> .....	73
<u>4.5.3 Expressão de <i>IFNG</i> na mucosa intestinal de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</u> .....	74
<u>4.5.4 Correlação entre IFN-<math>\gamma</math> circulante e expressão de mRNA na mucosa intestinal de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</u> .....	74
<u>4.5.5 Expressão de <i>IFNG</i> em lesão de mucosa intestinal em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</u> .....	75
<b>4.6 Expressão de <i>HLA-G</i>, <i>TNF</i> e <i>IL10</i> em amostras pareadas na lesão de mucosa intestinal de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal</b> .....	76
<u>4.6.1 Expressão de mRNA de <i>HLA-G</i> em lesão de mucosa intestinal</u> .....	76
<u>4.6.2 Expressão da proteína HLA-G em lesão de mucosa intestinal</u> .....	77
<u>4.6.3 Expressão de mRNA de <i>TNF</i> e <i>IL10</i> em lesão de mucosa intestinal</u> .....	78
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	83
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	95
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	96
<b>APÊNDICE A - MANUSCRITO PUBLICADO</b> .....	116
<b>APÊNDICE B - MANUSCRITO SUBMETIDO</b> .....	117
<b>ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b> .....	118

## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

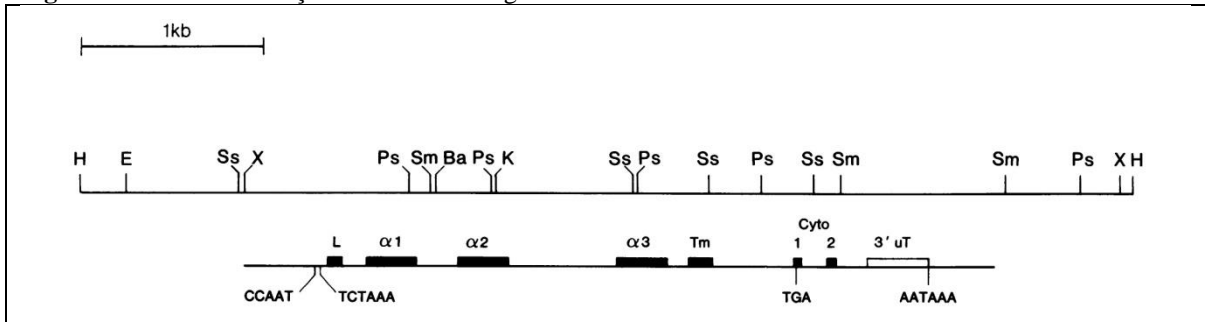
O Antígeno Leucocitário Humano (HLA-G) faz parte do conjunto de genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), sendo o MHC subdividido, de acordo com sua função, em moléculas de classe I, classe II e classe III. O HLA-G é um HLA de classe Ib, pois possui estrutura molecular similar aos demais HLA's de classe I, porém não atua na apresentação de antígenos ao sistema imunológico. Exercendo função antagônica, o HLA-G atua na supressão de células de defesa (CAROSELLA et al., 2008b).

Além de atuar na modulação da resposta imunológica, o HLA-G difere em relação aos demais HLA's de classe I por apresentar baixa variabilidade proteica, sete isoformas da proteína, cauda citoplasmática reduzida e expressão restrita a poucos tecidos (DONADI et al., 2011).

### 1.1 Descoberta do HLA-G

Em 1987, Geraghty et al. descreveram um fragmento de 6kb entre sítios de restrição da enzima *HindIII* isolado de uma biblioteca genômica preparada a partir de células de linhagem linfóide B (B-LCL), que então foi nomeado HLA-6.0, e era homólogo aos HLA-A, HLA-B e HLA-C (Figura 1). As moléculas dos HLA's são divididas estruturalmente em três regiões: (1) porção extracelular com os domínios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  e  $\beta$ -microglobulina; (2) região hidrofóbica com 26 aminoácidos transmembrana; (3) e a região intracelular composta por 30 aminoácidos. Esse novo HLA possuía essa estrutura, diferindo na cauda citoplasmática que possui apenas seis aminoácidos devido a um códon de parada prematuro na sequência da tradução da proteína (GERAGHTY; KOLLER; ORR, 1987).

O HLA-G foi primeiramente detectado expresso no tecido ocular de feto humano (SHUKLA et al., 1990), trofoblastos de placenta saudável e células de linhagem de coriocarcinoma (ELLIS; PALMER; MCMICHAEL, 1990; KOVATS et al., 1990). Ainda foi observado que o HLA-G estava altamente expresso no primeiro trimestre da gravidez e estava reduzido no terceiro trimestre (KOVATS et al., 1990); que apresentava poucos polimorfismos na região codificadora do gene em células de linhagem de coriocarcinoma (BeWo) e de células linfóide (B-LCL), sugerindo que o HLA-G não estaria envolvido com a resposta imunitária ao feto, pois a sequência de aminoácidos é muito conservada para executar esta função (ELLIS; PALMER; MCMICHAEL, 1990). A partir disso, diversos estudos foram realizados com a intenção de compreender a função do HLA-G durante a gestação.

**Figura 1-** Primeira descrição da estrutura do gene HLA-6.0

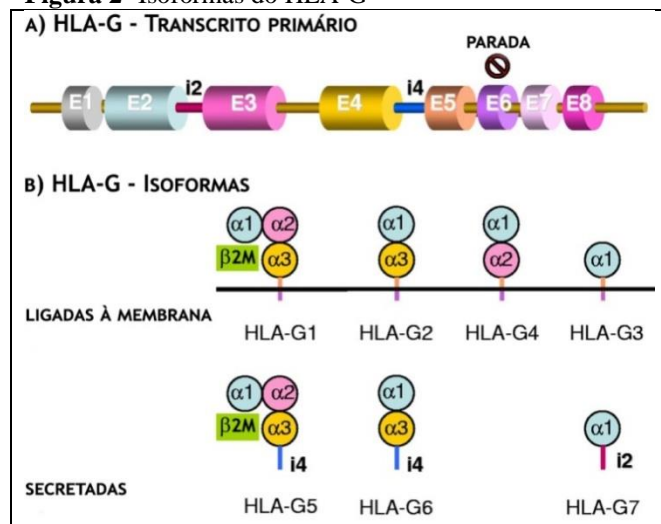
**Fonte:** Geraght, Koller e Orr (1987).

**Legenda:** L, peptídeo líder.  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ , domínio extracelular da proteína. Tm, região transmembrana. Cyto, cauda citoplasmática. 3' uT, região 3' Não-traduzida. Na parte superior são sítios de ligação de enzimas de restrição: Ba= BamHI. H= HindIII. Ps= PstI. Ss= SstI. Sm= SmaI. X= XbaI.

## 1.2 Estrutura gênica do HLA-G

O gene *HLA-G* está localizado no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3), com 4.144 nucleotídeos de extensão, destes, 1.017 correspondem a sequência que codifica a proteína completa de 338 aminoácidos, além da região 5' URR (do inglês, 5' *Upstream Regulator Region*) com 1.500pb e a 3' UTR (do inglês, 3' *untranslated region*) com 383 nucleotídeos (CASTELLI et al., 2014a). O transcrito primário sofre processamento (do inglês, *splicing*) alternativo gerando RNA's mensageiros (mRNA) que codificam sete diferentes isoformas, sendo quatro delas ligadas à membrana plasmática (HLA-G1, -G2, -G3 e -G4) e três de proteínas secretadas (HLA-G5, -G6 e -G7) pelas células (DONADI et al., 2011). As isoformas de membrana podem ainda ser alvo de clivagem proteolítica por metaloproteinase, tornando-se solúvel e permanecendo funcional (PARK et al., 2004). As proteínas completas HLA-G1 (39kDa) e -G5 (37kDa) são heterodímeros ligadas à  $\beta$ -microglobulina, que auxilia na sustentação estrutural da molécula.

A isoforma HLA-G1 contém todos os domínios da proteína,  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ , e  $\alpha 3$ , além da região transmembrana e da cauda citoplasmática, sendo estas responsáveis pela fixação da molécula na célula (Figura 2); sua contra parte solúvel é o HLA-G5 que, devido a permanência do íntron-5 no processamento do mRNA, possui um códon de terminação prematuro, não traduzindo a região transmembrana nem a cauda citoplasmática. Situação similar é observada nas isoformas HLA-G2 (membrana) e HLA-G6 (solúvel) que possuem os domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 3$  da proteína; e nas isoformas G3 (membrana) e G7 (solúvel) que possuem apenas o domínio  $\alpha 1$ , porém neste caso é devido a permanência do íntron-3 no processamento do mRNA. A isoforma HLA-G4 (membrana) possui os domínios  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$  da proteína, e ainda não é conhecida a forma solúvel correspondente (CAROSELLA et al., 2008b; CASTELLI et al., 2014a; DONADI et al., 2011).

**Figura 2-** Isoformas do HLA-G

**Fonte:** Carosella et al. (2008, tradução nossa).

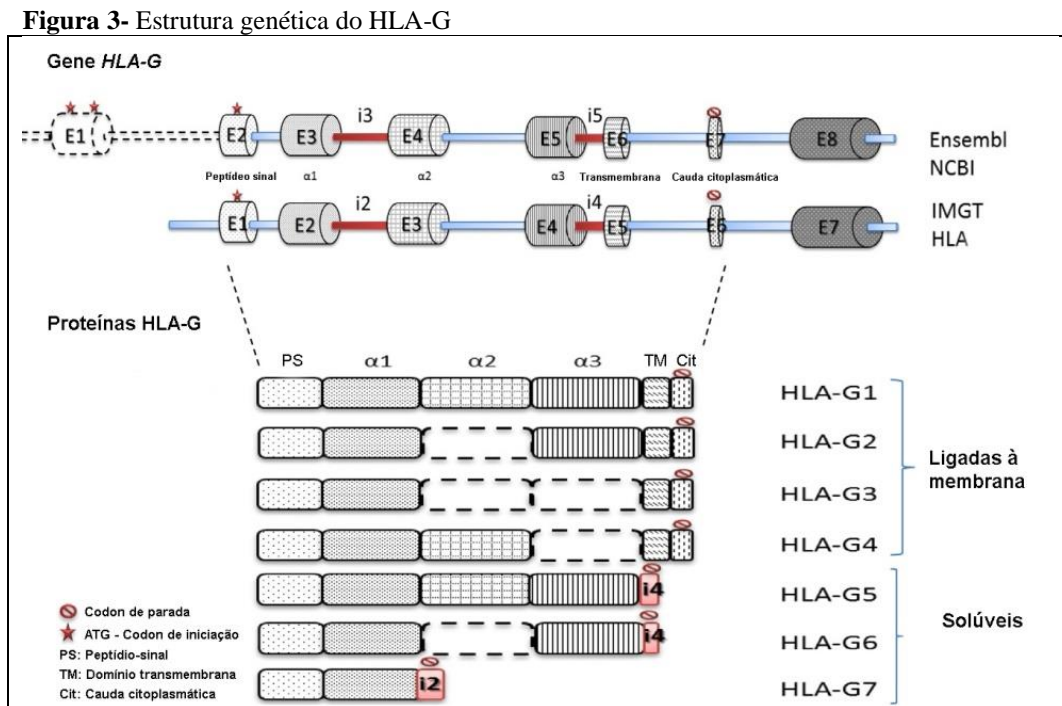
**Nota:** Identificação dos éxons e íntrons segundo o IMGT-HLA-G.

### 1.2.1 Região codificadora

A região codificadora do HLA-G possui 49 alelos que codificam 17 proteínas funcionais e mais dois alelos, G\*01:05N e G\*01:13N, que resultam em proteínas truncadas (*International Immunogenetics Database-IMGT/HLA*, versão 3.33.0). O alelo mais frequente na Eurásia é o G\*01:01:01:01 (CASTELLI et al., 2014a), sendo também o mais comum na região sudeste do Brasil (CASTELLI et al., 2011). O alelo G\*01:05N ocorre devido a deleção de uma citosina no códon 129/130 que muda o *frame* de leitura e gera um códon de parada prematuro (SUÁREZ et al., 1997), no entanto ainda produz outras isoformas funcionais que não as HLA-G1 ou -G5 (LE DISCORDE et al., 2005); e o alelo G\*01:13N possui um códon de parada no éxon-2, gerando uma proteína não funcional e foi encontrado em apenas um indivíduo do país africano Gana (LAJOIE et al., 2008); sendo possivelmente uma mutação pontual.

Existem divergências sobre o real sítio de iniciação da transcrição e da tradução do HLA-G. Segundo as plataformas NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e Ensembl, a transcrição do HLA-G começa 866pb antes do códon de iniciação da tradução nos transcritos de referência (NM\_002127.5 e ENST00000428701 respectivamente). Outros transcritos disponíveis na Ensembl apontam mais dois sítios de iniciação da transcrição, sugerindo que o HLA-G possa responder a várias formas de indução. Além disso, existem três possíveis sítios de iniciação da tradução, mas apenas um deles está de acordo com a Sequência Kozak e mantém a estrutura gênica dos HLA's de classe I (CASTELLI et al., 2014a).

Considerando esta sequência como referência (Figura 3): o éxon-1 codifica o peptídeo sinal; o códon de iniciação da tradução está no éxon-2; os éxons-3, -4 e -5 codificam os domínios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$  da proteína, respectivamente; o éxon-6 codifica a porção transmembrana; e o éxon-7 codifica a cauda citoplasmática. A cauda citoplasmática é curta devido a um códon de parada prematuro, logo o restante do éxon-7 e o éxon-8 compõem a região 3'UTR. A região 5'UTR fica entre o peptídeo sinal e o códon de iniciação, com 178pb (CASTELLI et al., 2014a; DONADI et al., 2011).



**Fonte:** Carosella et al. (2015, tradução nossa).

**Legenda:** E 1-8, éxon 1-8; I-2 e I-4, íntron 2 e 4;  $\alpha$  1-3, domínio proteico 1-3.

**Nota:** O peptídeo sinal de acordo com a Sequência Kozak é o localizado no Éxon-2 no diagrama do Ensembl e NCBI e no Éxon-1, de acordo com o IMGT-HLAG.

Contrário aos demais HLA's de classe I, o HLA-G possui polimorfismos nos éxons -2, -3 e -4, além de apresentar polimorfismos nos íntrons, sendo 16 mutações sinonímias, 11 não-sinonímias e mais 54 mutações em regiões intrônicas (CASTELLI et al., 2014a). Os polimorfismos encontrados nas regiões de contato com proteína não parecem alterar a função do HLA-G (DONADI et al., 2011), e as mutações em íntrons podem estar relacionadas à regulação da molécula e/ou sinal para processamento alternativo do transcrito.

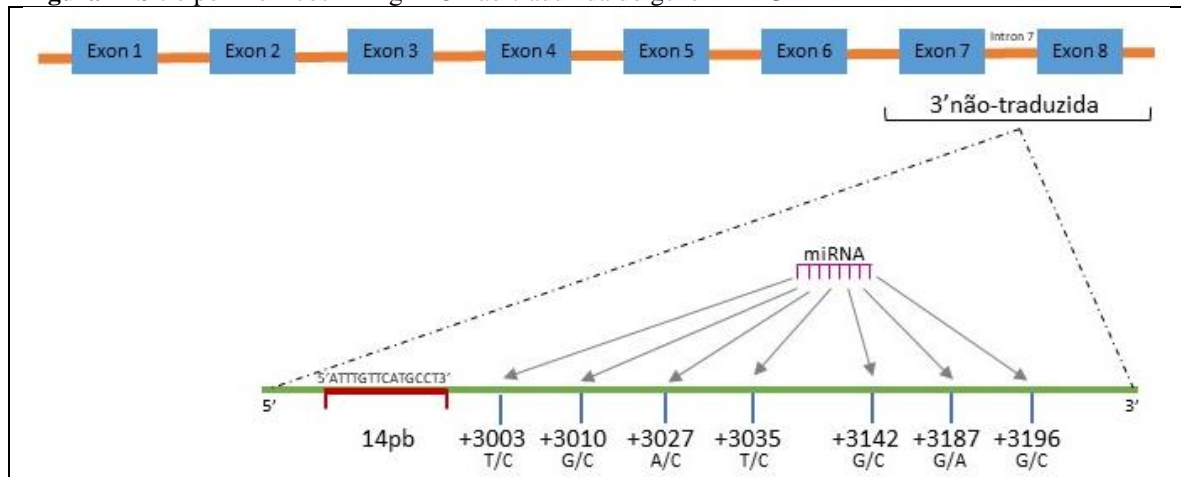
Apesar de tantos polimorfismos encontrados na região codificadora do gene *HLA-G*, poucas são as proteínas produzidas, e a maioria desses alelos é rara, sendo os alelos mais frequentes na população mundial: G\*01:01, G\*01:03, G\*01:04, G\*01:05N e G\*01:06 (DONADI et al., 2011). Ainda, esses alelos estão relacionados ao mesmo haplótipo da região

promotora ou 3'UTR, onde a associação desses alelos a determinadas condições pode ser influência das regiões reguladoras (DIAS et al., 2015), que possuem sítios polimórficos envolvidos na regulação e expressão da molécula.

### 1.2.2 Região 3' não-traduzida

A região 3' não-traduzida (3'UTR) do gene *HLA-G* compreende 383pb e possui oito sítios polimórficos mais estudados (Figura 4), sendo um deles a deleção de 14pb entre os sítios +2960 e +2975 e mais sete polimorfismos de base única (do inglês, *Single nucleotide polymorphism*, SNP): +3003T/C, +3010C/G, +3027C/A, +3035C/T, +3142C/G, +3187A/G e +3196C/G (CASTELLI et al., 2010; DONADI et al., 2011). A inserção dos +2960(14pb) está associada a menor estabilidade do mRNA, possivelmente devido a sequência rica em AU (Adenina e Uracila) presente no início destes 14 pares de base. Adicionalmente, a presença da inserção pode gerar um processamento adicional no mRNA resultando na exclusão de 92pb, dando maior estabilidade ao mRNA (ROUSSEAU et al., 2003). Os sítios +3003, +3010, +3027, +3035 e +3142 são alvos para microRNA, e conseqüente degradação do mRNA. A presença de adenina na posição +3187 fortalece a região rica em AU, levando a degradação mais rápida do mRNA. A presença de uma guanina no sítio +3142 aumenta a afinidade para microRNA. Os alelos de 2960(14pb)In, +3142G e +3187A estão em desequilíbrio de ligação, e todos foram associados com menor expressão de HLA-G (CASTELLI et al., 2010; DONADI et al., 2011).

**Figura 4-** Sítio polimórficos da região 3' não-traduzida do gene *HLA-G*



**Fonte:** O autor.

**Legenda:** miRNA, microRNA. 14pb, 14 pares de base. A, adenina. T, timina. C, citosina. G, guanina.

**Nota:** Os sete sítios polimórficos são alvos putativos de ligação de miRNA.

As UTR-1 e UTR-2 são os haplótipos mais frequentes na população mundial, aproximadamente 25% cada, e diferem entre si por cinco polimorfismos (+2960(14pb)In/Del: +3010C/G: +3142G/C: +3187A/G: +3196C/G). A UTR-3 está presente em aproximadamente 20% e diverge em três sítios com a UTR-1 (+3010C: +3142G: +3187A) e dois sítios com a UTR-2 (+2960(14pb)Del: +3196C). Estes três haplótipos compreendem quase 70% da diversidade genética na região 3'UTR (SABBAGH et al., 2014). Outros seis haplótipos são encontrados em menor frequência em populações saudáveis. Juntos, estes haplótipos representam 95% da diversidade haplotípica nesta região (CASTELLI et al., 2014a).

Indivíduos homocigotos UTR-1/UTR-1 apresentam altos níveis de sHLA-G, já em indivíduos UTR-2/UTR-2 foram encontrados baixos níveis de sHLA-G. Quando não estão em homocigose, estes haplótipos apresentam níveis intermediários de sHLA-G no soro de indivíduos saudáveis (DI CRISTOFARO et al., 2013; MARTELLI-PALOMINO et al., 2013).

O genótipo +2960(14pb)In-In possui maior frequência em pacientes portadores de Doença de Crohn, quando comparados com pacientes portadores de Retocolite Ulcerativa (GLAS et al., 2007). Já o genótipo deleção/deleção foi associado ao desenvolvimento de Diabetes Mellitus tipo 1, DM-1 (SILVA et al., 2016). O alelo de +2960(14pb)In e diplótipo UTR-2/UTR-2 foram associados ao maior risco de desenvolver câncer colorretal em relação a indivíduos saudáveis (GARZIERA et al., 2016).

Nosso grupo observou o aumento da frequência dos alelos +3010C e +3142G em pacientes adultos com Lúpus Eritematoso Sistêmico em relação a indivíduos doadores de sangue saudáveis (LUCENA-SILVA et al., 2013), e dos alelos +3010G e +3142C em crianças com leucemia mieloide aguda (manuscrito em preparação), sugerindo que diferentes miRNAs possam influenciar diferentes tipos celulares.

### 1.2.3 Região 5' reguladora

A região 5' reguladora (*5'Upstream Regulatory Region, 5'URR*) do gene *HLA-G* compreende 1.5kb anteriores ao códon de iniciação da tradução (CAROSELLA et al., 2015), sendo os SNP's encontrados antes do sítio -866 considerados como polimorfismos da região promotora e os SNP's encontrados entre os sítio -866 e -1 considerados 5'UTR. Foram encontrados 35 sítios de variação (*Single Nucleotide Variation - SNV*) nesta região (Quadro 1), mas apenas 26 são considerados sítios polimorfismos de fato (CASTELLI et al., 2014a).

Estes polimorfismos estão dentro ou próximos a sequência de ligação de elementos reguladores da transcrição (DONADI et al., 2011). Dois dos sítios polimórficos são de inserção-

deleção, sendo encontrado no sítio -546 um alelo com inserção de uma guanina e no sítio -533 existe o alelo de deleção de uma adenina; e o SNP -725 é trialélico (CASTELLI et al., 2014a).

**Quadro 1-** Sítios de variação da região 5'URR do gene *HLA-G*

Posição	Bases	SNPid	Posição	Bases	SNPid	Posição	Bases	SNPid
-1305	A/G	rs1736936	-716	G/T	rs2249863	-477	G/C	rs1736932
-1179	G/A	rs1736935	-689	G/A	rs2735022	-443	G/A	rs17875394
-1155	G/A	rs3823321	-666	T/G	rs35674592	-400	G/A	rs17875395
-1140	A/T	rs1736934	-646	A/G	rs17875391	-391	G/A	rs17875396
-1138	A/G	rs17875389	-633	A/G	rs1632944	-369	A/C	rs1632943
-1121	C/T	rs3115630	-546/-542	A/AG	rs201221694	-355	G/A	rs191630481
-1098	G/A	rs146374870	-541/-533	GA/G	rs368205133	-284	G/A	-
-964	A/G	rs1632947	-539	A/G	rs112940953	-256	C/T	-
-922	C/A	rs370338057	-521	C/A	rs138987412	-201	A/T	rs1233333
-810	C/T	rs182801644	-509	C/G	rs17875393	-150	C/T	-
-762	T/C	rs1632946	-486	C/A	rs1736933	-56	C/T	rs17875397
-725	C/G/T	rs1233334	-483	A/G	rs149890776			

**Fonte:** O autor.

**Legenda:** SNPid, identificação dos polimorfismos de base única.

**Nota:** Em cinza estão os sítios que não estão presente em pelo menos 1% da população, consequentemente não são considerados polimorfismos.

A região promotora proximal, 200pb antes do códon de iniciação, possui dois módulos regulatórios comuns aos HLA's de classe I, o *Enhancer A* (EnhA) combinado com o elemento de resposta ao estímulo de interferon (do inglês, *Interferon-Stimulated Response Element- ISRE*) e o módulo SXY, onde a maquinaria de transcrição é acoplada (DONADI et al., 2011). As sequências consenso do EnhA e do ISRE são as mais divergentes dentre os HLA-s de classe I, isso implica na ligação de apenas homodímeros da proteína p50 da família do factor nuclear kappa B (do inglês, *Nuclear Factor Kappa B-NFκB*) no EnhA em resposta ao estímulo de TNF. A p50 não é uma potente transativadora nesta conformação, desta forma o EnhA não é tão eficiente como nos demais HLA's; e devido a essa divergência, o ISRE não responde aos estímulos por interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (CASTELLI et al., 2014b). O módulo SXY é composto por quatro blocos de ligação de proteínas (S, X1, X2 e Y) que criam um complexo multiprotéico para acoplamento da CIITA (do inglês, *Class II transactivator*) e induzir expressão de HLA's de classe I por interferon- $\gamma$ , mas no HLA-G os blocos X2 e Y não são conservados impedindo este acoplamento (DONADI et al., 2011). Assim, os elementos estimuladores proximais não são funcionais, levando a considerar outros elementos indutores da expressão do HLA-G (Figura 5).

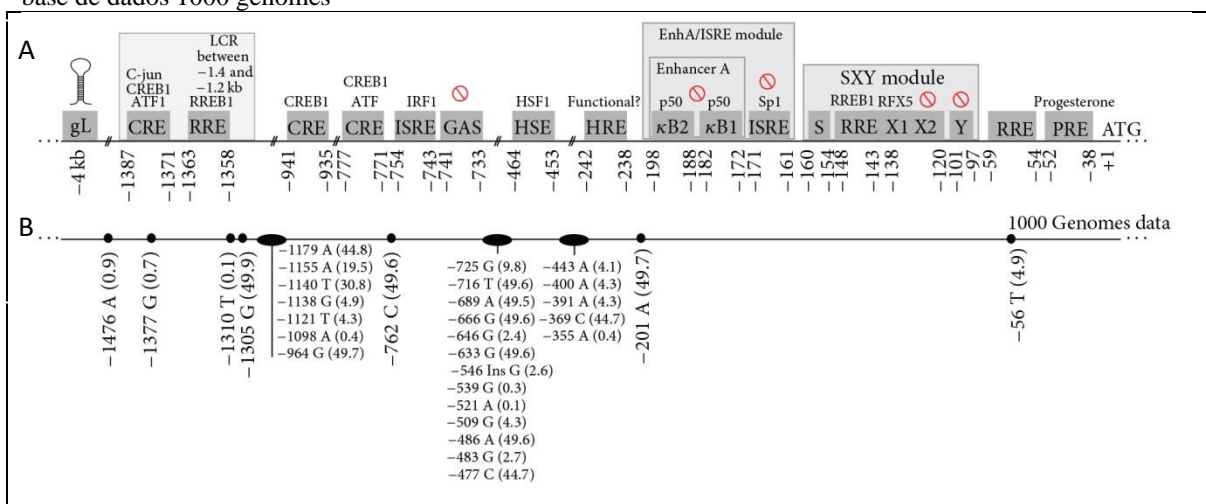
Outro elemento ISRE foi encontrado na sequência do promotor entre as posições -754 e -743 que mostrou aumentar a expressão de HLA-G quando estimulado por IFN- $\gamma$ , com ligação do IRF-1 (do inglês, *Interferon-gamma regulatory factor 1*). Este elemento ISRE fica próximo



ao Sítio de Ativação por Interferon- $\gamma$  (do inglês, *Interferon-gamma Activated site-GAS*), que não evidenciou aumento na expressão de HLA-G quando estimulado por IFN- $\alpha$ , - $\beta$  ou - $\gamma$  (CASTELLI et al., 2014b; GOBIN et al., 2002).

Uma Região de Controle de Locus (do inglês, *Locus Control Region - LCR*) foi identificada a 1.2kb do códon de iniciação e está associada a efeitos epigenéticos no DNA, possivelmente sendo responsável pela expressão espaço-temporal e distribuição restrita do HLA-G nos tecidos (GINEAU et al., 2015; MOUILLOT et al., 2005).

**Figura 5-** Sítio polimórficos observados na Região 5'URR do gene *HLA-G* de sequencias disponíveis na base de dados 1000 genomes



**Fonte:** Castelli et al. (2014b)

**Nota:** A- localização dos elementos regulatórios que compõem a região 5' reguladora (5'URR) do *HLA-G*. B- sítios de variação genética (SNV) encontrados em sequências da base de dados 1000 genomes e frequência do menor alelo no respectivo sítio.

**Legenda:** C-jun= fator de transcrição codificado pelo gene *JUN*. CREB1= proteína de ligação dos elementos responsivos ao cAMP. ATF1= fator de transcrição ATF-1 dependente de AMP-cíclico. RREB1= proteína de ligação dos elementos responsivos ao Ras. IRF1= fator regulador 1 do interferon. HSF1= fator de choque térmico. p50= subunidade p105 do fator nuclear NF- $\kappa$ B. Sp1= fator de transcrição Sp1 (proteína de especificidade 1). RFX5= proteína RFX5 de ligação ao DNA. gL= retrotransposon LINE-1 no promotor do *HLA-G*. LCR= locus de controle. CRE= elemento de resposta ao cAMP. RRE= elemento de resposta ao Ras. ISRE= elemento de resposta ao estímulo por interferon. GAS= sítio de ativação por interferon- $\gamma$ . HSE= elemento de choque térmico. HRE= elemento de resposta a hipóxia. Enhancer-A= sítios de ligação do NF- $\kappa$ B com ISRE. PRE= elemento de resposta a progesterona.

Três sítios de ligação CRE/TRE (do inglês, *cAMP Response Element/TPA Response Element*) que são locais de ligação de fatores de transcrição AP-1, CREB-1 e ATF-1/CREB-1 foram identificados experimentalmente, onde mutações nestes sítios reduziram a transativação do *HLA-G* (GOBIN et al., 2002).

Também foram identificados três sítios de Elemento de Resposta ao Ras (do inglês, *Ras Response Element-RRE*) localizados próximos as posições -53, -142 e -1352, e uma ou duas sequencias GGTCCT alvos para a RRBp-1 (do inglês, *Ras responsive element binding protein*

1). O RRB1-1 recruta a HDAC1 (do inglês, *histone deacetylase 1*) e a CtBP-1 e/ou -2 (do inglês, *C-terminal binding protein 1 and/or 2*) que estão envolvidos no condensamento da cromatina, dificultando a ligação de fatores de transcrição e consequentemente inibindo a transcrição do HLA-G (FLAJOLLET et al., 2009; MOREAU; FLAJOLLET; CAROSELLA, 2009).

LINE-1 (do inglês, *Long Interspersed Element 1*) é uma sequência de 1.553pb, localizada a aproximadamente -4kb do códon de iniciação, rica nas bases nitrogenadas adenina e timina que cria torções na cromatina, e está envolvida no silenciamento do gene *HLA-G* e, possivelmente, contribui para a distribuição limitada da molécula a certos tecidos (CASTELLI et al., 2014b; IKENO et al., 2012).

Outros elementos encontrados foram: o Elemento de Choque Térmico (do inglês, *Heat Shock Element-HSE*), localizado a -480pb e responsável por induzir produção de HLA-G em situações de estresse químico ou físico ao se ligar com a proteína HSF1 (do inglês, *heatshock factor 1*), minimizando a intensidade da resposta imune e dano tecidual (IBRAHIM et al., 2000); o Elemento de Resposta a Progesterona (do inglês, *Progesterone Response Element-PRE*), sequência de 15pb localizada entre as posições -53 e -38, que responde à progesterona secretada pela placenta e tem efeito indutor sobre o HLA-G ao se ligar aos receptores de progesterona (PR) na célula, contribuindo para a função de imunotolerância exercida pela progesterona durante a gravidez (YIE et al., 2006; YIE; XIAO; LIBRACH, 2006).

Alterações nesses elementos regulatórios podem influenciar na ligação dos seus respectivos fatores de ativação e, consequentemente, na expressão do HLA-G. Apenas quatro destes polimorfismos estão dentro das sequências dos elementos, os demais estão em regiões próximas que podem afetar o acoplamento dos fatores de transcrição (CASTELLI et al., 2014b).

Apesar do grande número de polimorfismos, apenas três haplótipos (Promo-1, Promo-2 e Promo-3) correspondem a aproximadamente 70% da variação haplotípica encontrada na população mundial, onde Promo-1 e -2 tem frequência de aproximadamente 30% cada (CASTELLI et al., 2014a). Os haplótipos Promo-1 e Promo-2 diferem entre si por 14 alelos e pertencem a duas linhagens evolucionárias diferentes; o Promo-3 pertence a uma ramificação da linhagem do Promo-2; esta linhagem é a mais próxima dos macacos (GINEAU et al., 2015; MARTINEZ-LASO et al., 2013).

Os haplótipos Promo-1 e -2 estão associados aos haplótipos da região 3'UTR UTR-1 e UTR-2, respectivamente, que são considerados alto e baixo produtor de HLA-G e associados ao mesmo haplótipo da região codificadora (G\*01:01), sugerindo que a funcionalidade do HLA-G é regulada pela variabilidade de suas regiões regulatórias. A coexistência desses dois

haplótipos dá flexibilidade ao sistema imune de agir de forma diferente dependendo da célula e dos estímulos (GINEAU et al., 2015).

### **1.3 Expressões fisiológica e patológica de HLA-G**

Sargent (1993) relatou pela primeira vez a função tolerogênica do HLA-G, contrapondo a ausência ou diminuição de outros HLA's de classe I na placenta durante a gestação, reduzindo a possibilidade de rejeição materna ao feto, contribuindo para a gravidez chegar a termo.

Depois diversos estudos tentaram identificar o HLA-G em outros tecidos, mas sua expressão constitutiva mostrou-se limitada, sendo encontrado: no timo, inibindo o sistema imune do feto aos antígenos da mãe (CRISA et al., 1997); no pâncreas, inibindo o sistema imune para facilitar a liberação de hormônios e prevenindo autoimunidade (CIRULLI et al., 2006); na córnea, contribuindo para a condição de tecido imunoprivilegiado e controle imunológico (LE DISCORDE et al., 2003); na matriz proximal das unhas, promovendo um ambiente imunoprivilegiado, inibindo as células NK (do inglês, *Natural Killer*) e, assim, possibilitando recuperação do tecido de traumas físicos, químicos ou infecções (ITO et al., 2005); e nos precursores hematopoiéticos, onde as células eritróides secretam HLA-G, induzindo sua própria diferenciação e proliferação e induzindo a diferenciação e proliferação de células endoteliais (MENIER et al., 2004).

No entanto, o HLA-G foi identificado em diversas condições patológicas, como cânceres (DONADI et al., 2011), infecções virais, doenças de pele, esclerose múltipla, doenças reumáticas, asma e distúrbios gastrointestinais (FAINARDI et al., 2011).

#### **1.3.1 Função inibitória do HLA-G**

HLA-G exerce sua função inibitória em células NK, linfócitos T, linfócitos B, e células apresentadoras de antígenos por ligação direta aos receptores inibitórios ILT-2 (do inglês, *immunoglobulin-like transcript - ILT*), ILT-4 e KIR2DL4 (do inglês, *killer cell immunoglobulin-like receptor*) (CAROSELLA et al., 2015). O ILT-2 interage com proteínas HLA ligadas a  $\beta$ -microglobulina e o ILT-4 com as moléculas livres de  $\beta$ -microglobulina, ou seja, as isoformas solúveis. Em ambos os casos o HLA-G exerce sua função de forma mais efetiva quando na forma de oligômeros (GONEN-GROSS et al., 2005).

Nas células NK, ao se ligar com receptor exclusivo (KIR2DL4) para o HLA-G, a citólise, a proliferação celular e migração transtecidual são inibidas; além de induzir apoptose,

diferenciação em células NK-supressoras e aumento da expressão de receptores inibitórios. Nos linfócitos T, inibe a citotoxicidade e proliferação celular, induz secreção de citocinas Th2, apoptose e células T supressoras e aumento da expressão de receptores inibitórios. Nas células apresentadoras de antígenos (do inglês, *Antigen Presenting Cells-APC's*) o HLA-G inibe a maturação das células dendríticas e apresentação de antígeno, induz APC tolerogênica, inibe o tráfego de células dendríticas e também aumenta expressão de receptores inibitórios (CAROSELLA et al., 2008a).

Por meio da interação com o receptor ILT-2, o HLA-G inibe a proliferação de células B T-dependente e T-independente, inibe a diferenciação em plasmócitos inibe a secreção de imunoglobulinas e participa do processo de inibição das quimiocinas CXCR4 e CXCR5 nas células B dos centros germinativos (NAJI et al., 2014).

### 1.3.2 Expressão de HLA-G no câncer

O HLA-G foi encontrado em diversos tipos de tumores sólidos, como câncer de ovário, de mama, de pulmão, de tireoide, de fígado e de estômago, sendo associado a mau prognóstico e/ou estágio da doença (CAROSELLA et al., 2015; ROUAS-FREISS et al., 2007).

A expressão de HLA-G pela célula tumoral contribui para o escape da vigilância do sistema imune, que associado à perda de moléculas de reconhecimento, leva ao crescimento do tumor e liberação de citocinas pró-inflamatórias que acabam por induzir o aumento da própria expressão de HLA-G (ESKELINEN, 2011). Em câncer de células não-pequenas de pulmão (YIE et al., 2007b), câncer gástrico (YIE et al., 2007a) e câncer colorretal (GUO et al., 2015), a presença de HLA-G no tecido tumoral foi associada à menor sobrevida dos indivíduos, no entanto em câncer de útero, a presença de HLA-G não foi associada à características clínicas ou sobrevida dos pacientes (BIJEN et al., 2010).

Em tumores de células do sistema imunológico a ação do HLA-G é complexa, pois a expressão de receptores para HLA-G na superfície das células imunes podem favorecer a inibição da proliferação de células tumorais hematológicas, o que foi observado em malignidade envolvendo células B, como mieloma, linfoma e leucemia, mas por outro lado, a interação entre o HLA-G e os receptores das células NK leva a inibição da lise da célula tumoral, como observado em leucemia mieloide crônica e mieloma múltiplo (CAROSELLA et al., 2015; ESKELINEN, 2011).

É possível notar que a influência do HLA-G no desfecho do tecido tumoral pode variar de acordo com o tipo celular e órgão envolvidos no câncer.

### 1.3.3 Expressão de HLA-G em infecções

Vírus utilizam como mecanismo de escape ao sistema imune a inibição da expressão de HLA-A e HLA-B nas células infectadas, deixando de serem reconhecidas pelas células T; mas esse padrão é reconhecido pelas células NK, que destroem as células infectadas. No entanto, as células infectadas podem expressar HLA-G, que ao interagir com receptores das células NK, inibem da atividade citolítica sobre elas (ALCAMI; KOSZINOWSKI, 2000; FAINARDI et al., 2011).

Em indivíduos infectados pelo HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus 1*) foi identificada uma população de células T regulatórias (Treg) expressando HLA-G de superfície que inibem a ativação de células T TCR-independente, ao contrário das células Treg clássicas que suprimem os linfócitos T específicos para o HIV-1, contribuindo para pequena ação antiviral (LI et al., 2013).

Altas concentrações de HLA-G foram encontradas no plasma de indivíduos infectados por HCV (*Hepatitis C Virus*), sugerindo um papel na patogenia da doença (WENG et al., 2011); e expresso em mastócitos, que promovem fibrose no fígado, podendo atuar como protetor do organismo após a fibrose já estar estabelecida (AMIOT et al., 2014).

Indivíduos com infecção ativa por HCMV (*Human Cytomegalovirus*) tem maior expressão de HLA-G em monócitos e no plasma comparados aos indivíduos saudáveis, podendo contribuir para evasão do sistema imune (YAN et al., 2009). Monócitos expressam constitutivamente o mRNA do HLA-G, porém não há produção da proteína mesmo após estimulação para diferenciação em macrófagos. Já macrófagos, derivados de monócitos infectados por HCMV, passam a expressar a proteína HLA-G nas formas solúvel e ligada a membrana, enquanto que células de linhagem astrocitoma produzem apenas as isoformas solúveis, sugerindo que o vírus tenha desenvolvido mecanismos de sobrevivência diferentes para estes tipos celulares e que ele interfere nos mecanismos pós-transcricionais da célula (ONNO et al., 2000).

O HLA-G também foi detectado em outros processos infecciosos como, por exemplo, indivíduos com úlceras gástricas infectados por *Helicobacter pylori* passam a expressar HLA-G nas células glandulares e linfócitos (SOUZA et al., 2016); e crianças nascidas de mães infectadas por *Plasmodium falciparum* que apresentam menores níveis de HLA-G solúvel (sHLA-G) tem maior risco de adquirir malária (D'ALMEIDA et al., 2016; SADISSOU et al., 2014). Entretanto, os mecanismos de ação do HLA-G nestas doenças ainda requerem mais estudos.

### 1.3.4 Expressão de HLA-G em doenças autoimunes

O desenvolvimento de *Diabetes Mellitus* tipo 1 (DM-1) tem sido associado a alteração na expressão de HLA-G no pâncreas (RIZZO et al., 2014). As ilhotas pancreáticas constitutivamente expressam HLA-G no citoplasma de células secretoras de insulina, auxiliando na tolerância à autoantígenos (CIRULLI et al., 2006), no entanto as células dendríticas dos portadores de DM-1 produzem menos HLA-G quando estimuladas por IFN- $\beta$  do que as de indivíduos saudáveis (ABEDIANKENARI et al., 2007).

Já em portadores de Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), os dados ainda são controversos. Rosado et al. (2008) observaram que os níveis sHLA-G em pacientes com LES eram superiores aos encontrados em doadores de sangue; ao contrário, Rizzo et al. (2008) observaram baixos níveis de sHLA-G nos portadores de LES; e Chen et al. (2013) que, apesar de observarem o aumento de sHLA-G em pacientes com LES, não encontraram diferença estatística quando compararam aos controles saudáveis. Adicionalmente, monócitos isolados de PBMC de pacientes com LES apresentaram menos sHLA-G que os indivíduos saudáveis, mesmo após estimulação com interferon- $\gamma$  ou interleucina-10 (MONSIVÁIS-URENDA et al., 2011).

A presença de HLA-G também foi avaliada nas Doenças Inflamatórias Intestinais (DII), Retocolite Ulcerativa (RCU) e Doença de Crohn (DC), onde altos níveis de HLA-G foram detectados em biópsias intestinais de pacientes com RCU, enquanto a ausência desta molécula foi observada em pacientes com DC e em indivíduos saudáveis (TORRES et al., 2004). Contudo, foi relatado que células mononucleares do sangue periférico (do inglês, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*-PBMC) de pacientes não tratados com diagnóstico de DC secretavam sHLA-G espontaneamente, ao contrário de células de pacientes com diagnóstico de RCU e indivíduos saudáveis; e mesmo após estímulo com lipopolissacarídeo (LPS) não foi detectado sHLA-G nas amostras de RCU (RIZZO et al., 2008b).

Em um novo estudo, sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes em tratamento para DII antes e após estímulo com LPS apresentaram, em ambas as condições, maiores títulos de sHLA-G nas amostras de pacientes com diagnóstico de DC. Ademais, foi encontrada correlação entre os níveis de sHLA-G no plasma e no sobrenadante da cultura de PBMC, sem estímulo, de pacientes em tratamento. Estes achados foram atribuídos ao efeito da terapia que normaliza os níveis de HLA-G, onde em RCU o HLA-G passa a ser detectado, e em DC reduz a superprodução de HLA-G, podendo servir como marcador de acompanhamento da evolução da doença (ZELANTE et al., 2011).

## 1.4 Doenças Inflamatórias Intestinais

As Doença Inflamatórias Intestinais (DII) são distúrbios inflamatórios crônicos que afetam o trato gastrointestinal associada ao descompasso da microbiota e alterações genéticas e imunológicas (DE SOUZA; FIOCCHI, 2016; KHOR; GARDET; XAVIER, 2011; WALLACE et al., 2014). Retocolite Ulcerativa (RCU) e Doença de Crohn (DC) são formas de DII mais conhecidas (SILVERBERG et al., 2005). A DII ocorre com maior frequência em mulheres, entre a terceira e quarta década de vida (CARDOSO et al., 2014), tendo impacto socioeconômico (FRÓES et al., 2018). A morbidade da DII está associada a frequentes recaídas e à necessidade de uso prolongado de medicamentos que frequentemente produzem efeitos adversos, variando desde sintomas gástricos até imunossupressão (CHANG; HANAUER, 2017; MATTOS et al., 2015). No Brasil, dois estudos relatam a taxa de prevalência de DII: em São Paulo, a prevalência de RCU é de 4,48/100.000 e a de DC é 3,5/100.000 habitantes (VICTORIA; SASSAK; NUNES, 2009); já no PiauÍ, a taxa é de 1,53/100.000 habitantes, neste caso não foi feita discriminação entre as doenças (PARENTE et al., 2015).

A RCU é uma doença cuja inflamação é restrita ao intestino grosso e é categorizada de acordo com a extensão da inflamação. Esta inflamação pode ser limitada ao reto, chamada proctite ulcerativa, ou acometer de forma contínua as demais seções do intestino. Quando a inflamação ocorre em toda extensão do intestino grosso é chamada de pancolite ulcerativa, tem pior prognóstico pelo maior risco de desenvolvimento de câncer e corresponde a 20% dos casos (BAUMGART; CARDING, 2007; MATRICON; BARNICH; ARDID, 2010; SILVERBERG et al., 2005). Por outro lado, a DC pode acometer todo o trato gastrointestinal da boca ao ânus, sendo a região terminal do íleo a mais acometida (47%); casos no trato gastrointestinal superior são mais raros (3%) e comumente estão associados também ao acometimento do íleo e/ou cólon. Na DC grave podem ser encontradas fístulas perianais e estenose do canal anal (BAUMGART; SANDBORN, 2012).

O diagnóstico de DII é complexo e requer um conjunto de exames clínicos e laboratoriais para exclusão de outras doenças e diferenciação entre DC e RCU. A colonoscopia é um exame mandatório para as DII, pois acessa o local da lesão (RUTTER et al., 2006; STANGE et al., 2006). A imunohistoquímica pode auxiliar no diagnóstico, mas os anticorpos utilizados podem sofrer reação cruzada com antígenos da microbiota ou serem encontrados em ambas as doenças, porém a presença desses marcadores já chama atenção para a resposta imune local alterada (ISKANDAR; CIORBA, 2012; KUNA, 2013). A combinação de marcadores

sorológicos, genéticos e imunológicos mostrou bom resultado na diferenciação entre RCU e DC (PLEVY et al., 2013).

#### 1.4.1 Patogenia das Doenças Inflamatórias Intestinais

As causas que acarretam no desenvolvimento das DII ainda não foram esclarecidas. Sabe-se que a interação entre a microbiota comensal com a patogênica no trato gastrointestinal, a inflamação local devido a resposta imune inadequada contra antígenos próprios e/ou estranhos, e predisposição genética estão envolvidos na etiopatogênese das DII (MATRICON; BARNICH; ARDID, 2010; SANTANA et al., 2007).

##### 1.4.1.1 Fatores ambientais

Diferenças na incidência das doenças nos continentes sugerem que existam fatores ambientais envolvidos no desenvolvimento de DII. Na América do Norte e Europa, a incidência de RCU é de 19,2 e 24,3 e de DC é de 20,2 e 12,7 para cada cem mil habitantes, enquanto a incidência na Ásia é de 6,3 para RCU e 5,0 para DC por cem mil habitantes (MOLODECKY et al., 2012). Devido ao desenvolvimento das sociedades e melhoria das condições sanitárias, acredita-se que o sistema imunológico esteja sendo privado da apresentação precoce de certos antígenos e, ao entrar em contato mais tardiamente, acaba gerando uma resposta imune exacerbada causando a inflamação crônica (BAUMGART; CARDING, 2007; ROGLER, 2004; ZHANG; ZHAO; ZHANG, 2006). A diferença na incidência da doença entre as populações mundiais sugere que o repertório genético também contribui para o desenvolvimento das DII (MATRICON; BARNICH; ARDID, 2010).

##### 1.4.1.2 Fatores genéticos

As DII's são consideradas doenças poligênicas, com vários genes em diferentes cromossomos já associados à susceptibilidade ao desenvolvimento da doença. A região com maiores evidências está localizada no cromossomo 6 e corresponde ao agrupamento de genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade, MHC (BAUMGART; CARDING, 2007; GLAS et al., 2007), dentre os quais destacamos o HLA-G pertence ao MHC classe I não clássico, e a citocina pro-inflamatória TNF pertencente ao MHC de classe III. Variantes genéticas quando alteram a expressão do gene podem estar associadas com diferenças no



fenótipo, forma clínica, gravidade e desfecho da doença (KOSS et al., 2000; RIZZO et al., 2012).

#### 1.4.1.3 Fatores imunológicos

Células e moléculas do epitélio intestinal mantêm a integridade tecidual, bloqueiam a microbiota para não atingir a lâmina própria, permitem que nutrientes sejam transportados do lúmen para o tecido e desencadeiam a imunidade da mucosa contra patógenos que atravessam a barreira epitelial (MARTINI et al., 2017; ZUNDLER; NEURATH, 2017). A mucosa intestinal é composta de células epiteliais, células secretoras de muco, células de Paneth, plasmócitos secretores de IgA e tecido linfoide associado à mucosa. As células de Paneth produzem peptídeos antimicrobianos, como as defensinas, que atravessam a membrana dos patógenos matando-os. As células dendríticas possuem receptores de superfície, que permitem controlar a tolerância contra bactérias comensais e resposta imunológica contra patógenos, além de ativar ou silenciar as células T. As células apresentadoras de antígenos (APC's) e células B de mucosa controlam a resposta imune adaptativa e o equilíbrio das células T virgens (do inglês, *naive*), seja na diferenciação em células T efectoras (Th1, Th2 ou Th17), necessárias para debelar um patógeno, ou células T reguladoras (Treg ou Th3) para estabelecer a homeostasia imunológica. As células NK, ativadas pelas APCs, representam resposta imune inata (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; BAUMGART; SANDBORN, 2007; GLOCKER; GRIMBACHER, 2012; MURPHY, 2012).

O equilíbrio entre as células T reguladoras e as células T efectoras é fundamental para manter a integridade intestinal, e a interrupção desse equilíbrio implica a expansão e hiperatividade das respostas imunes mediadas por células T que levam à inflamação crônica. Na DC, as citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF, induzem uma resposta imune polarizada Th1, enquanto na RCU, as citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, IL-13 e IL-25 induzem uma resposta imune polarizada Th2 (ABRAHAM; CHO, 2009; KAYAMA; TAKEDA, 2012; PASTORELLI et al., 2013).

## 1.5 Citocinas

As citocinas são pequenas proteínas produzidas pelas células do sistema imune que facilitam a comunicação entre as células, estimulando a proliferação de células efectoras antígeno-específicas e intermediando o processo inflamatório. Tanto as células dendríticas

quanto os macrófagos quando ativados secretam várias citocinas que regulam a resposta inflamatória na DII. Essas citocinas promovem a diferenciação das células T e a resposta imune adaptativa (SANCHEZ-MUNOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO, 2008). Na DII, a auto-reatividade de células T é responsável pela liberação aumentada de citocinas inflamatórias, e a persistência dessa resposta leva à inflamação crônica intestinal (LANE; ZISMAN; SUSKIND, 2017; ZUNDLER; NEURATH, 2017).

### 1.5.1 Fator de Necrose Tumoral

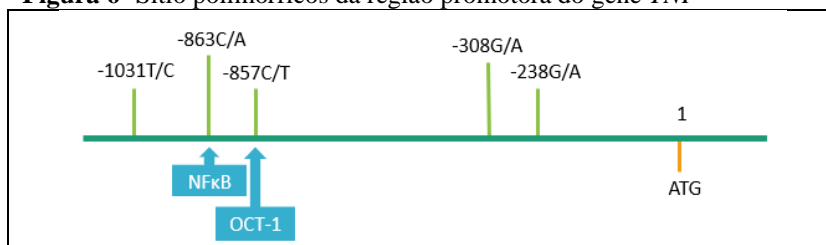
O Fator de Necrose Tumoral (TNF) é uma citocina que tem atividade pró-inflamatória e mediadora da inflamação (SEDGGER; MCDERMOTT, 2014). O TNF é produzido pelos macrófagos e células dendríticas residentes na mucosa intestinal após estímulo, seja por reconhecimento de componentes da microbiota comensal ou por sinalização pelos receptores semelhantes ao *Toll* (do inglês, *Toll-like receptor*). Além destas células apresentadoras de antígenos, a produção de TNF também ocorre em adipócitos, fibroblastos e linfócitos T (NEURATH, 2014; STROBER; FUSS; BLUMBERG, 2002).

O TNF tem efeito pleiotrópico que inclui aumento da expressão de moléculas de HLA de classe I e II (RAVAL et al., 1998); ativação de macrófagos e células T com aumento de citocinas pró-inflamatórias (MACE et al., 1988); induz angiogênese e hipervascularização (DANESE et al., 2006); induz necroptose de células de Paneth (GÜNTHER et al., 2011) e morte celular das células epiteliais do intestino, contribuindo para a erosão celular e permeabilidade na mucosa (SU et al., 2013); e participa na resistência à apoptose das células T (ATREYA et al., 2011). Terapia com anti-TNF é utilizada em pacientes com DC e RCU, onde foi percebida supressão da inflamação com melhora clínica e reparo do dano na mucosa intestinal (LICHTENSTEIN et al., 2012; NEURATH; TRAVIS, 2012; TORRES; CRAVO; COLOMBEL, 2016).

O gene *TNF* está localizado, dentro da região do MHC, na posição 6p21.3 e possui 9.763 pares de bases e quatro éxons (SPRIGGS; DEUTSCH; KUFÉ, 1992). Existem cinco sítios polimórficos bem estudados na região promotora do *TNF*, -1031T/C, -863C/A, -857C/T, -308G/A e -238G/A (Figura 6). A presença destes polimorfismos tem sido relacionada à alteração na expressão da citocina, portanto, possivelmente na intensidade da resposta imune contra o estímulo antigênico, e na suscetibilidade e gravidade das doenças infecciosas. O papel de cada sítio na regulação do gene não é bem compreendido, entretanto, sabe-se que os sítios -863 e -857 são sítios de ligação dos fatores de transcrição NFκB e OCT-1, respectivamente,

enquanto a presença do alelo -238A ou -863A está relacionado a diminuição da produção de TNF, enquanto os alelos -857T e -308A aumentam a produção de TNF (BIDWELL et al., 2001; SKOOG et al., 1999; VAN HEEL et al., 2002; XIE; LIU; YANG, 2012).

**Figura 6-** Sítio polimórficos da região promotora do gene *TNF*



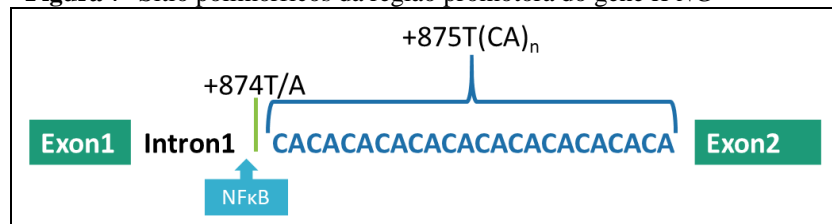
**Fonte:** O autor.

**Legenda:** NFκB, Nuclear Factor kappa B; OCT-1, Transcription factor organic cation transporter 1.

### 1.5.2 Interferon- $\gamma$

O interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina produzida principalmente pelas células NK e NKT da imunidade inata e pelas células T CD8<sup>+</sup> e Th1 CD4<sup>+</sup> da imunidade adaptativa, com a função de estimular a resposta pró-inflamatória contra agentes infecciosos (SCHOENBORN; WILSON, 2007). Na mucosa intestinal, o IFN- $\gamma$  participa da manutenção da homeostase, aumenta a proliferação e a apoptose das células epiteliais do intestino (NAVA et al., 2010), aumenta o processamento antigênico e a fagocitose (SCHOENBORN; WILSON, 2007), participando da perda da barreira epitelial e aumento da permeabilidade celular (BEAUREPAIRE; SMYTH; MCKAY, 2009).

O gene *IFNG* está localizado no cromossomo 12q24.1 (TRENT; OLSON; LAWN, 1982), e possui 4 éxons e 3 íntrons (GRAY; GOEDDEL, 1982). Dois sítios polimórficos encontrados no íntron 1 do gene (Figura 7) são os mais estudados, o +874T/A (rs2430561) e o microsatélite +875(CA)<sub>n</sub> (AWATA et al., 1994; PRAVICA et al., 2000). O sítio +874 está localizado no meio do sítio de ligação do fator de transcrição NFκB, e o alelo +874T está relacionado a presença do alelo +875(CA)<sub>12</sub> (PRAVICA et al., 2000). A presença do genótipo +875(CA)<sub>12</sub>-(CA)<sub>12</sub> está associada a maior expressão da proteína IFN- $\gamma$  (PRAVICA et al., 1999). A variação genética no *IFNG* tem sido associada a diferentes níveis de expressão proteica, gravidade de doenças infecciosas (KANCHAN et al., 2015; SILVA et al., 2012), suscetibilidade a doenças autoimunes (DUFOUR et al., 2004; DWIVEDI et al., 2013; HUANG et al., 2014; JAHROMI; MILLWARD; DEMAINE, 2000) e com a resposta ao tratamento anti-TNF em DII (BANK et al., 2014).

**Figura 7-** Sítio polimórficos da região promotora do gene *IFNG*

**Fonte:** O autor.

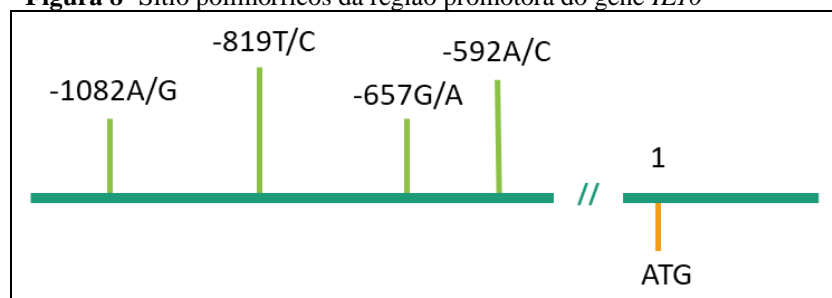
**Legenda:**  $(CA)_n$ , microsatélite CA; NFκB, Nuclear Factor kappa B.

### 1.5.3 Interleucina-10

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina reguladora Th2 e atua inibindo citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-12, TNF e IFN- $\gamma$ . A IL-10 é secretada por células T, células B, granulócitos, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células epiteliais, tendo papel na inflamação decidual (MOORE et al., 2001; SARAIVA; O’GARRA, 2010). A IL-10 também atua no controle da proliferação e diferenciação de macrófagos, células B e células T (GLOCKER et al., 2011; GLOCKER; GRIMBACHER, 2012; MOORE et al., 2001).

O IL-10 participa da homeostase intestinal, inibindo o constante reconhecimento dos antígenos da dieta e da microbiota comensal e patogênica pelas células da mucosa intestinal (SARAIVA; O’GARRA, 2010). Um dos primeiros modelos de estudo de colite intestinal envolveu a depleção do gene de *IL10* em camundongos (KÜHN et al., 1993), onde foi observado que as células T CD4<sup>+</sup> do tecido intestinal destes camundongos produziam grandes quantidades de IFN- $\gamma$  e TNF (BERG et al., 1996).

O gene *IL10* está localizado no cromossomo 1q31-q32, possui 11.892 pares de bases e cinco éxons (KIM et al., 1992). Três polimorfismos de base única são mais estudados na região promotora da *IL10*, -1082A/G, -819C/T e -592A/C (Figura 8); e o haplótipo relacionado ao fenótipo de alta expressão de *IL10* é o -1082G: -819C: -592C (BIDWELL et al., 2001).

**Figura 8-** Sítio polimórficos da região promotora do gene *IL10*

**Fonte:** O autor.

## 1.6 Justificativa

As Doenças Inflamatórias Intestinais têm um componente inflamatório e autoimune, onde diversos genes que codificam moléculas envolvidas em diferentes etapas da elaboração da resposta imune, foram associados ao desenvolvimento das DII. As citocinas inflamatórias TNF e IFN- $\gamma$  estão envolvidas na resposta imune, e a citocina anti-inflamatória IL-10 na manutenção da homeostasia de mucosa intestinal

Variantes genéticas em regiões reguladoras 5'URR, 3'UTR e íntrons, através de mecanismos regulatórios diversos, *cis* ou *trans*, podem regular a expressão do seu respectivo mRNA e níveis de proteínas, modulando a resposta imunológica, comprometendo a resposta imune de mucosa e favorecendo a lesão. A molécula HLA-G participa de pontos de decisão (*Check point*) da resposta imune, modulando a resposta através da inibição de vários processos imunológicos, cuja expressão está correlacionada positivamente a expressão de citocina IL-10. A perda do equilíbrio entre mediadores imune pode levar a lesão crônica na DII.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Estudar a relação de polimorfismos genéticos na região 5' reguladora (5'URR) e 3' não-traduzida (3'UTR) do gene *HLA-G*, região promotora dos genes *TNF* e *IL10* e íntron 1 do gene *IFNG* com a expressão gênica dessas moléculas na lesão de mucosa e seus níveis circulantes em pacientes portadores de Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa, no estado de Pernambuco.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a frequência de alelos, genótipos e haplótipos definidos por polimorfismos na região 5' reguladora e 3' não-traduzida do gene *HLA-G*, região promotora dos genes *TNF* e *IL10* e íntron 1 do gene *IFNG* em portadores de Doença Inflamatória Intestinal e doadores de sangue saudáveis;
- b) Avaliar os níveis circulantes de sHLA-G, TNF, IL-10 e IFN- $\gamma$  em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal;
- c) Avaliar a expressão de mRNA de *HLA-G5*, *TNF*, *IL10* e *IFNG* na mucosa intestinal de pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal e correlacionar com grau de inflamação da mucosa;
- d) Avaliar a expressão da proteína HLA-G na mucosa intestinal de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal e correlacionar com grau de inflamação da mucosa.

### 3 METODOLOGIA

Para a avaliação da variabilidade genética dos genes *HLA-G*, *TNF*, *IL10* e *IFNG* foi realizado um estudo do tipo caso-controle, onde os casos são indivíduos portadores de Doença Inflamatória Intestinal, sendo 140 pacientes com Retocolite Ulcerativa e 71 com Doença de Crohn, acompanhados no ambulatório especializado do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE); e os controles são 364 indivíduos saudáveis doadores de sangue do Instituto de Hemoterapia do Nordeste (IHENE) sem histórico de doença autoimune e câncer na família. Foi coletado de todos os indivíduos, que aceitaram participar da pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), amostra de sangue periférico. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE (CAAE: 0040.0.095.000-10).

Para o estudo da imunidade de mucosa foi avaliado a expressão dos genes *HLA-G*, *TNF*, *IL10* e *IFNG* por reação em cadeia da polimerase em tempo real, qPCR (do inglês, *quantitative polymerase chain reaction*), e da proteína HLA-G por imunohistoquímica a partir de fragmentos de mucosa de diferentes segmentos intestinais de pacientes com indicação clínica de colonoscopia. A estratégia de análise considerou dois tipos de estudo: (1) com amostras não-pareadas considerando a amostra do paciente com maior grau de inflamação no local da lesão intestinal (DC=28; RCU=69); (2) com duas amostras (pareadas) de um mesmo indivíduo, sendo uma a de maior grau de lesão e outra a de menor grau de lesão intestinal (DC=23; RCU=51).

#### 3.1 Avaliação do grau de inflamação

Foram utilizadas amostras de mucosa de diferentes áreas do intestino de pacientes com DII submetidos à colonoscopia em fase aguda da doença para avaliação de atividade inflamatória ou durante seguimento da atividade da doença. Todas as amostras foram fixadas em paraformaldeído a 10% e incluídas em blocos de parafina, as quais foram cortadas e submetidas à remoção de parafina, reidratação e coloração histológica de acordo com os procedimentos histológicos padrão realizados no Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas/UFPE.

Todas os cortes de tecido foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e avaliadas por um patologista experiente, que analisou a atividade inflamatória e as alterações citopáticas, tais como células citomegálicas, e inclusões citoplasmáticas basofílicas e intranucleares. O grau de inflamação foi classificado de acordo com o critério padrão (GUPTA et al., 2007),

considerando: i) sem inflamação (**inativo**), quando foi observada ausência de inflamação; ii) inflamação **leve**, quando infiltrado inflamatório mínimo foi observado sem ulceração epitelial; iii) inflamação **moderada**, quando se observou infiltrado inflamatório moderado sem ulceração epitelial; e iv) inflamação **intensa**, quando o infiltrado inflamatório foi acompanhado de ulcerações epiteliais.

### **3.2 Procedimentos laboratoriais**

Os procedimentos técnicos foram realizados no Laboratório de Imunogenética e no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE.

#### 3.2.1 Separação de células periféricas mononucleadas

Foram coletados 8mL de sangue periférico dos pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal e doadores de sangue saudáveis em tubo contendo o anticoagulante EDTA. A amostra de sangue foi submetida ao gradiente de Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) como indica o fabricante. As células brancas mononucleadas do sangue periférico (PBMC, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) foram transferidas para um novo tubo e lavadas em tampão fosfato-salino (PBS, no inglês *Phosphate buffered saline*) e eluídas em PBS. A suspensão de células foi fracionada, centrifugadas a 12.000  $\times$  g para precipitação e estocadas na temperatura de -80°C para posterior extração de DNA. A camada contendo o plasma na separação dos componentes sanguíneos foi armazenado em -20°C para estudos de quantificação de molécula circulante.

#### 3.2.2 Extração de DNA genômico

O isolamento do DNA genômico foi realizado a partir de PBMC com DNAzol Reagent (Invitrogen Life Technology, Carlsbad, EUA). As amostras foram homogeneizadas em 1mL de DNAzol Reagent para lise celular e posteriormente e foi adicionado 500 $\mu$ L de etanol 100% e centrifugado a 12.000  $\times$  g para precipitação do DNA. O precipitado de DNA foi lavado com 1mL de etanol 75% duas vezes e diluído em 8mM NaOH. O DNA genômico obtido foi utilizado nos estudos de variabilidade genética dos genes *HLA-G*, *TNF*, *IL10* e *IFNG*.



### 3.2.3 Padronização da reação de amplificação e análise dos polimorfismos da região 5'URR do gene *HLA-G*

Foi utilizada a metodologia de amplificação do DNA por reação em cadeia da polimerase, PCR (do inglês, *polymerase chain reaction*), para amplificação da região 5'URR do gene *HLA-G*. A partir das condições da reação publicadas por Castelli et al. (2010), foram realizados testes com diferentes concentrações de reagentes e condições de ciclagem no termociclador Mastercycler Nexus Gradient Eppendorf, para avaliar a eficiência da reação.

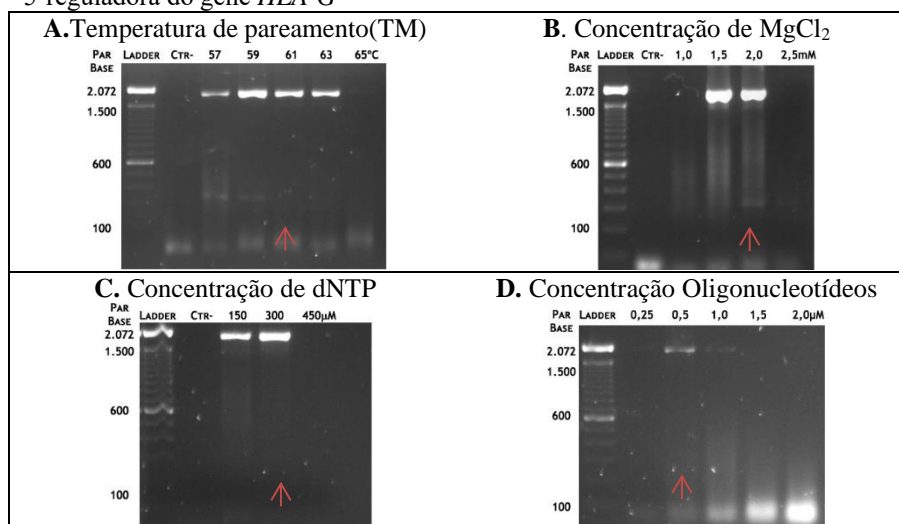
Inicialmente, foi determinada a temperatura de pareamento ( $T_m$ ) dos iniciadores complementares ao molde de DNA que permitiu o maior rendimento na amplificação do fragmento de interesse. Essa temperatura depende do conteúdo das bases guanina e citosina (%CG) nos oligonucleotídeos iniciadores, e foi de 61°C dentre as temperaturas testadas considerando um gradiente de 57°C até 65°C (Figura 9-A).

Em seguida, fixando a temperatura da reação a 61°C foi testado um gradiente de concentração do cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ), incluindo as concentrações de 1,0mM, 1,5mM, 2,0mM e 2,5mM de  $MgCl_2$ . Além de ser cofator da enzima *Taq* Polimerase, o  $MgCl_2$  atua estabilizando a fita dupla e a estrutura em hélice do DNA. Alteração na sua concentração pode influenciar na temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos e a temperatura de desnaturação das fitas moldes de DNA, contribuindo para a amplificação de fragmentos inespecíficos e formação de dímeros de oligonucleotídeos, sendo essencial o ajuste da concentração deste íon na reação. A concentração de 2,0mM foi escolhida com base na análise de gel 3D, considerando a maior produção de banda específica e a menor produção de bandas inespecíficas (Figura 9-B).

Os deoxinucleotídeos (dNTP's) são necessários para confecção das fitas de DNA a partir da fita molde, seu excesso pode inibir a reação de PCR e em baixa concentração pode se tornar escasso durante a reação, principalmente na amplificação de grandes fragmentos como a região 5' reguladora do gene *HLA-G*, e não amplificar o fragmento com a eficiência esperada. Foram testadas as concentrações de 150 $\mu$ M, 300 $\mu$ M ou 450 $\mu$ M de dNTP's, mantendo-se os demais parâmetros fixos, e observou-se que a reação foi inibida na concentração de 450 $\mu$ M e a melhor eficiência foi na concentração de 300 $\mu$ M (Figura 9-C).

O último passo da padronização da reação foi testar a concentração ideal dos oligonucleotídeos disponíveis na reação. Foram testadas as concentrações de 0,25 $\mu$ M, 0,5 $\mu$ M, 1,0 $\mu$ M, 1,5 $\mu$ M e 2,0 $\mu$ M e foi observado que a melhor concentração de oligonucleotídeos é 0,5 $\mu$ M (Figura 9-D).

**Figura 9-** Padronização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) da região 5' reguladora do gene *HLA-G*



**Fonte:** O autor.

**Nota:** A eletroforese do produto de PCR foi realizada em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo e visualizado em transluminador.

A região 5'URR do gene *HLA-G* foi amplificada a partir do DNA genômico extraído da amostra de cada paciente nas condições padronizadas no laboratório (Quadro 2) utilizando a enzima *AmpliTaq Gold DNA Polymerase* (Applied Biosystems, Foster City, EUA).

**Quadro 2-** Condições da reação e ciclagem para amplificação da sequência 5' Reguladora do gene *HLA-G*

Reagentes	Ciclagem
Volume final 30μL:	1 ciclo: 95°C por 10 minutos
1x Tampão de PCR	35 ciclos:
2,0mM de MgCl <sub>2</sub>	95°C por 15 segundos
0,3mM de dNTP	61°C por 30 segundos
4% DMSO	72°C por 2 minutos
0,5μM de cada iniciador	
2,0U de <i>AmpliTaq Gold DNA Polymerase</i>	1 ciclo: 72°C por 5 minutos

**Fonte:** O autor.

O produto de amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,5% para confirmação da amplificação do fragmento de 1.853pb. Amostras amplificadas com sucesso foram encaminhadas para sequenciamento do produto da reação no equipamento ABI GeneticAnalyser 3.500 (Applied Biosystems), utilizando o protocolo BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) e os iniciadores senso, GPromo.F, e mais três iniciadores internos (Quadro 3), visando a identificação de toda a sequência do fragmento amplificado.

**Quadro 3-** Lista de iniciadores utilizados na amplificação e sequenciamento da região 5' reguladora do gene *HLA-G*

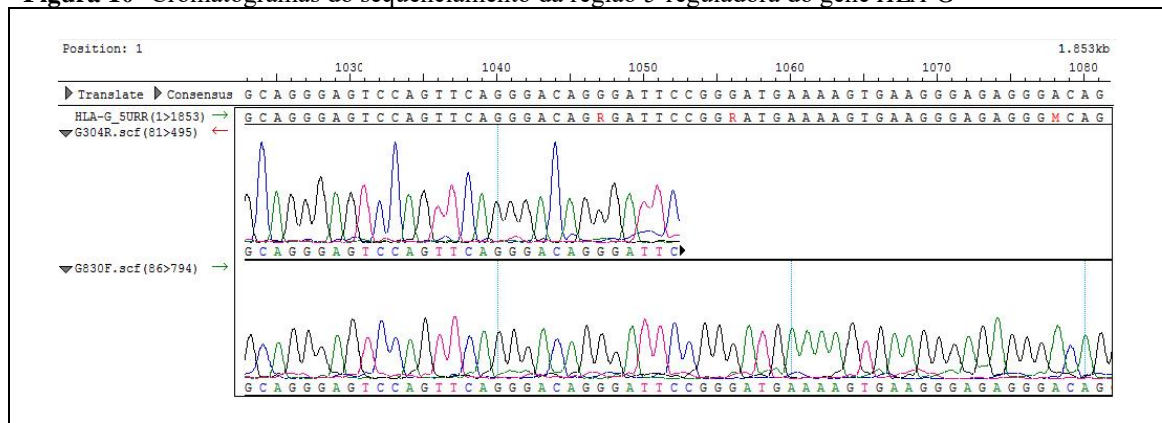
Iniciadores	Sequência
<b>Amplificação e sequenciamento do fragmento</b>	
GPromo.F	5' CACACGGAACTTAGGGCTACG 3'
GPromo.R	5' GCCTTGGTGTTCCTCGTGTCT 3'
<b>Sequenciamento do fragmento</b>	
GPromo.F	5' CACACGGAACTTAGGGCTACG 3'
G908R	5' TTCACCTCACAGTTGTAAGTGTC 3'
G830F	5' CACACGGAACTTAGGGCTACG 3'
G304R	5' GCCAAGCGTTCTGTCTCAGTGT 3'

**Fonte:** Elaborado pelo autor a partir de Castelli et al. (2010).

Os cromatogramas obtidos com o sequenciamento da região 5'URR do gene *HLA-G* foram analisados com o software SeqMan 7.0 (Dnastar Lasergene, Madison - EUA) para contagem dos SNPs (Figura 10).

**Figura 10-** Cromatogramas do sequenciamento da região 5' reguladora do gene *HLA-G*



**Fonte:** O autor.

**Nota:** Imagem de cromatograma visualizado no software Seqman 7.0 (Dnastar Lasergene).

### 3.2.4 Análise de polimorfismo das regiões reguladoras dos genes *HLA-G*, *TNF*, *IL10* e *IFNG*

Foi realizada a amplificação das regiões de interesse por reação em cadeia da polimerase, PCR, com a enzima Taq DNA *Polymerase* (Invitrogen Life Technology), o produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose 2% para confirmação da reação e

os amplicons foram sequenciados pelo protocolo do Big Dye Terminator v3.1 no equipamento ABI Genetic Analyser 3100 (Applied Biosystems).

Os cromatogramas obtidos com o sequenciamento das regiões de interesse foram analisados com o software SeqMan 7.0 para contagem dos SNPs. As frequências alélicas e genotípicas foram analisadas com o software Genepop versão 4.0.10 (ROUSSET, 2008). A reconstrução dos haplótipos foi realizada com o algoritmo de maximização de expectativa (EM) e o método Bayesiano, utilizando os programas Arlequin versão 3.5.1.2 (EXCOFFIER; LAVAL; SCHNEIDER, 2007) e Phase 2.1 (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001) respectivamente, onde foram considerados apenas os resultados com probabilidade maior que 98% e concordantes entre os dois métodos aplicados.

Para amplificação da região 3'UTR do gene *HLA-G* foram utilizados os iniciadores 5'TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT3' e 5'GTCTTCCATTTATTTTGTCTCT3' (CASTELLI et al., 2010), em reação contendo 200mM Tris-HCl (pH 8.4), 500mM de KCl, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTP, 0,5µM de cada iniciador e 1,0U de Taq DNA *Polymerase*, por 40 ciclos de 94°C, 60°C e 72°C por um minuto cada temperatura, com desnaturação inicial de três minutos a 94°C e extensão final de sete minutos a 72°C. O fragmento amplificado tem 358pb, e corresponde a localização +2.937 a +3.281 do gene (NG\_029039).

Para amplificação da região promotora do gene *TNF* foram utilizados os iniciadores 5'CTCAGAGAGCTTCAGGGATAT3' e 5'TCTGTCTCGGTTTCTTCTCCA3', em reação contendo 200mM de Tris-HCl (pH 8.4), 500mM de KCl, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3mM de dNTP, 0,5µM de cada iniciador e 1,0U de Taq DNA *Polymerase*, por 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, com desnaturação inicial de três minutos a 94°C e extensão final de sete minutos a 72°C. O fragmento amplificado tem 979pb, e corresponde a localização -1.117 até -138 do gene (NG\_007462).

Para amplificação da região promotora do gene *IL10* foram utilizados os iniciadores 5'TAAATATCCTCAAAGTTCC3' e 5'ATCCAAGACAACACTACTAA3' (PALADINO et al., 2006), em reação contendo 200mM de Tris-HCl (pH 8.4), 500mM de KCl, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3mM de dNTP, 1,6% de DMSO, 0,5µM de cada iniciador e 1,0U de Taq DNA *Polymerase*, por 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por um minuto, com desnaturação inicial de três minutos a 94°C e extensão final de sete minutos a 72°C. O fragmento amplificado tem 588pb, e corresponde a localização -1.115 até -528 do gene (NG\_012088).

Para amplificação do íntron 1 do gene *IFNG* foram utilizados os iniciadores 5'TTCTGCTTCTCTATCTATATTA3' e 5'TCAACAAAGCTGATACTCCA3', em reação

contendo 200mM de Tris-HCl (pH 8.4), 500mM de KCl, 1,85mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3mM de dNTP, 0,5µM de cada iniciador e 1,0U de Taq DNA Polymerase, por 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos, com desnaturação inicial de três minutos a 94°C e extensão final de sete minutos a 72°C. O fragmento amplificado tem 513pb, e corresponde a localização +601 até +1.114 do gene (NG\_015840).

### 3.2.5 Extração de RNA

Os fragmentos de biópsia coletado dos pacientes foram embebidos em RNA Holder (BioAgency, São Paulo, Brasil) e a armazenadas a -80°C até o uso. A partir de 10mg de biópsia, o RNA total foi isolado utilizando o método do TRIzol Reagent (Invitrogen). O fragmento de mucosa foi macerado e incubando por 5 minutos em temperatura ambiente em TRIzol. Depois foi acrescentado 200µL de clorofórmio, misturado, incubado por 10 minutos e centrifugado a 12.000 *x g* por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo e o RNA foi obtido por precipitação com isopropanol e centrifugação a 12.000 *x g* por 10 minutos. O RNA foi lavado com etanol 75% e diluído em água livre de RNase.

### 3.2.6 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do RNA total extraído. Foram adicionados ao RNA 250mM de Tris-HCl (pH8.3), 375mM de KCl, 15mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1M de DTT, 0,2µM de iniciadores randômicos, 10mM de dNTP e enzimas M-MLV *Reverse Transcriptase* e RNase OUT (Invitrogen Life Technology), conforme orientação do fabricante.

### 3.2.7 Estudo de expressão gênica de *HLA-G*, *TNF*, *IL10* e *IFNG*

Para estudo da expressão gênica foram realizados ensaios de PCR em tempo real quantificando o mRNA. A expressão de HLA-G foi determinada utilizando o intercalante de DNA fita dupla SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) e os oligonucleotídeos 5'GGCCAGTTCTCACACCCTCCA3' e 5'CTCCTTGTGCTAGGCCAGG3' que amplificam a isoforma solúvel HLA-G5. A especificidade da reação foi avaliada pela comparação da curva de dissociação (do inglês, *melting curve*) produzida pelo plasmídeo com o inserto do fragmento e o produto amplificado a partir das amostras de cDNA dos pacientes. A quantificação do mRNA de *HLA-G5* foi realizada por regressão linear a partir comparação do *Quantification*

*Cycle (Cq)* da curva padrão (100ng/μL, 10ng/μL, 0,1ng/μL, 0,01ng/μL, 0,001ng/μL, o equivalente a  $2,18 \times 10^{10}$  até  $2,18 \times 10^5$  cópias) construída com o plasmídeo com o inserto e do Cq das amostras dos pacientes. Amostras que apresentaram Cq maior que 34, e amplificaram o gene constitutivo *GAPDH* (do inglês, *glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), foram consideradas negativas para o alvo. Para amplificação do gene *GAPDH* foram utilizados os iniciadores 5'AGAAGGCTGGGGCTCATTTG3' e 5'GTGGTCATGAGTCCTTCCAC3' (MARQUES et al., 2011)(PALADINO et al., 2006), em reação contendo 200mM de Tris-HCl (pH 8.4), 500mM de KCl, 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,3mM de dNTP, 0,5μM de cada iniciador e 1,0U de Taq DNA Polymerase, por 35 ciclos de 94°C, 62°C e 72°C por um minuto cada temperatura, com desnaturação inicial de três minutos a 94°C e extensão final de sete minutos a 72°C. O fragmento amplificado tem 216pb, e corresponde a localização +317 até +530 do gene (NM\_002046.6).

Os estudos de expressão das citocinas foram realizados utilizando as sondas hidrolizantes TaqMan para expressão gênica de *TNF* (Hs01113624\_g1), *IL10* (Hs00961622\_m1) e *IFNG* (Hs00989291\_m1) e o reagente TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). A expressão de mRNA dessas citocinas foram normalizadas com a expressão do gene constitutivo *GAPDH* (Hs02758991\_g1) pelo método de  $\Delta Cq$  e calculado o fold change ( $2^{-\Delta Cq}$ ).

### 3.2.8 Quantificação da Proteína HLA-G em cortes histológicos

A quantificação da proteína HLA-G no tecido foi realizada com a técnica de imunohistoquímica utilizando anticorpo monoclonal anti-HLA-G, 4H84 (Exbio, Praga, República Checa), que detecta todas as isoformas da molécula em sistema biotina-estreptavidina. As lâminas com o corte de tecido foram desparafinadas em xilol, reidratadas em álcool e lavadas em água. Os cortes foram imersos em tampão 10mM de citrato de sódio, pH 6.0, durante 25 minutos em panela à vapor para recuperação dos sítios antigênicos. A peroxidase endógena foi bloqueada por incubação com peróxido de hidrogénio durante 20 minutos e o bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com leite em pó com baixo teor de gordura diluído 1:100 em PBS durante 20 minutos. As lâminas foram incubadas com o anticorpo de camundongo anti-HLA-G humano, diluído 1:50, em câmara úmida por duas horas. Após lavagem do excesso de anticorpo, as lâminas foram incubadas em câmara úmida com o polímero MACH 4 *Universal HRP Polymer Detection* (Biocare Medical, Concord, EUA), conforme sugere o fabricante. Os cortes foram banhados em solução contendo 3,3-

diaminobenzidina (Dako, Via Real Carpinteria, EUA) por até cinco minutos. Entre as incubações, os tecidos foram lavados com solução de PBS e Tween 20. Finalmente, os cortes foram contracorados com Hematoxilina por 30 segundos para avaliação da estrutura do tecido. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

A quantificação de HLA-G na lâmina foi realizada de duas formas: (1) por estimativa ao olho do observador em ausência de marcação (negativo), ou gradação de cruces, sendo uma cruz (+) para amostras com até 20% do tecido marcado, duas cruces (++) para amostras com até 40%, três cruces (+++) para amostras com até 60%, quatro cruces (++++) para amostras com até 80% e cinco cruces (+++++) para amostras com alta expressão de HLA-G; (2) por quantificação média de pixels de três fotos da mesma lâmina no mesmo aumento (40x), utilizando o software Gimp 2.6 (GNU Image Manipulation Program, plataformas UNIX, [www.gimp.org](http://www.gimp.org)).

### 3.2.9 Detecção de HLA-G solúvel

O plasma isolado do sangue periférico dos pacientes com DII na etapa de fracionamento celular por Ficoll foi utilizado para a quantificação de HLA-G solúvel (sHLA-G), com o anticorpo monoclonal anti-HLA-G MEM-G/9 (Exbio, Praga, República Checa), que detecta as isoformas ligadas a  $\beta$ -microglobulina, sHLA-G1 e HLA-G5, pelo método de ELISA sanduíche (SADISSOU et al., 2014). Inicialmente, a microplaca (Corning Incorporated, New York, EUA) foi revestida com 10 $\mu$ g/mL de anticorpo monoclonal de camundongo anti-HLA-G humano, e incubadas durante a noite a 4°C. As microplacas foram então saturadas com 300 $\mu$ L de tampão diluente (Dako, Santa Clara, EUA) por duas horas. O mesmo tampão foi utilizado para diluir previamente as amostras (1:2). As amostras foram incubadas por duas horas nas placas com anticorpo de captura e mais uma hora com o anticorpo de coelho anti- $\beta$ 2-microglobulina humana (Dako). Adicionalmente, com o intuito de melhorar a amplificação do sinal, as amostras foram incubadas com tampão EnVision (Dako). Entre as incubações, os poços das placas foram lavados com solução de PBS e Tween 20. Finalmente, as placas foram incubadas durante 30 min com o substrato Tetrametilbenzidina (Sigma Aldrich, Saint Louis, EUA) e a absorbância foi medida a 490nm após a adição de HCl (1N). Uma curva padrão de cinco pontos (12,5-200ng/mL), obtida a partir da linhagem celular M8, foi utilizada para determinar os níveis circulantes de sHLA-G e os resultados foram expressos em ng/mL

### 3.2.10 Detecção das citocinas TNF, IL-10 e IFN- $\gamma$ circulantes

O plasma isolado do sangue periférico na etapa de fracionamento celular por Ficoll também foi utilizado para a quantificação das citocinas circulantes. A técnica *Cytometric Bead Array* (CBA) foi utilizada com o BD™ CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit (Becton Dickinson, New Jersey, EUA), com alvo para as citocinas TNF, IL-10 e IFN- $\gamma$ , seguindo o protocolo do fabricante. Os eventos foram adquiridos no equipamento FACSCalibur (Becton Dickinson). Brevemente, o ensaio consiste na mistura de sondas com níveis de fluorescência APC (Allophycocyanin) conhecidas e distintas, que são adicionadas às amostras e incubadas com o anticorpo de detecção conjugado com PE (phycoerythrin) formando uma reação sanduíche. A intensidade da fluorescência do PE indica a concentração da citocina na amostra, que posteriormente é quantificada pelo programa FCAP Array 3.0 (Becton Dickinson), utilizando curva padrão de nove pontos (20 até 5.000pg/mL).

### **3.3 Análise estatística**

As informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais foram analisadas com o software R (R CORE TEAM, 2016) e as tabelas e gráficos foram preparados usando o software GraphPad Prism 6.01 para Windows (GraphPad Software, Inc). Para todos os resultados, os valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

#### 3.3.1 Dados de variabilidade genética

A análise de associação de variabilidade genética com susceptibilidade à doença foi realizada com o teste exato bicaudal de Fisher, considerando a razão de Odds.

#### 3.3.2 Dados de expressão de mRNA e Proteínas na mucosa intestinal

A relação da expressão de mRNA de *HLA-G5*, *TNF*, *IL10* e *IFNG* e proteína HLA-G na mucosa e o grau de lesão tecidual foram primeiramente testados sobre a suposição de normalidade e homogeneidade das variáveis, utilizando o teste de Bartlett e o teste de Shapiro-Wilk, respectivamente. Quando a suposição de homogeneidade foi observada, a comparação entre duas variáveis independentes foi avaliada usando o teste T de Student; e para três ou mais variáveis independentes o Anova seguido do teste post-hoc Tukey ( $P_c$ ). Caso contrário, foram



utilizados o teste de Mann-Whitney (duas variáveis) ou Kruskal-Wallis (três ou mais variáveis) e posterior correção de Bonferroni ( $P_{Bon}$ ).

Para comparar as variáveis dependentes, ou seja, a variação da expressão do alvo testado relacionada aos diferentes graus de lesão em diferentes sítios de um mesmo indivíduo, o teste de Wilcoxon foi aplicado.

A correlação da quantificação de HLA-G no corte histológico entre as variáveis categóricas classificadas em cruzes e variáveis contínuas quantificadas em pixels foi avaliada com o teste de correlação de Spearman. E a correlação entre os mRNA de *HLA-G*, *TNF* e *IL10* foram realizadas com o teste de correlação de Pearson.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Perfil dos pacientes com DII no estado de Pernambuco

Duzentos e dezessete indivíduos adultos com diagnóstico de doença inflamatória intestinal foram estudados, dos quais 73 (33,6%) tinham o diagnóstico de doença de Crohn e 144 (66,4%) diagnóstico de Retocolite Ulcerativa. Os pacientes com DC e RCU possuem as características demográficas de gênero (mulheres, DC=53,4%; RCU= 63,8%) e idade (DC=14-82 anos, mediana=41; RCU=18-85 anos, mediana=47) semelhantes, mas diferem na cor da pele (Qui-quadrado,  $P=0,005$ ). Indivíduos negros são mais frequentes em RCU ( $P=0,002$ ); os pardos possuem a mesma distribuição entre os grupos ( $P=1,000$ ), enquanto os brancos aparentemente são mais frequentes na doença de Crohn ( $P=0,057$ ). As condições sociais quanto ao nível educacional, localização geográfica e presença de água encanada na residência e renda familiar dos indivíduos de ambos os grupos também foram semelhantes ( $P>0,05$ ).

Cerca de 10% dos pacientes com DC ou RCU mencionaram história familiar da doença atual. A doença de Crohn acometeu o trato gastrointestinal do estômago ao reto, sendo a forma clínica mais frequente a que apresenta lesões restritas ao cólon ou associada com lesões em ambos íleo e ceco, enquanto na RCU a pancolite é a forma mais comum, seguida da colite esquerda e distal. A lesão tecidual foi considerada moderada e/ou intensa na análise histológica em cerca de 72% dos pacientes com RCU e doença de Crohn.

### 4.2. Estudo do polimorfismo do gene *HLA-G* e da expressão da molécula HLAG

Foi realizado o estudo de variabilidade genética da região 5'URR e 3'UTR do gene *HLA-G* entre os indivíduos portadores de Doença Inflamatória Intestinal e os indivíduos saudáveis. Adicionalmente, os genótipos dos pacientes foram comparados aos níveis de expressão da molécula na mucosa intestinal e circulante na corrente sanguínea.

#### 4.2.1 Variabilidade genética da região 5'URR do gene *HLA-G*

As frequências de 32 sítios (Quadro 1), incluindo SNP e SNV, da região 5'URR do gene *HLA-G* foram determinadas em 60 indivíduos com Doença de Crohn e 117 indivíduos com Retocolite Ulcerativa e comparadas àquelas obtidas em 192 indivíduos saudáveis (Tabela 1). Devido ao tamanho do fragmento amplificado, não foi possível fazer a cobertura completa de toda a região em todos os pacientes e controles. O intervalo amostral foi de 35 a 60 pacientes

em DC, de 80 a 117 pacientes em RCU e de 78 a 192 indivíduos saudáveis, sendo o sítio -964A/G o com menor representatividade em todos os casos.

O sítio polimórfico -1305A/G foi o único a apresentar diferença na frequência de alelo ou genótipo na Doença de Crohn, sendo o genótipo -1305A-G mais frequente em pacientes do que em controles (Teste exato de Fisher, OR=2,0;  $P=0,029$ ). Já em Retocolite, nove sítios em homozigose foram mais frequentes em controles do que em pacientes, -1179G-G (OR=0,57;  $P=0,049$ ), -762T-T (OR=0,51;  $P=0,024$ ), -716G-G (OR=0,50;  $P=0,015$ ), -689G-G (OR=0,46;  $P=0,009$ ), -666T-T (OR=0,49;  $P=0,012$ ), -633A-A (OR=0,49;  $P=0,016$ ), 486C-C (OR=0,49;  $P=0,012$ ), 477G-G (OR=0,57;  $P=0,040$ ) e -369A-A (OR=0,54;  $P=0,028$ ), todos conferindo proteção a doença. Além destes, o genótipo -1121C-T (OR=4,60;  $P=0,007$ ) foi relacionado a susceptibilidade à doença, correspondendo a maior frequência do alelo -1121T em pacientes com RCU.

Não foi possível realizar a inferência dos haplótipos pelo método Bayesiano devido ao grande número de sítios avaliados (26) e o número amostral disponível para esta análise (RCU=67; CD=20; CT=53), mas é possível notar que os sítios que foram relacionados à proteção ou susceptibilidade à RCU estão contemplados nos haplótipos G010102a, G010104a, G010104b e G010102e, sendo este último bastante raro.

#### 4.2.2 Variabilidade genética da região 3'UTR no gene *HLA-G*

As frequências dos oito sítios polimórficos da região 3' não-traduzida do gene *HLA-G*: +2960(14pb)In/Del (rs371194629), +3003T/C (rs1707), +3010C/G (rs1710), +3027C/A (rs17179101), +3035C/T (17179108), +3142C/G (rs1063320), +3187A/G (rs9380142) e +3196C/G (rs1610696) foram determinadas em 66 indivíduos com Doença de Crohn e 131 indivíduos com Retocolite Ulcerativa e comparadas àquelas obtidas em 364 indivíduos saudáveis (Tabela 2).

**Tabela 1-** Distribuição alélica e genotípica dos sítios polimórficos da região 5'URR do gene *HLA-G* em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil*(continua)*

Variáveis	População de estudo			DC X CT			RCU X CT		
	DC(%)	RCU(%)	CT(%)	Pvalor	OR	IC95%	Pvalor	OR	IC95%
<b>Alelo -1305A/G</b>									
A	50,00	46,05	51,63	0,828	0,94	0,61-1,4	0,221	0,80	0,57-1,1
G	50,00	53,95	48,37		1,10	0,69-1,6		1,30	0,89-1,8
A-A	22,41	21,93	32,68	0,178	0,60	0,3-1,2	<b>0,056</b>	0,58	0,33-1
A-G	55,17	48,25	37,91	<b>0,029</b>	2,00	1,1-3,7	0,104	1,50	0,92-2,5
G-G	22,41	29,82	29,41	0,309	0,69	0,35-1,4	>0,9999	1,00	0,6-1,8
<b>Alelo -1179G/A</b>									
A	42,11	47,79	39,68	0,657	1,10	0,72-1,7	<b>0,064</b>	1,40	0,99-2
G	57,89	52,21	60,32		0,90	0,58-1,4		0,72	0,51-1
A-A	15,79	22,12	18,06	0,839	0,85	0,36-1,9	0,440	1,30	0,72-2,4
A-G	52,63	51,33	43,23	0,277	1,50	0,78-2,6	0,216	1,40	0,85-2,3
G-G	31,58	26,55	38,71	0,422	0,73	0,38-1,4	<b>0,049</b>	0,57	0,34-0,97
<b>Alelo -1155G/A</b>									
A	20,83	12,61	16,24	0,262	1,40	0,81-2,3	0,271	0,74	0,45-1,2
G	79,17	87,39	83,76		0,74	0,43-1,2		1,30	0,83-2,2
A-A	5,00	2,61	3,82	0,710	1,30	0,35-5	0,738	0,67	0,18-2,6
A-G	31,67	20,00	24,84	0,310	1,40	0,73-2,7	0,382	0,76	0,43-1,4
G-G	63,33	77,39	71,34	0,256	0,69	0,38-1,3	0,328	1,40	0,79-2,4
<b>Alelo -1140A/T</b>									
A	74,17	67,98	64,94	0,085	1,60	0,97-2,5	0,518	1,10	0,8-1,7
T	25,83	32,02	35,06		0,65	0,41-1		0,87	0,6-1,2
A-A	53,33	47,37	44,81	0,288	1,40	0,77-2,5	0,711	1,10	0,68-1,8
A-T	41,67	41,23	40,26	0,878	1,10	0,59-2	0,900	1,00	0,65-1,7
T-T	5,00	11,40	14,94	<b>0,061</b>	0,30	0,09-0,93	0,471	0,73	0,37-1,5
<b>Alelo -1138A/G</b>									
A	90,83	92,17	91,72	0,848	0,89	0,44-1,9	0,875	1,10	0,58-1,9
G	9,17	7,83	8,28		1,10	0,52-2,3		0,94	0,51-1,7
A-A	81,67	85,22	84,08	0,686	0,84	0,4-1,8	0,866	1,10	0,55-2,2
A-G	18,33	13,91	15,29	0,680	1,20	0,57-2,6	0,863	0,90	0,47-1,7
G-G	0,00	0,87	0,64	-	-	-	>0,9999	1,40	0,07-2,6
<b>Alelo -1121C/T</b>									
C	95,69	94,59	98,73	<b>0,064</b>	0,29	0,09-0,97	<b>0,008</b>	0,23	0,08-0,7
T	4,31	5,41	1,27		3,50	1-12		4,40	1,4-13
C-C	93,10	89,19	97,45	0,216	0,35	0,1-1,3	<b>0,007</b>	0,22	0,08-0,69
C-T	5,17	10,81	2,55	0,390	2,10	0,51-7,9	<b>0,007</b>	4,60	1,4-13
T-T	1,72	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
<b>Alelo -1098G/A<sup>1</sup></b>									
A	1,67	0,88	0,64	0,307	2,60	0,41-17	>0,9999	1,40	0,21-8,9
G	98,33	99,12	99,36		0,38	0,06-2,4		0,72	0,11-4,7
A-A	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
A-G	3,33	1,75	1,27	0,306	2,70	0,41-17	>0,9999	1,40	0,21-8,9
G-G	96,67	98,25	98,73	0,306	0,37	0,06-2,4	>0,9999	0,72	0,11-4,7
<b>Alelo -964A/G</b>									
A	40,00	41,25	50,00	0,195	0,67	0,38-1,2	0,142	0,70	0,45-1,1
G	60,00	58,75	50,00		1,50	0,84-2,7		1,40	0,92-2,2
A-A	17,14	20,00	32,05	0,116	0,44	0,16-1,2	0,103	0,53	0,26-1,1
A-G	45,71	42,50	35,90	0,405	1,50	0,69-3,2	0,419	1,30	0,7-2,5
G-G	37,14	37,50	32,05	0,668	1,30	0,52-2,8	0,507	1,30	0,65-2,4
<b>Alelo -922C/A<sup>1</sup></b>									
A	2,00	0,70	9,84	0,112	0,19	0,02-1,1	<b>0,001</b>	0,07	0,01-0,36
C	98,00	99,30	90,16		5,30	0,92-58		15,00	2,8-166
A-A	0,00	0,00	9,84	-	-	-	-	-	-
A-C	4,00	1,41	0,00	-	-	-	-	-	-
C-C	96,00	98,59	90,16	0,669	2,70	0,4-32			

**Tabela 1-** Distribuição alélica e genotípica dos sítios polimórficos da região 5'URR do gene *HLA-G* em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil*(continuação)*

Variáveis	População de estudo			DC X CT			RCU X CT		
	DC(%)	RCU(%)	CT(%)	Pvalor	OR	IC95%	Pvalor	OR	IC95%
<b>Alelo -810C/T<sup>1</sup></b>									
C	98,68	100,00	100,00	-	-	-	-	-	-
T	1,32	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
C-C	97,37	100,00	100,00	-	-	-	-	-	-
C-T	2,63	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
T-T	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
<b>Alelo -762T/C</b>									
C	52,08	55,05	45,00	0,241	1,30	0,83-2,1	<b>0,035</b>	1,50	1,1-2,1
T	47,92	44,95	55,00		0,75	0,48-1,2		0,67	0,47-0,95
C-C	25,00	31,31	24,67	>0,9999	1,00	0,48-2,1	0,309	1,40	0,8-2,5
C-T	54,17	47,47	40,67	0,183	1,60	0,81-3	0,299	1,30	0,79-2,2
T-T	20,83	21,21	34,67	0,077	0,50	0,24-1,1	<b>0,024</b>	0,51	0,28-0,92
<b>Alelo -725G/C/T</b>									
C	86,61	82,46	84,88	0,759	1,20	0,62-2,2	0,486	0,84	0,54-1,3
G	6,25	10,53	7,56	0,834	0,82	0,33-1,8	0,229	1,40	0,79-2,6
T	7,14	7,02	7,56	>0,9999	0,94	0,44-2,1	0,871	0,92	0,47-1,7
C-C	75,00	68,42	71,51	0,731	1,20	0,6-2,4	0,599	0,86	0,52-1,5
C-G	8,93	18,42	12,79	0,634	0,67	0,26-1,8	0,237	1,50	0,83-2,9
C-T	14,29	9,65	13,95	>0,9999	1,00	0,45-2,4	0,357	0,66	0,3-1,4
G-G	1,79	0,00	1,16	0,573	1,50	0,1-13	-	-	-
G-T	0,00	2,63	0,00	-	-	-	-	-	-
T-T	0,00	0,88	0,58	-	-	-	>0,9999	1,50	0,08-2,9
<b>Alelo -716G/T</b>									
G	47,32	43,69	52,57	0,385	0,81	0,53-1,2	<b>0,040</b>	0,70	0,5-0,98
T	52,68	56,31	47,43		1,20	0,81-1,9		1,40	1-2
G-G	21,43	19,82	33,14	0,132	0,55	0,28-1,1	<b>0,015</b>	0,50	0,29-0,86
G-T	51,79	47,75	38,86	0,119	1,70	0,9-3	0,143	1,40	0,89-2,3
T-T	26,79	32,43	28,00	>0,9999	0,94	0,49-1,8	0,429	1,20	0,72-2,1
<b>Alelo -689G/A</b>									
A	53,70	58,48	47,67	0,321	1,30	0,82-1,9	<b>0,013</b>	1,50	1,1-2,2
G	46,30	41,52	52,33		0,79	0,52-1,2		0,65	0,46-0,91
A-A	27,78	34,82	27,33	>0,9999	1,00	0,52-2	0,778	1,10	0,62-1,9
A-G	51,85	47,32	40,70	0,160	1,60	0,87-2,9	0,274	1,30	0,81-2,1
G-G	20,37	17,86	31,98	0,123	0,54	0,25-1,1	<b>0,009</b>	0,46	0,26-0,82
<b>Alelo -666T/G</b>									
G	50,88	55,60	47,31	0,522	1,20	0,76-1,7	<b>0,054</b>	1,40	1-1,9
T	49,12	44,40	52,69		0,87	0,57-1,3		0,72	0,52-0,99
G-G	24,56	30,17	26,88	0,864	0,89	0,44-1,7	0,599	1,20	0,69-1,9
G-T	52,63	50,86	40,86	0,129	1,60	0,88-3	0,097	1,50	0,94-2,4
T-T	22,81	18,97	32,26	0,190	0,62	0,3-1,2	<b>0,012</b>	0,49	0,28-0,87
<b>Alelo -646A/G</b>									
A	97,32	96,98	97,01	>0,9999	1,10	0,34-3,8	>0,9999	0,99	0,39-2,6
G	2,68	3,02	2,99		0,89	0,26-2,9		1,00	0,39-2,6
A-A	94,64	93,97	94,02	>0,9999	1,10	0,33-3,9	>0,9999	0,99	0,38-2,6
A-G	5,36	6,03	5,98	>0,9999	0,89	0,26-3,1	>0,9999	1,00	0,39-2,7
G-G	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
<b>Alelo -633A/G</b>									
A	48,25	43,53	52,11	0,522	0,86	0,57-1,3	<b>0,045</b>	0,71	0,51-0,99
G	51,75	56,47	47,89		1,20	0,77-1,8		1,40	1-2
A-A	21,05	18,10	31,05	0,183	0,61	0,31-1,2	<b>0,016</b>	0,49	0,29-0,87
A-G	54,39	50,86	42,11	0,129	1,60	0,9-2,9	0,156	1,40	0,88-2,2
G-G	24,56	31,03	26,84	0,864	0,89	0,44-1,7	0,436	1,20	0,73-2

**Tabela 1-** Distribuição alélica e genotípica dos sítios polimórficos da região 5'URR do gene *HLA-G* em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil*(continuação)*

Variáveis	População de estudo			DC X CT			RCU X CT		
	DC(%)	RCU(%)	CT(%)	Pvalor	OR	IC95%	Pvalor	OR	IC95%
<b>Alelo -546Del-In</b>									
In	5,93	3,85	4,69	0,629	1,30	0,49-3	0,689	0,81	0,35-1,8
Del	94,07	96,15	95,31		0,78	0,34-2,1		1,20	0,55-2,9
In-In	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
In-Del	11,86	7,69	9,38	0,620	1,30	0,51-3,2	0,682	0,81	0,34-1,9
Del-Del	88,14	92,31	90,63	0,620	0,77	0,31-2	0,682	1,20	0,53-3
<b>Alelo -539A/G<sup>1</sup></b>									
A	100,00	100,00	99,74	-	-	-	-	-	-
G	0,00	0,00	0,26	-	-	-	-	-	-
A-A	100,00	100,00	99,48	-	-	-	-	-	-
A-G	0,00	0,00	0,52	-	-	-	-	-	-
G-G	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
<b>Alelo -541In-Del</b>									
In	91,53	96,58	95,31	0,166	0,53	0,24-1,1	0,538	1,40	0,6-3,1
Del	8,47	3,42	4,69		1,90	0,87-4,1		0,72	0,33-1,7
In-In	83,05	93,16	91,15	0,093	0,48	0,22-1,1	0,668	1,30	0,58-3
In-Del	16,95	6,84	8,33	0,084	2,20	0,96-5,1	0,827	0,81	0,35-1,9
Del-Del	0,00	0,00	0,52	-	-	-	-	-	-
<b>Alelo -521C/A<sup>1</sup></b>									
A	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
C	100,00	100,00	100,00	-	-	-	-	-	-
A-A	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
A-C	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
C-C	100,00	100,00	100,00	-	-	-	-	-	-
<b>Alelo -509C/G</b>									
C	92,98	94,30	95,16	0,349	0,67	0,28-1,5	0,705	0,84	0,42-1,7
G	7,02	5,70	4,84		1,50	0,66-3,5		1,20	0,59-2,4
C-C	85,96	89,47	90,32	0,337	0,66	0,28-1,5	0,844	0,91	0,43-2
C-G	14,04	9,65	9,68	0,337	1,50	0,65-3,6	>0,9999	1,00	0,45-2,2
G-G	0,00	0,88	0,00	-	-	-	-	-	-
<b>Alelo -486C/A</b>									
A	48,11	54,95	45,33	0,658	1,10	0,73-1,7	<b>0,027</b>	1,50	1,1-2,1
C	51,89	45,05	54,67		0,89	0,58-1,4		0,68	0,48-0,95
A-A	20,75	29,73	24,18	0,714	0,82	0,38-1,7	0,339	1,30	0,79-2,3
A-C	54,72	50,45	42,31	0,119	1,60	0,9-3	0,185	1,40	0,87-2,2
C-C	24,53	19,82	33,52	0,243	0,64	0,32-1,3	<b>0,012</b>	0,49	0,27-0,87
<b>Alelo -483A/G</b>									
A	96,43	96,93	95,43	0,795	1,30	0,43-3,6	0,400	1,50	0,66-4
G	3,57	3,07	4,57		0,77	0,28-2,3		0,66	0,25-1,5
A-A	92,86	93,86	90,86	0,790	1,30	0,45-3,7	0,390	1,50	0,64-4
A-G	7,14	6,14	9,14	0,790	0,76	0,27-2,2	0,390	0,65	0,25-1,6
G-G	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
<b>Alelo -477G/C</b>									
C	42,73	50,00	44,29	0,827	0,94	0,62-1,4	0,203	1,30	0,9-1,8
G	57,27	50,00	55,71		1,10	0,69-1,6		0,80	0,57-1,1
C-C	20,00	25,00	25,54	0,475	0,73	0,34-1,6	>0,9999	0,97	0,55-1,7
C-G	45,45	50,00	37,50	0,346	1,40	0,77-2,6	<b>0,040</b>	1,70	1-2,7
G-G	34,55	25,00	36,96	0,869	1,10	0,57-2	<b>0,040</b>	0,57	0,34-0,95
<b>Alelo -443G/A</b>									
A	1,79	2,14	1,34	0,665	1,30	0,26-6,3	0,520	1,60	0,52-4,9
G	98,21	97,86	98,66		0,75	0,16-3,8		0,62	0,2-1,9
A-A	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
A-G	3,57	4,27	2,69	0,664	1,30	0,26-6,5	0,517	1,60	0,52-5,1
G-G	96,43	95,73	97,31	0,664	0,75	0,15-3,8	0,517	0,62	0,2-1,9

**Tabela 1-** Distribuição alélica e genotípica dos sítios polimórficos da região 5'URR do gene *HLA-G* em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil*(conclusão)*

Variáveis	População de estudo			DC X CT			RCU X CT		
	DC(%)	RCU(%)	CT(%)	Pvalor	OR	IC95%	Pvalor	OR	IC95%
<b>Alelo -400G/A</b>									
A	7,41	5,65	5,19	0,355	1,50	0,66-3,4	0,853	1,10	0,54-2,3
G	92,59	94,35	94,81		0,68	0,29-1,5		0,91	0,44-1,8
A-A	0,00	0,87	0,00	-	-	-	-	-	-
A-G	14,81	9,57	10,38	0,464	1,50	0,64-3,5	>0,9999	0,91	0,41-1,9
G-G	85,19	89,57	89,62	0,464	0,67	0,29-1,6	>0,9999	0,99	0,48-2,1
<b>Alelo -391G/A</b>									
A	6,48	5,60	5,83	0,818	1,10	0,43-2,7	>0,9999	0,96	0,47-1,9
G	93,52	94,40	94,17		0,89	0,37-2,3		1,00	0,52-2,1
A-A	0,00	0,86	0,56				>0,9999	1,60	0,08-30
A-G	12,96	9,48	10,56	0,625	1,30	0,49-3,1	0,845	0,89	0,4-1,9
G-G	87,04	89,66	88,89	0,808	0,84	0,35-2,2	>0,9999	1,10	0,53-2,3
<b>Alelo -369A/C</b>									
A	51,11	49,52	60,00	0,150	0,70	0,44-1,1	<b>0,017</b>	0,65	0,46-0,92
C	48,89	50,48	40,00		1,40	0,91-2,3		1,50	1,1-2,2
A-A	33,33	26,92	40,57	0,398	0,73	0,37-1,5	<b>0,028</b>	0,54	0,31-0,91
A-C	35,56	45,19	38,86	0,733	0,87	0,45-1,7	0,316	1,30	0,78-2,1
C-C	31,11	27,88	20,57	0,162	1,70	0,81-3,6	0,188	1,50	0,86-2,7
<b>Alelo -355G/A<sup>1</sup></b>									
A	0,00	0,00	0,30	-	-	-	-	-	-
G	100,00	100,00	99,70	-	-	-	-	-	-
A-A	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
A-G	0,00	0,00	0,61	-	-	-	-	-	-
G-G	100,00	100,00	99,39	-	-	-	-	-	-
<b>Alelo -284G/A<sup>1</sup></b>									
A	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
G	100,00	100,00	100,00	-	-	-	-	-	-
A-A	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
A-G	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
G-G	100,00	100,00	100,00	-	-	-	-	-	-
<b>Alelo -256C/T<sup>1</sup></b>									
C	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
T	100,00	100,00	100,00	-	-	-	-	-	-
C-C	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
C-T	0,00	0,00	0,00	-	-	-	-	-	-
T-T	100,00	100,00	100,00	-	-	-	-	-	-

**Fonte:** O autor.

**Nota:** DC= Doença de Crohn; RCU= Retocolite ulcerativa; CT= Controle saudáveis; OR= Razão de Odds; IC95%= 95% Intervalo de confiança. <sup>1</sup> Sítios de variação, não SNP. Não foi possível realizar teste de associação nos sítios de variação devido à baixa ou ausência de representatividade alélica e/ou genotípica.

Os sítios polimórficos +2960(14pb)In/Del e +3027C/A foram os únicos que apresentaram diferenças nas frequências de alelos ou genótipos na doença de Crohn. Os pacientes apresentaram menor frequência do genótipo +2960(14pb)In-In (Teste exato de Fisher, OR=0,26;  $P=0,005$ ), mas a diferença na frequência do alelo +2960(14pb)In em relação aos controles não atingiu a significância (OR=0,71;  $P=0,086$ ) possivelmente devido a limitação no número de pacientes com DC analisados. O alelo +3027A também se apresentou em menor frequência no grupo de pacientes (OR=0,16;  $P=0,048$ ) em relação aos indivíduos sadios; contudo, esse alelo é raro e a comparação entre frequências apresentou um intervalo de

confiança alargado. A distribuição da frequência dos diplótipos formados pelos sítios +2960(14pb) e +3027 na Doença de Crohn em relação aos controles: +2960(14pb)In-In/+3027C-C (6,1% vs 17,1%), +2960(14pb)In-Del/+3027C-C (56,1% vs 40,3%), +2960(14pb)Del-Del/+3027C-C (36,4% vs 34,0%) e +2960(14pb)In-X/+3027A-X (1,5% vs 8,6%); sendo X qualquer um dos respectivos alelos), também apresentou diferença significativa (Qui-quadrado, 11,47;  $P=0,001$ ). Além do alelo +3027A ser raro, a presença do alelo +2960(14pb)Del pareceu estar associado a presença do alelo +3027C, não tendo sido identificados diplótipos +2960(14pb)In-Del/+3027A-A, +2960(14pb)Del-Del/+3027A-A e +2960(14pb)Del-Del/+3027A-C em nenhum dos grupos estudados. Esses achados sugerem a associação entre a proteção da doença de Crohn e a presença do alelo +2960(14pb)In na região 3'UTR do gene *HLA-G* em homozigose.

Os pacientes com Retocolite Ulcerativa apresentaram maior frequência do alelo +3003C (OR=1,74;  $P=0,021$ ) e menor frequência do genótipo +3003T-T (OR=0,50;  $P=0,009$ ) em relação aos indivíduos saudáveis. A presença do alelo +3003C em homozigose ou heterozigose foi estatisticamente superior nos pacientes em relação aos indivíduos saudáveis dentre a população de pele negra (OR=6,0;  $P=0,006$ ; 47,2% vs 13,2%). Por outro lado, pacientes e indivíduos saudáveis, de pele não-negra (brancos e pardos) não apresentaram diferença estatística na frequência do alelo +3003C no modelo dominante (OR=1,6;  $P=0,090$ ; 20,4% vs 13,5%), sugerindo a relação entre genótipo +3003, a ancestralidade Africana e a ocorrência da RCU. O grupo de pacientes também apresentaram menor frequência dos genótipos +3010C-C (OR=0,64;  $P=0,051$ ) e +3142G-G (OR=0,63;  $P=0,051$ ). O haplótipo UTR-4 formado pelos oito sítios polimórficos +2960(14pb)Del: +3003C: +3010G: +3027C: +3035C: +3142C: +3187A: +3196C, foi o único associado com a susceptibilidade ao desenvolvimento de RCU (OR=1,77;  $P=0,023$ ). Esse haplótipo é o único formado pelo alelo +3003C dentro dos sete haplótipos mais frequentes, enquanto que os alelos +3010G e +3142C também são encontrados nos haplótipos UTR-1 e UTR-6, sugerindo que apenas o alelo +3003C está diretamente associado a suscetibilidade a RCU, ou indiretamente, através da interação de fatores genéticos múltiplos incluindo o alelo +3003C associados a evolução genética da população africana.



**Tabela 2-** Distribuição alélica e genotípica dos sítios polimórficos da região 3'UTR do gene *HLA-G* em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil

(continua)

Variáveis	População de estudo (%)			DC X CT			RCU X CT		
	DC	RCU	CT	Pvalor	OR	IC95%	Pvalor	OR	IC95%
<b>Alelo +2960(14bp)</b>									
Del	65,15	60,31	56,87	0,084	1,42	0,96-2,09	0,344	1,15	0,86-1,54
In	34,85	39,69	43,13		0,71	0,48-1,04		0,87	0,65-1,16
Del-Del	36,36	37,40	33,79	0,675	1,12	0,65-1,93	0,846	1,04	0,72-1,52
In-Del	57,58	45,80	46,15	0,108	1,58	0,93-2,69	1,000	0,99	0,66-1,47
In-In	6,06	16,79	20,05	<b>0,005</b>	0,26	0,09-0,73	0,441	0,81	0,48-1,36
<b>Alelo +3003C/T</b>									
C	11,36	12,21	7,42	0,161	1,60	0,87-2,93	<b>0,021</b>	1,74	1,09-2,76
T	88,64	87,79	92,58		0,63	0,34-1,14		0,58	0,36-0,91
C-C	3,03	0,00	0,82	0,170	3,76	0,62-23,0	0,569	0,39	0,02-7,66
C-T	16,67	24,43	13,19	0,440	1,32	0,64-2,69	<b>0,004</b>	2,13	1,29-3,51
T-T	80,30	75,57	85,99	0,259	0,66	0,34-1,30	<b>0,009</b>	0,50	0,31-0,83
<b>Alelo +3010C/G</b>									
C	56,06	51,91	58,10	0,702	0,92	0,63-1,34	0,095	0,78	0,59-1,03
G	43,94	48,09	41,90		1,09	0,75-1,58		1,28	0,97-1,71
C-C	30,30	25,95	35,44	0,571	0,83	0,47-1,47	<b>0,051</b>	0,64	0,41-1,0
C-G	51,52	51,91	45,33	0,421	1,28	0,76-2,17	0,221	1,30	0,87-1,94
G-G	18,18	22,14	19,23	1,000	0,93	0,47-1,84	0,524	1,19	0,73-1,95
<b>Alelo +3027A/C</b>									
A	0,76	5,34	4,56	<b>0,048</b>	0,16	0,022-1,18	0,613	1,18	0,62-2,25
C	99,24	94,66	95,44		6,26	0,85-46,2		0,85	0,46-1,61
A-A	0,00	0,00	0,55	1,000	1,08	0,051-22,9	1,000	0,55	0,03-11,5
A-C	1,52	10,69	8,01	0,065	0,18	0,024-1,32	0,368	1,37	0,70-2,69
C-C	98,48	89,31	91,44	<b>0,043</b>	6,09	0,82-45,4	0,481	0,78	0,40-1,52
<b>Alelo +3035C/T</b>									
C	88,64	85,23	83,29	0,154	1,57	0,88-2,77	0,496	1,16	0,78-1,71
T	11,36	14,77	16,71		0,64	0,36-1,13		0,86	0,58-1,28
C-C	77,27	73,48	70,99	0,371	1,39	0,75-2,58	0,652	1,13	0,72-1,77
C-T	22,73	23,48	24,59	0,876	0,90	0,48-1,68	0,906	0,94	0,59-1,50
T-T	0,00	3,03	4,42	0,148	0,16	0,01-2,67	0,612	0,68	0,22-2,06
<b>Alelo +3142C/G</b>									
C	43,08	46,56	41,24	0,699	1,08	0,74-1,57	0,143	1,24	0,93-1,65
G	56,92	53,44	58,76		0,93	0,64-1,35		0,81	0,61-1,07
C-C	18,46	19,85	18,97	1,000	0,97	0,49-1,91	0,897	1,06	0,64-1,76
C-G	49,23	53,44	44,54	0,500	1,21	0,71-2,05	0,100	1,43	0,96-2,14
G-G	32,31	26,72	36,49	0,575	0,83	0,47-1,46	<b>0,051</b>	0,63	0,41-0,99
<b>Alelo +3187A/G</b>									
A	75,00	69,14	71,91	0,519	1,17	0,76-1,81	0,419	0,88	0,64-1,20
G	25,00	30,86	28,09		0,85	0,55-1,32		1,14	0,84-1,56
A-A	54,69	49,22	53,53	0,892	1,05	0,61-1,79	0,409	0,84	0,56-1,26
A-G	40,63	39,84	36,76	0,575	1,18	0,68-2,03	0,593	1,14	0,75-1,73
G-G	4,69	10,94	9,71	0,239	0,46	0,14-1,54	0,731	1,14	0,59-2,21

**Tabela 2-** Distribuição alélica e genotípica dos sítios polimórficos da região 3' não traduzida do gene *HLA-G* em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil

Variáveis	População de estudo (%)			DC X CT			RCU X CT		
	DC	RCU	CT	Pvalor	OR	95%IC	Pvalor	OR	95%IC
	<i>(conclusão)</i>								
<b>Alelo +3196C/G</b>									
C	76,56	75,59	71,56	0,281	1,30	0,83-2,02	0,247	1,23	0,88-1,72
G	23,44	24,41	28,44		0,77	0,50-1,20		0,81	0,58-1,13
C-C	57,81	59,06	51,80	0,414	1,28	0,74-2,19	0,175	1,34	0,89-2,03
C-G	37,50	33,07	39,52	0,782	0,92	0,53-1,59	0,237	0,76	0,49-1,16
G-G	4,69	7,87	8,68	0,449	0,52	0,15-1,75	0,853	0,90	0,43-1,90

**Fonte:** O autor.

**Nota:** DC= Doença de Crohn; RCU= Retocolite ulcerativa; CT= Controle saudáveis; OR= Razão de Odds; IC95%= Intervalo de confiança de 95%.

A análise dos haplótipos utilizando modelos aditivos e de dominância entre as sete UTR's (UTR1-7) mais frequentes mostrou baixa frequência no gameta UTR4-UTR4 nos três grupos estudados, além de demonstrar que a presença de apenas um alelo UTR4 duplica a chance de um indivíduo desenvolver RCU (OR=1,9;  $P=0,016$ ) comparado aos outros gametas (Tabela 3).

**Tabela 3-** Distribuição haplotípica da região 3'UTR do gene *HLA-G* em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil

Variáveis	População de estudo (%)			DC X CT			RCU X CT		
	DC	RCU	CT	Pvalor	OR	IC95%	Pvalor	OR	IC95%
	<i>(continua)</i>								
UTR-1 (DTGCCCGC)	25,00	28,51	27,29	0,659	0,89	0,57-1,38	0,736	1,06	0,77-1,48
UTR-2 (ITCCCGAG)	21,77	23,55	26,81	0,264	0,76	0,48-1,21	0,344	0,84	0,60-1,19
UTR-3 (DTCCCGAC)	20,16	13,64	15,14	0,180	1,42	0,87-2,31	0,670	0,89	0,58-1,36
UTR-4 (DCGCCAC)	11,29	12,40	7,41	0,150	1,59	0,85-2,99	<b>0,023</b>	1,77	1,09-2,87
UTR-5 (ITCCTGAC)	11,29	9,50	9,46	0,511	1,22	0,66-2,26	1,000	1,00	0,61-1,67
UTR-6 (DTGCCAC)	6,45	4,13	6,62	1,000	0,97	0,45-2,12	0,201	0,61	0,30-1,23
UTR-7 (ITCATGAC)	0,81	5,37	4,10	0,106	0,19	0,03-1,41	0,464	1,33	0,67-2,63
UTR-15 (ITCCCGAC)	0,81	1,65	1,26	1,000	0,64	0,08-5,13	0,746	1,32	0,39-4,41
Outros	2,42	1,24	1,89	-	-	-	-	-	-
<b>Modelo Aditivo</b>									
<b>UTR1</b>									
Outros	54,84	51,24	54,57	1,000	1,01	0,59-1,76	0,592	0,87	0,57-1,3
UTR1-UTRx	40,32	40,50	36,28	0,772	0,92	0,58-1,47	0,441	1,20	0,78-1,8
UTR1-UTR1	4,84	8,26	9,15	0,433	1,75	0,57-5,37	0,853	0,89	0,42-1,9
<b>UTR2</b>									
Outros	59,68	60,33	54,89	0,576	1,22	0,70-2,12	0,333	1,20	0,82-1,9
UTR2-UTRx	37,10	32,23	36,59	1,000	1,02	0,58-1,80	0,435	0,82	0,53-1,3
UTR2-UTR2	3,23	7,44	8,52	0,196	0,36	0,08-1,55	0,847	0,86	0,39-1,9
<b>UTR3</b>									
Outros	64,52	75,21	72,56	0,221	0,69	0,39-1,22	0,630	1,10	0,71-1,9
UTR3-UTRx	30,65	22,31	24,29	0,338	1,40	0,76-2,5	0,708	0,90	0,54-1,5
UTR3-UTR3	4,84	2,48	3,15	0,454	1,60	0,42-5,8	1,000	0,78	0,21-2,9

**Tabela 3-** Distribuição haplotípica da região 3'UTR do gene *HLA-G* em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil

Variáveis	<i>(conclusão)</i>								
	População de estudo (%)			DC X CT			RCU X CT		
	DC	RCU	CT	Pvalor	OR	IC95%	Pvalor	OR	IC95%
<b>UTR4</b>									
Outros	79,03	75,21	85,49	0,249	0,64	0,32-1,3	<b>0,016</b>	0,51	0,31-0,86
UTR4-UTRx	19,35	24,79	14,20	0,331	1,50	0,72-2,9	<b>0,011</b>	2,00	1,2-3,4
UTR4-UTR4	1,61	0,00	0,32	0,301	5,20	0,32-84	-	-	-
<b>UTR5</b>									
Outros	77,42	82,64	81,70	0,736	0,90	0,47-1,7	0,890	1,10	0,62-1,8
UTR5-UTRx	22,58	15,70	17,67	0,373	1,40	0,70-2,6	0,673	0,87	0,49-1,5
UTR5-UTR5	0,00	1,65	0,63				0,306	2,60	0,37-1,9
<b>UTR6</b>									
Outros	87,10	91,74	87,07	1,000	1,00	0,45-2,3	0,187	1,60	0,80-3,4
UTR6-UTRx	12,90	8,26	12,93	1,000	1,00	0,44-2,2	0,187	-	-
UTR6-UTR6	0,00	0,00	0,00						
<b>UTR7</b>									
Outros	-	89,26	92,43	-	-	-	0,336	0,68	0,33-1,4
UTR7-UTRx	-	10,74	6,94	-	-	-	0,236	1,60	0,79-3,3
UTR7-UTR7	-	0,00	0,63	-	-	-	-	-	-
<b>Modelo Dominante</b>									
<b>UTR1</b>									
Outros	54,84	51,24	54,57		1,01	0,58-1,76		0,87	0,57-1,3
UTR1-UTR1 ou UTR1-UTRx	45,16	48,76	45,43	1,000	0,99	0,57-1,71	0,592	1,14	0,75-1,7
<b>UTR2</b>									
Outros	59,68	60,33	54,89		1,22	0,70-2,12		1,25	0,82-1,9
UTR2-UTR2 ou UTR2-UTRx	40,32	39,67	45,11	0,576	0,82	0,47-1,43	0,333	0,80	0,52-1,2
<b>UTR3</b>									
Outros	64,52	75,21	72,56		0,69	0,39-1,22		1,10	0,71-1,9
UTR3-UTR3 ou UTR3-UTRx	35,48	24,79	27,44	0,221	1,45	0,82-2,59	0,630	0,87	0,54-1,4
<b>UTR4</b>									
Outros	79,03	75,21	85,49		0,64	0,32-1,27		0,51	0,31-0,86
UTR4-UTR4 ou UTR4-UTRx	20,97	24,79	14,51	0,249	1,56	0,79-3,11	<b>0,016</b>	1,90	1,2-3,3
<b>UTR5</b>									
Outros	77,42	82,64	81,70		0,77	0,40-1,49		1,05	0,62-1,8
UTR5-UTR5 ou UTR5-UTRx	22,58	17,36	18,30	0,479	1,30	0,67-2,52	0,890	0,94	0,54-1,6
<b>UTR6</b>									
Outros	87,10	91,74	87,07		1,00	0,45-2,26		1,10	0,62-1,8
UTR6-UTR6 ou UTR6-UTRx	12,90	8,26	12,93	1,000	1,00	0,44-2,25	0,187	0,61	0,29-1,3
<b>UTR7</b>									
Outros	-	89,26	92,43	-	-	-		0,68	0,33-1,4
UTR7-UTR7 ou UTR7-UTRx	-	10,74	7,57	-	-	-	0,336	1,50	0,72-3,0

**Fonte:** O autor.

**Legenda:** DC= Doença de Crohn; RCU= Retocolite ulcerativa; CT= Controle saudáveis; OR= Razão de Odds; IC95%= 95% Intervalo de confiança.

**Nota:** UTRx, sendo qualquer UTR além da estudada.

A análise comparativa entre pacientes com Doença de Crohn e pacientes com Retocolite Ulcerativa mostrou que os genótipos +2960(14pb)In-In (OR=0,32;  $P=0,044$ ) e +3027A-C (OR=0,13;  $P=0,022$ ) e o haplótipo UTR-7 (OR=0,14;  $P=0,041$ ) são mais frequentes em RCU do que em DC (Tabela 4).

**Tabela 4-** Comparação dos sítios polimórficos da região 3'UTR do gene *HLA-G* em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite ulcerativa em Recife, Brasil

(*continua*)

Variáveis	População de estudo		DC X RCU		
	DC(%)	RCU(%)	Pvalor	OR	IC95%
<b>Alelo +2690(14bp)</b>					
Del	65,15	60,31	0,380	1,23	0,80-1,90
In	34,85	39,69		0,81	0,53-1,3
Del-Del	36,36	37,40	1,000	0,96	0,52-1,77
In-Del	57,58	45,80	0,133	1,60	0,88-2,9
In-In	6,06	16,79	<b>0,044</b>	0,32	0,11-0,97
<b>Alelo +3003C/T</b>					
C	11,36	12,21	0,870	0,92	0,48-1,8
T	88,64	87,79		1,10	0,57-2,1
C-C	3,03	0,00			
C-T	16,67	24,43	0,273	0,62	0,29-1,3
T-T	80,30	75,57	0,479	1,30	0,64-2,7
<b>Alelo +3010C/G</b>					
C	56,06	51,91	0,455	1,20	0,78-1,8
G	43,94	48,09		0,85	0,56-1,3
C-C	30,30	25,95	0,612	1,20	0,64-2,4
C-G	51,52	51,91	1,000	0,98	0,54-1,8
G-G	18,18	22,14	0,581	0,78	0,37-1,7
<b>Alelo +3027A/C</b>					
A	0,76	5,34	<b>0,025</b>	0,14	0,018-1,0
C	99,24	94,66		7,40	0,96-57
A-A	0,00	0,00			
A-C	1,52	10,69	<b>0,022</b>	0,13	0,02-1,0
C-C	98,48	89,31	<b>0,022</b>	7,80	1,0-61
<b>Alelo +3035C/T</b>					
C	88,64	85,23	0,438	1,40	0,72-2,6
T	11,36	14,77		0,74	0,39-1,4
C-C	77,27	73,48	0,607	1,20	0,61-2,5
C-T	22,73	23,48	1,000	0,96	0,47-1,9
T-T	0,00	3,03			
<b>Alelo +3142C/G</b>					
C	43,08	46,56	0,520	0,87	0,57-1,3
G	56,92	53,44		1,20	0,75-1,8
C-C	18,46	19,85	1,000	0,95	0,44-2,0
C-G	49,23	53,44	0,649	0,85	0,47-1,5
G-G	32,31	26,72	0,502	1,30	0,68-2,5
<b>Alelo +3187A/G</b>					
A	75,00	69,14	0,283	1,30	0,83-2,2
G	25,00	30,86		0,75	0,46-1,2
A-A	54,69	49,22	0,541	1,20	0,68-2,3
A-G	40,63	39,84	1,000	1,00	0,56-1,9
G-G	4,69	10,94	0,185	0,40	0,11-1,4
<b>Alelo +3196C/G</b>					
C	76,56	75,59	0,899	1,10	0,64-1,7
G	23,44	24,41		0,95	0,58-1,6
C-C	57,81	59,06	0,878	0,95	0,52-1,7
C-G	37,50	33,07	0,629	1,20	0,65-2,3
G-G	4,69	7,87	0,549	0,58	0,15-2,2

**Tabela 4-** Comparação dos sítios polimórficos da região 3' não traduzida do gene HLA-G em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite ulcerativa em Recife, Brasil

Variáveis	População de estudo		DC X RCU		
	DC(%)	RCU(%)	Pvalor	OR	IC95%
UTR-1 (DTGCCCCG)	25,00	28,51	0,536	0,84	0,51-1,4
UTR-2 (ITCCCCGAG)	21,77	23,55	0,793	0,90	0,54-1,5
UTR-3 (DTCCCCGAC)	20,16	13,64	0,130	1,60	0,90-2,8
UTR-4 (DCGCCCCAC)	11,29	12,40	0,866	0,90	0,46-1,8
UTR-5 (ITCCTGAC)	11,29	9,50	0,587	1,20	0,60-2,4
UTR-6 (DTGCCCCAC)	6,45	4,13	0,322	1,60	0,61-4,2
UTR-7 (ITCATGAC)	0,81	5,37	<b>0,041</b>	0,14	0,019-1,1
UTR-15 (ITCCCCGAC)	0,81	1,65	0,666	0,48	0,053-4,4
OUTROS	2,42	1,24			

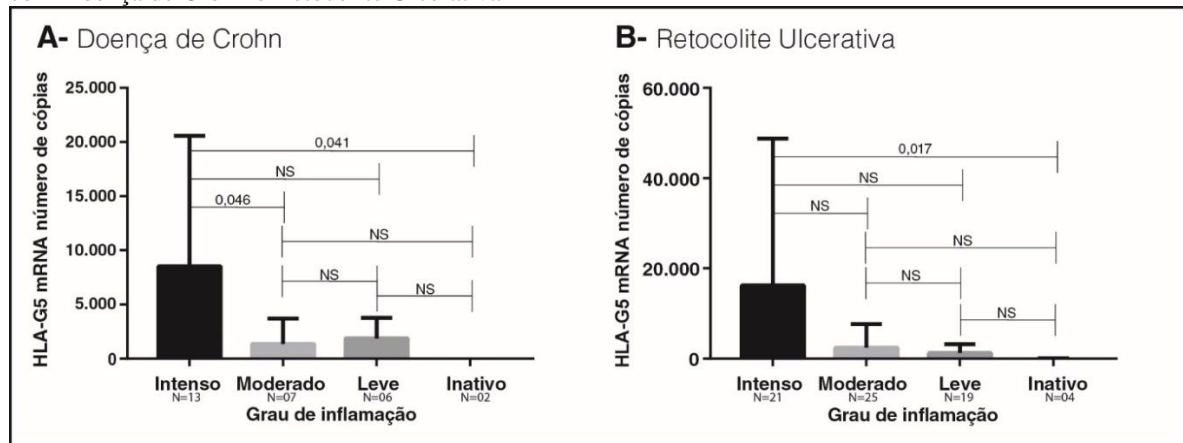
**Fonte:** O autor.

**Nota:** DC= Doença de Crohn; RCU= Retocolite ulcerativa; OR= Razão de Odds; IC95%= 95% Intervalo de confiança.

#### 4.2.3 Expressão de *HLA-G* na mucosa intestinal de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

Para avaliar a expressão do gene *HLA-G* foi quantificado o número de cópias do mRNA da isoforma solúvel G5, que é a mais estudada e predominante. A expressão de *HLA-G5* foi quantificada em 28 pacientes com DC e 69 pacientes com RCU e comparadas quanto a gravidade da lesão, considerando o sítio de maior grau de inflamação do paciente. Ao comparar a expressão de mRNA de *HLA-G5* com o grau de inflamação em DC (Kruskal-Wallis,  $P=0,089$ ), foi observado que amostras com inflamação intensa (N=13; Mediana=1.881,63 cópias) tem maior expressão de *HLA-G5* do que amostras com inflamação moderada (N=7; Mediana=0,0; Mann-Whitney,  $P=0,046$ ) e amostras sem inflamação (N=2; Mediana=0,0;  $P=0,041$ ). Em RCU, também foi observado que amostras com inflamação intensa (N=21; Mediana=2.455,77 cópias) tem maior expressão de *HLA-G5* do que amostras sem inflamação (N=4; Mediana=0,0;  $P=0,017$ ). No entanto, nos três casos, a significância não é mantida após correção por Bonferroni (Figura 11).

**Figura 11-** Comparação entre grau de inflamação intestinal e expressão de mRNA de *HLA-G5* em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa



**Fonte:** O autor.

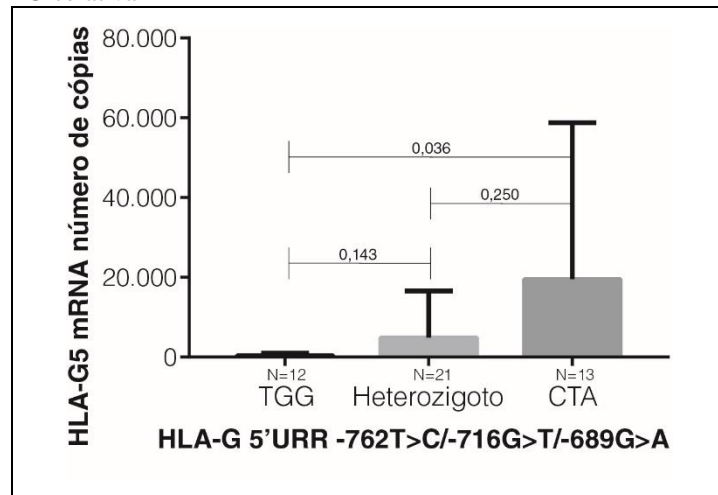
**Nota:** NS= Não significativo. Comparação entre expressão de *HLA-G5* e os diferentes graus de inflamação na mucosa intestinal de pacientes com (A) Doença de Crohn (Kruskal-Wallis,  $P=0,0899$ ) e (B) Retocolite Ulcerativa (Kruskal-Wallis,  $P=0,081$ ).

A avaliação da expressão de mRNA de *HLA-G5* em relação ao genótipo da região 5'URR foi realizada em 23 pacientes com DC e 54 com RCU. Em DC foi observado que o genótipo heterozigoto -964A-G (N=7; Mediana= 1967,3) tem mais cópias de mRNA de *HLA-G5* do que os genótipos homozigotos -964A-A (N=2; Mediana=0,0;  $P=0,002$ ;  $P_{Bon}=0,005$ ) e -964G-G (N=5; Mediana=70,12;  $P=0,003$ ;  $P_{Bon}=0,074$ ). Já em RCU, foi observado que os genótipos homozigotos -1140A-A (N=23; Mediana=286,41), -762C-C (N=13; Mediana=566,96), -716T-T (N=16; Mediana=426,69) e -689A-A (N=17; Mediana=566,96) estão relacionados a maior expressão de *HLA-G5* na mucosa quando comparados aos seus genótipos opostos -1140T-T (N=10; Mediana=0,0;  $P=0,030$ ;  $P_{Bon}=0,090$ ), -762T-T (N=13; Mediana=0,0;  $P=0,016$ ;  $P_{Bon}=0,047$ ), -716G-G (N=15; Mediana=0,0;  $P=0,039$ ;  $P_{Bon}=0,116$ ) e -689G-G (N=14; Mediana=0,0;  $P=0,023$ ;  $P_{Bon}=0,070$ ). É importante observar que os três genótipos relacionados à proteção a doença e que possuem baixa expressão de *HLA-G5* (-762T-T, -716G-G e -689G-G) formam um haplótipo de baixa expressão (Figura 12).

A avaliação da expressão de mRNA de *HLA-G* em relação ao genótipo da região 3'UTR foi realizada em 25 pacientes com DC e 67 com RCU. Em DC, foi observado que a mediana de expressão de mRNA de *HLA-G5* é de 501 cópias nos pacientes com o genótipo +2960(14pb)Del-Del (N=9) e 1.209 cópias nos pacientes com +2960(14pb)In-Del (N=14;  $P=0,811$ ). Considerando os diplótipos, a expressão de *HLA-G5* em indivíduos com +2960(14pb)In-Del/+3027C-C (Mediana=1.770; N=13) é três vezes maior quando comparado ao +2960(14pb)Del-Del/+3027C-C (Mediana=501; N=9), apesar de não ter diferença

significativa ( $P=1,000$ ). Os diplótipos +2960(14pb)In-Del/+3027A-C ( $N=1$ ) e +2960(14pb)In-In/+3027C-C ( $N=1$ ) foram excluídos desta análise, devido ao baixo número de amostra.

**Figura 12-** Comparação entre a expressão de mRNA de *HLA-G5* na mucosa intestinal em relação a haplótipos em homozigose da região 5'URR do gene *HLA-G* em pacientes com Retocolite Ulcerativa



**Fonte:** O autor.

**Legenda:** TGG corresponde ao haplótipo formado pelos genótipos -762T/-716G/-689G em homozigose. CTA corresponde ao haplótipo oposto -762C/-716T/-689A em homozigose. Heterozigoto corresponde ao gameta com os genótipos heterozigotos -762T-C/-716G-T/-689G-A.

**Nota:** Comparação entre expressão de *HLA-G5* na mucosa intestinal em relação aos haplótipos em homozigose de pacientes com Retocolite Ulcerativa (Kruskal-Wallis,  $P=0,082$ ).

Em RCU, foi observada diferença na expressão de mRNA de *HLA-G5* no sítio +2960(14pb) (Kruskal-Wallis,  $P=0,047$ ), onde a mediana de expressão de mRNA de *HLA-G5* é de 246 cópias nos pacientes com o genótipo +2960(14pb)Del-Del ( $N=24$ ), 604 cópias nos pacientes com +2960(14pb)In-Del ( $N=26$ ) e 0 cópias nos pacientes com +2960(14pb)In-In ( $N=10$ ). A relação entre a expressão de mRNA de *HLA-G5* e os genótipos mostrou que indivíduos com +2960(14pb)In-In apresentam menos mRNA de *HLA-G5* do que indivíduos com +2960(14pb)Del-Del (Mann-Whitney,  $P=0,035$ ) e do que indivíduos com +2960(14pb)In-Del ( $P=0,017$  e  $P_{Bon}=0,052$ ). Também foi observada diferença na expressão de *HLA-G5* no sítio +3196, onde indivíduos com genótipo +3196G-G apresentaram menos cópias de *HLA-G5* (Mediana=0;  $N=7$ ) quando comparado àqueles com genótipo +3196C-C (Mediana=233;  $N=32$ ) (Mann-Whitney,  $P=0,049$ ) e com genótipo +3196C-G (Mediana=625;  $N=19$ ;  $P=0,014$ ;  $P_{Bon}=0,043$ ).

#### 4.2.4. Nível de HLA-G solúvel (sHLA-G) circulante em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

Os níveis de sHLA-G circulante foram quantificados em 34 pacientes com DC e 70 com RCU. Inicialmente, foi observada maior expressão de sHLA-G em paciente com RCU em relação aos com DC (Mann-Whitney,  $P=0,031$ ).

A avaliação dos níveis de sHLA-G circulante em relação ao genótipo da região 5'URR foi realizada em 27 pacientes com DC e 61 com RCU. Não foi observada relação entre genótipos e níveis de sHLA-G em pacientes com DC. Em RCU, foi observado que o genótipo -1140T-T (N=10; Mediana=16,15pg/mL) está relacionado a maior produção de sHLA-G quando comparado a indivíduos com genótipo heterozigoto -1140A-T (N=20; Mediana=13,36pg/mL;  $P=0,034$ ;  $P_{Bon}=0,103$ ). Curiosamente, foi observado que o genótipo -1140T-T tem menor expressão de mRNA de *HLA-G5*, que pode estar relacionado a limitação metodológica, devido ao teste detectar também a isoforma de HLA-G1-clivada (sHLA-G1), ou que polimorfismo genético possa estar associado a estabilidade do mRNA.

A avaliação dos níveis de sHLA-G circulante em relação ao genótipo da região 3'UTR foi realizada em 25 pacientes com DC e 67 com RCU. Não foi encontrada diferença nos níveis de sHLA-G e o sítio polimórfico +2960(14pb) em DC ou RCU. Em DC, foi observada a menor expressão de sHLA-G no genótipo +3010G-G (N=6; Mediana=6,955pg/mL) quando comparado com o genótipo +3010C-C (N=7; Mediana=13,756pg/mL;  $P=0,021$ ;  $P_{Bon}=0,062$ ) e genótipo +3010C-G (N=12; Mediana=14,077;  $P=0,001$ ;  $P_{Bon}=0,004$ ). O mesmo foi observado no sítio +3142, onde o genótipo +3142C-C (N=6; Mediana=6,955pg/mL) tem menor expressão de sHLA-G quando comparado ao genótipo +3142G-G (N=7; Mediana=13,756 pg/mL;  $P=0,021$ ;  $P_{Bon}=0,062$ ) e genótipo +3142C-G (N=12; Mediana=14,077pg/mL;  $P=0,001$ ;  $P_{Bon}=0,004$ ). Aplicando o modelo dominante para os sítios +3010 (CC+CG) e +3142 (GG+CG) foi observado que a presença do alelo +3010C ( $P=0,004$ ) e +3142G ( $P=0,004$ ) está associada a maior produção de sHLA-G.

Em RCU apenas o sítio +3187 mostrou-se relacionado a expressão de sHLA-G, onde indivíduos com genótipo +3187G-G tem menos sHLA-G (N=9; Mediana=9,122pg/mL) do que os indivíduos com genótipo +3187A-A (N=37; Mediana=15,857;  $P=0,033$ ) e genótipo +3187A-G (N=19; Mediana=17,286;  $P=0,027$ ), porém não mantem a significância quando corrigidos pelo teste de Bonferroni.



### 4.3 Estudo da região promotora do gene *TNF* e expressão de TNF em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

Foi realizado o estudo de variabilidade genética da região promotora do gene *TNF* entre os indivíduos portadores de Doença Inflamatória Intestinal e os indivíduos saudáveis. Adicionalmente, os genótipos dos pacientes foram comparados aos níveis de expressão da molécula na mucosa intestinal e circulante na corrente sanguínea.

#### 4.3.1 Variabilidade genética da região promotora no gene *TNF*

As frequências de cinco sítios polimórficos da região promotora do gene *TNF*: -1031T/C (rs1799964), -863C/A (rs1800630), -857C/T (rs1799724), -308G/A (rs1800629) e -238G/A (rs361525) foram determinadas em 68 indivíduos com Doença de Crohn e 135 indivíduos com Retocolite Ulcerativa e comparadas aquelas obtidas em 292 indivíduos saudáveis (Tabela 5).

Os pacientes portadores de DII apresentaram uma distribuição semelhante de alelos em relação aos indivíduos sadios para os sítios polimórficos -1031T/C, -857C/T, -308G/A e -238G/A do gene *TNF*, independente da estratificação dos casos pelo tipo de doença. Em relação ao sítio polimórfico -863C/A, o alelo A mostrou-se com frequência mais elevada em pacientes com RCU em relação aos indivíduos saudáveis (Teste exato de Fisher, OR=1,55;  $P=0,025$ ), fato não observado em pacientes com Crohn ( $P=0,453$ ). O grupo de pacientes com RCU ainda apresentou diminuição do genótipo -863C-C em relação aos controles sadios (OR=0,60;  $P=0,024$ ).

Foram identificados sete haplótipos para a região promotora do gene *TNF* nos pacientes com DC e cinco haplótipos nos pacientes com RCU. O haplótipo mais frequente foi -1031T: -863C: -857C: -308G: -238G em pacientes com DC (63%) e RCU (56%). Influenciado pela presença do alelo -863A, apenas em indivíduos com RCU foi encontrada diferença estatística relacionada ao haplótipo -1031C: -863A: -857C: -308G: -238G (OR=1,49;  $P=0,050$ ), sendo este haplótipo o único que contempla alelo -863A encontrado nos indivíduos com RCU.

**Tabela 5-** Distribuição alélica e genotípica dos sítios polimórficos da região promotora do gene *TNF* em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil

Variáveis	População de estudo			DC X CT			RCU X CT		
	DC(%)	RCU(%)	CT(%)	Pvalor	OR	IC95%	Pvalor	OR	IC95%
<b>Alelo -1031T/C</b>									
C	21,54	26,38	21,65	1,000	0,99	0,62-1,59	0,147	1,30	0,91-1,84
T	78,46	73,62	78,35		1,01	0,63-1,61		0,77	0,54-1,09
C-C	6,15	6,30	3,54	0,310	1,79	0,53-5,99	0,291	1,83	0,69-4,86
C-T	30,77	40,16	36,22	0,387	0,76	0,43-1,37	0,501	1,18	0,76-1,83
T-T	63,08	53,54	60,24	0,776	1,13	0,64-1,98	0,227	0,76	0,50-1,17
<b>Alelo -863C/A</b>									
A	18,66	22,35	15,67	0,435	1,23	0,76-2,02	<b>0,025</b>	1,55	1,07-2,24
C	81,34	77,65	84,33		0,81	0,50-1,32		0,65	0,45-0,93
A-A	2,99	4,55	2,82	1,000	1,06	0,22-5,12	0,388	1,64	0,56-4,84
A-C	31,34	35,61	25,70	0,360	1,32	0,74-2,36	<b>0,048</b>	1,60	1,02-2,49
C-C	65,67	59,85	71,48	0,374	0,76	0,43-1,34	<b>0,024</b>	0,60	0,39-0,92
<b>Alelo -857C/T</b>									
C	94,78	94,36	91,17	0,218	1,76	0,78-3,97	0,128	1,62	0,89-2,94
T	5,22	5,64	8,83		0,57	0,25-1,28		0,62	0,34-1,12
C-C	91,04	88,72	83,04	0,132	2,08	0,85-5,08	0,145	1,61	0,86-2,99
C-T	7,46	11,28	16,25	0,082	0,42	0,16-1,09	0,234	0,66	0,35-1,22
T-T	1,49	0,00	0,71	0,472	2,13	0,19-23,8	-		
<b>Alelo -308G/A</b>									
A	11,76	13,33	12,50	0,886	0,93	0,52-1,66	0,742	1,08	0,70-1,65
G	88,24	86,67	87,50		1,07	0,60-1,91		0,93	0,61-1,42
A-A	0,00	1,48	2,05				1,000	0,72	0,14-3,60
A-G	23,53	23,70	20,89	0,625	1,17	0,62-2,18	0,530	1,18	0,72-1,91
G-G	76,47	74,81	77,05	1,000	0,97	0,519-1,81	0,626	0,89	0,55-1,42
<b>Alelo -238 G/A</b>									
A	3,73	4,81	6,16	0,406	0,59	0,23-1,54	0,525	0,77	0,40-1,48
G	96,27	95,19	93,84		1,69	0,65-4,41		1,30	0,68-2,50
A-A	0,00	0,00	0,35	-			-		
A-G	7,46	9,63	11,62	0,389	0,61	0,23-1,64	0,618	0,81	0,41-1,60
G-G	92,54	90,37	88,03	0,388	1,69	0,63-4,49	0,513	1,28	0,65-2,51
<b>Haplótipo</b>									
CACGG	17,74	21,37	15,38	0,580	1,19	0,70-2,01	<b>0,050</b>	1,49	1,01-2,22
CCCGG	0,81	0,00	1,07	1,000	0,75	0,09-6,51	-		
CCCGA	2,42	4,44	4,06	0,593	0,59	0,17-2,01	0,846	1,10	0,51-2,34
TCCGG	62,90	56,05	59,19	0,472	1,17	0,78-1,76	0,427	0,88	0,64-1,20
TCCAG	10,48	12,50	10,04	0,868	1,05	0,55-2,01	0,316	1,28	0,79-2,07
TCTGG	4,84	5,65	9,62	0,106	0,48	0,20-1,15	0,086	0,56	0,30-1,05
TACGG	0,81	0,00	0,64	1,000	1,26	0,13-12,2	-		
<b>Diplótipos</b>									
-1031C: -863-C	3,23	5,13	4,44	0,480	0,62	0,23-1,7	0,720	0,85	0,41-1,77
-1031T: -863-C	78,23	78,85	74,19	0,902	0,96	0,6-1,6	0,161	0,77	0,54-1,11
-1031X: -863-A	18,55	16,03	21,37	0,499	1,20	0,73-2	0,153	1,35	0,91-2,00

**Fonte:** O autor.

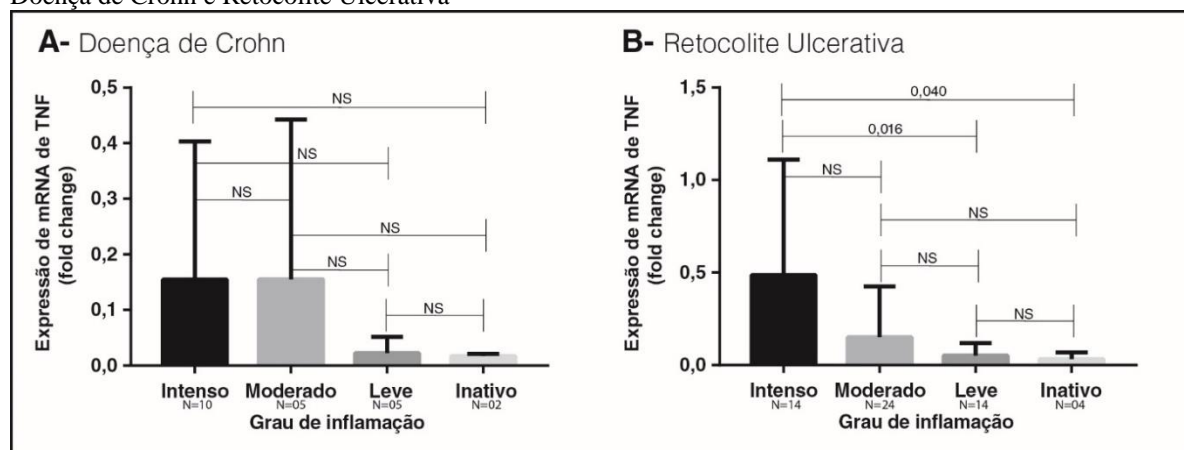
**Nota:** DC= Doença de Crohn; RCU= Retocolite ulcerativa; CT= Controle saudáveis; OR= Razão de Odds; IC95%= 95% Intervalo de confiança.

#### 4.3.2 Expressão de TNF na mucosa intestinal de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

Para avaliar a expressão do gene *TNF* foi realizada a quantificação relativa de mRNA de TNF em 22 pacientes com DC e 56 pacientes com RCU e comparadas quanto a gravidade

da lesão, considerando o sítio de maior grau de inflamação do paciente. Não houve diferença entre a expressão de *TNF* em relação ao grau de inflamação nos pacientes com DC (Kruskal-Wallis,  $P=0,345$ ). Em RCU, foi observado que amostras com inflamação intensa (N=14) tem maior expressão de *TNF* quando comparadas a amostras sem inflamação (N=4;  $P=0,040$ ) e com inflamação leve (N=14;  $P=0,016$ ), porém perde a significância após correção por Bonferroni (Figura 13).

**Figura 13-** Comparação entre grau de inflamação intestinal e expressão de mRNA de *TNF* em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa



**Fonte:** O autor.

**Legenda:** NS= Não significativo.

**Nota:** Comparação entre expressão de TNF com os diferentes graus de inflamação na mucosa intestinal de pacientes com (A) Doença de Crohn (Kruskal-Wallis,  $P=0,345$ ) e (B) Retocolite Ulcerativa (Kruskal-Wallis,  $P=0,061$ ).

A avaliação da expressão de mRNA de *TNF* em relação ao genótipo da região promotora do gene foi realizada em 19 pacientes com DC e 52 com RCU (Tabela 6). Foi observado que em pacientes com DC, o genótipo -238A-G (Mediana=0,39 folds; N=2) possui mais mRNA de *TNF* do que -238G-G (Mediana=0,02; N=17;  $P=0,047$ ), porém a diferença da expressão não é significativa após correção de Bonferroni. Não foi observada relação entre mRNA e os sítios polimórficos em pacientes com RCU.

#### 4.3.3 Nível de TNF circulante em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

Os níveis de TNF circulante foram quantificados em 27 pacientes com DC e 63 com RCU (Figura 14). Não foi identificada diferença nos níveis de expressão de TNF entre os pacientes com DC e RCU (Mann-Whitney,  $P=0,090$ ). E não foi observada diferença entre expressão de TNF no plasma (Tabela 6) com os genótipos de pacientes com DC (N=26) nem RCU (N=63).

**Tabela 6-** Comparação entre genótipos do gene *TNF* com a expressão de mRNA na mucosa intestinal e com a proteína TNF no plasma de pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa

Sítio de variação	Expressão de mRNA ( <i>folds</i> )					Nível no plasma (pg/mL)				
	N	Min	Max	Mediana	Pvalor	N	Min	Max	Mediana	Pvalor
<b>Doença de Crohn</b>										
<b>-1031T/C</b>										
C-C	2	0,04	0,62	0,33	0,233	2	0,00	0,00	0,00	0,782
C-T	2	0,00	0,12	0,06	0,323	5	0,00	1,33	0,00	
T-T	13	0,00	0,62	0,02		19	0,00	1,42	0,00	
<b>-863A/C</b>										
A-A	1	0,04	0,04	0,04	0,632	1	0,00	0,00	0,00	0,885
A-C	3	0,00	0,62	0,07		5	0,00	1,33	0,00	
C-C	14	0,00	0,62	0,02		20	0,00	1,42	0,00	
<b>-857C/T</b>										
C-C	18	0,00	0,62	0,02		25	0,00	1,42	0,00	0,698
C-T						1	0,00	0,00	0,00	
<b>-308G/A</b>										
A-G	5	0,00	0,62	0,02	0,500	8	0,00	1,33	0,00	0,611
G-G	14	0,00	0,67	0,04		19	0,00	1,42	0,00	
<b>-238G/A</b>										
A-G	2	0,12	0,67	0,39	<b>0,047</b>	2	0,00	0,00	0,00	0,529
G-G	17	0,00	0,62	0,02		24	0,00	1,42	0,00	
<b>Retocolite ulcerativa</b>										
<b>-1031C/T</b>										
C-C	1	0,09	0,09	0,09	0,836	1	1,12	1,12	1,12	0,467
C-T	25	0,00	1,26	0,06		27	0,00	1,72	0,00	
T-T	24	0,00	1,58	0,03		33	0,00	2,44	0,00	
<b>-863A/C</b>										
A-A	1	0,09	0,09	0,09	0,774	1	1,12	1,12	1,12	0,446
A-C	19	0,00	1,26	0,05		22	0,00	1,33	0,00	
C-C	30	0,00	1,58	0,04		38	0,00	2,44	0,00	
<b>-857C/T</b>										
C-C	47	0,00	1,58	0,05	0,648	56	0,00	2,44	0,00	0,714
C-T	4	0,01	0,13	0,07		6	0,00	1,19	0,56	
<b>-308A/G</b>										
A-G	11	0,00	1,58	0,08	0,425	13	0,00	2,44	0,00	0,884
G-G	41	0,00	1,44	0,05		50	0,00	2,40	0,00	
<b>-238A/G</b>										
A-G	6	0,01	0,22	0,07	0,834	5	0,00	1,72	0,00	0,965
G-G	46	0,00	1,58	0,05		58	0,00	2,44	0,00	

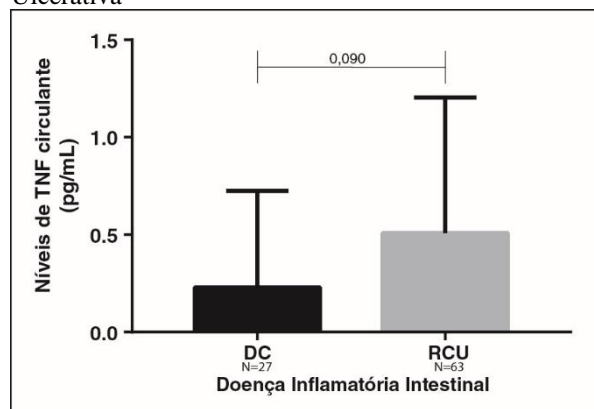
**Fonte:** O autor.

**Nota:** N= número amostral; Min= valor mínimo; Max= valor máximo. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, considerando  $P < 0,05$ ).

#### 4.4 Estudo da região promotora do gene *IL10* e expressão de IL-10 em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

Foi realizado o estudo de variabilidade genética da região promotora do gene *IL10* entre os indivíduos portadores de Doença Inflamatória Intestinal e os indivíduos saudáveis. Adicionalmente, os genótipos dos pacientes foram comparados aos níveis de expressão da molécula na mucosa intestinal e circulante na corrente sanguínea.

**Figura 14-** Comparação dos níveis circulantes de TNF entre pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa



**Fonte:** O autor.

**Legenda:** DC=Doença de Crohn; RCU=Retocolite Ulcerativa.

#### 4.4.1 Variabilidade genética da região promotora no gene *IL10*

As frequências de quatro sítios polimórficos da região promotora do gene *IL10*: -1082A/G (rs1800896), -819T/C (rs1800871), -657G/A (rs1800895) e -592A/C (rs1800872) foram determinadas em 68 indivíduos com Doença de Crohn e 137 indivíduos com Retocolite Ulcerativa e comparadas aquelas obtidas em 344 indivíduos saudáveis (Tabela 7). O sítio -592 foi incluído considerando o desequilíbrio de ligação com o sítio -819, onde na presença do alelo C na posição -819 acarreta na presença do mesmo alelo na posição -592 e a presença do alelo -819T está relacionado a presença do alelo A na posição -592 (PERREY et al., 1999).

Os pacientes com doença de Crohn apresentaram menor frequência do genótipo -1082G-G (Teste exato de Fisher, OR=0,25;  $P=0,014$ ) e maior frequência do alelo -657A (OR=2,82;  $P=0,034$ ) em relação aos indivíduos sadios. Foram identificados quatro haplótipos formados por esses quatro sítios polimórficos na região promotora do gene *IL10*, onde foi observado que o haplótipo -1082A: -819T: -657A: -592A foi mais frequente nos doentes quando comparados aos controles (OR=5,06;  $P=0,011$ ). Este é o único haplótipo encontrado que contempla os alelos -1082A e -657A, cuja presença foi relacionada a cinco vezes mais chance de desenvolver a doença.

Não foi observada diferença estatística comparando os pacientes com Retocolite Ulcerativa em relação aos controles saudáveis, nem nos quatro sítios polimórficos nem nos cinco haplótipos formados por estes sítios.

**Tabela 7-** Distribuição alélica e genotípica dos sítios polimórficos da região promotora do gene *IL10* em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil

Variáveis	População de estudo (%)			DC X CT			RCU X CT		
	DC	RCU	CT	Pvalor	OR	IC95%	Pvalor	OR	IC95%
<b>Alelo -1082A/G</b>									
A	68,97	61,69	60,65	0,108	1,44	0,93-2,23	0,809	1,04	0,76-1,43
G	31,03	38,31	39,35		0,69	0,45-1,07		0,96	0,70-1,31
A-A	43,10	39,52	39,13	0,653	1,18	0,66-2,11	1,000	1,02	0,65-1,59
A-G	51,72	44,35	43,04	0,241	1,42	0,80-2,53	0,823	1,05	0,68-1,64
G-G	5,17	16,13	17,83	<b>0,014</b>	0,25	0,07-0,84	0,769	0,89	0,49-1,59
<b>Alelo -819C/T</b>									
C	62,50	67,52	61,34	0,847	1,05	0,72-1,54	0,076	1,31	0,98-1,76
T	37,50	32,48	38,66		0,95	0,65-1,39		0,76	0,57-1,03
C-C	39,71	46,72	38,08	0,892	1,07	0,63-1,82	0,100	1,43	0,96-2,13
C-T	45,59	41,61	46,51	1,000	0,96	0,57-1,62	0,361	0,82	0,55-1,22
T-T	14,71	11,68	15,41	1,000	0,95	0,46-1,97	0,317	0,73	0,40-1,32
<b>Alelo -657A/G</b>									
A	5,15	2,57	1,89	0,034	2,82	1,10-7,20	0,465	1,37	0,54-3,48
G	94,85	97,43	98,11		0,36	0,14-0,91		0,73	0,29-1,85
A-A	0,00	0,74	0,00						
A-G	10,29	3,68	3,78	<b>0,032</b>	2,92	1,12-7,62	1,000	0,98	0,34-2,80
G-G	89,71	95,59	96,22	<b>0,032</b>	0,34	0,13-0,89	1,000	1,02	0,36-2,92
<b>Alelo -592A/C</b>									
A	37,50	32,48	38,66	0,847	0,95	0,65-1,39	0,076	0,76	0,57-1,03
C	62,50	67,52	61,34		1,05	0,72-1,54		1,31	0,98-1,76
A-A	14,71	11,68	15,41	1,000	0,95	0,46-1,97	0,317	0,73	0,40-1,32
A-C	45,59	41,61	46,51	1,000	0,96	0,57-1,62	0,361	0,82	0,55-1,22
C-C	39,71	46,72	38,08	0,892	1,07	0,63-1,82	0,100	1,43	0,96-2,13
<b>Haplótipos</b>									
ACGC	30,70	28,86	24,78	0,232	1,34	0,86-2,11	0,244	1,23	0,87-1,74
ATAA	5,26	2,85	1,09	<b>0,011</b>	5,06	1,51-16,9	0,123	2,67	0,84-8,49
ATGA	33,33	30,08	34,78	0,826	0,94	0,61-1,45	0,210	0,81	0,58-1,13
GCGC	30,70	37,40	37,61	0,192	0,74	0,47-1,14	1,000	0,99	0,72-1,36
GTGA	0,00	0,81	1,74	-	-	-	0,507	0,46	0,10-2,20
<b>Diplótipo</b>									
-1082A: -657A	5,26	2,85	1,09	<b>0,011</b>	5,06	1,51-16,88	0,123	2,67	0,84-8,49
-1082A: -657G	64,04	58,94	59,57	0,394	1,21	0,79-1,85	0,873	0,98	0,71-1,34
-1082G: -657G	30,70	38,21	39,35	0,105	0,68	0,44-1,06	0,808	0,95	0,69-1,31

**Fonte:** O autor.

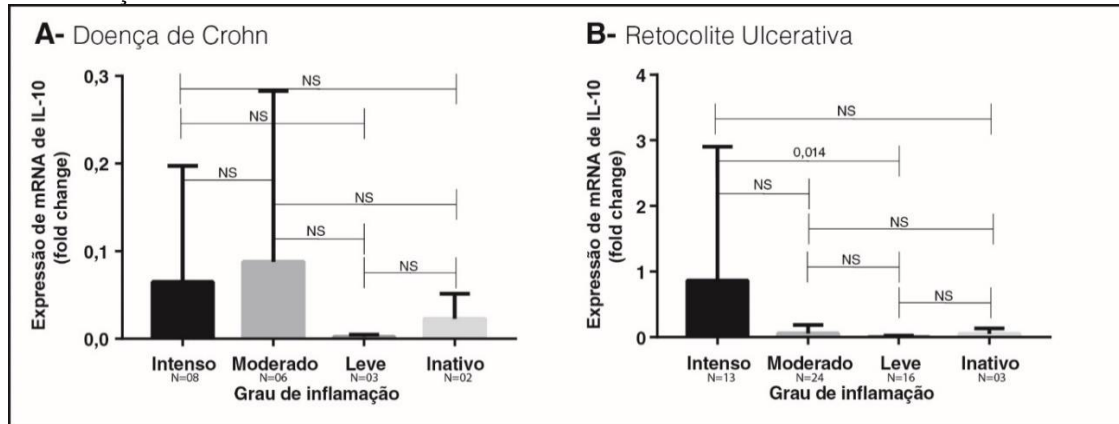
**Nota:** DC= Doença de Crohn; RCU= Retocolite ulcerativa; CT= Controle saudáveis; OR= Razão de Odds; IC95%= 95% Intervalo de confiança.

#### 4.4.2 Expressão de *IL10* na mucosa intestinal de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

Para avaliar a expressão do gene *IL10* foi realizada a quantificação relativa de mRNA de *IL10* em 19 pacientes com DC e 56 pacientes com RCU e comparadas quanto a gravidade da lesão, considerando o sítio de maior grau de inflamação do paciente (Figura 15). Não houve diferença entre a expressão de *IL10* em relação ao grau de inflamação nos pacientes com DC (Kruskal-Wallis,  $P=0,459$ ). Em RCU, foi observado que amostras com inflamação intensa

(N=13) tem maior expressão de *IL10* quando comparadas a amostras com inflamação leve (N=16;  $P=0,014$ ), porém perde a significância após correção por Bonferroni ( $P_{Bon}=0,081$ ).

**Figura 15-** Comparação entre grau de inflamação intestinal e expressão de mRNA de *IL10* em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa



Fonte: O autor.

Nota: NS= Não significativo. (A) Doença de Crohn (Kruskal-Wallis,  $P=0,459$ ) e (B) Retocolite Ulcerativa (Kruskal-Wallis,  $P=0,089$ ).

A avaliação da expressão de mRNA de *IL10* em relação ao genótipo da região promotora do gene foi realizada em 17 pacientes com DC e 54 com RCU (Tabela 8). Não foi encontrada relação entre nenhum dos sítios polimórficos avaliados com a expressão desta citocina na mucosa, nem em DC nem em RCU.

**Tabela 8-** Comparação entre genótipos do gene *IL10* com a expressão de mRNA na mucosa intestinal e com a proteína IL-10 e no plasma de pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa

(continua)

Sítio de variação	Expressão de mRNA (folds)					Nível no plasma (pg/mL)				
	N	Min	Max	Mediana	Pvalor	N	Min	Max	Mediana	Pvalor
<b>Doença de Crohn</b>										
<b>-1082A/G</b>										
A-A	7	0,001	0,485	0,000	0,4079	8	0	1,53	0,6	0,166
A-G	9	0,001	0,378	0,010		14	0	1,31	0	
<b>-819C/T</b>										
C-C	8	0,000	0,378	0,010	0,4893	7	0	1,43	0	<b>0,040</b>
C-T	5	0,001	0,043	0,000		14	0	7,06	0	
T-T	4	0,001	0,485	0,000		5	1,21	2,49	1,5	
<b>-657A/G</b>										
A-G	2	0,002	0,002	0,000	0,3676	2	1,23	1,5	1,36	0,258
G-G	15	0,000	0,485	0,010		24	0	7,06	0	
<b>-592A/C</b>										
A-A	4	0,001	0,485	0,000	0,4893	5	1,21	2,49	1,5	<b>0,040</b>
A-C	5	0,001	0,043	0,000		14	0	7,06	0	
C-C	8	0,000	0,378	0,010		7	0	1,43	0	

**Tabela 8-** Comparação entre genótipos do gene *IL10* com a expressão de mRNA na mucosa intestinal e com a proteína IL-10 e no plasma de pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa

Sítio de variação	Expressão de mRNA ( <i>fold</i> s)					Nível no plasma (pg/mL)				
	N	Min	Max	Mediana	Pvalor	N	Min	Max	Mediana	Pvalor
(conclusão)										
<b>Retocolite ulcerativa</b>										
<b>-1082A/G</b>										
A-A	18	0,001	6,972	0,010	0,2276	25	0	14,23	1,13	0,982
A-G	20	0,001	0,630	0,010		27	0	12,23	1,21	
G-G	8	0,001	0,032	0,010		7	0	4,71	1,51	
<b>-819C/T</b>										
C-C	23	0,001	6,972	0,020	0,6464	29	0	12,23	1,35	0,285
C-T	25	0,001	0,630	0,010		26	0	14,23	1,16	
T-T	6	0,001	0,231	0,030		8	0	2,76	0,56	
<b>-657A/G</b>										
A-G	1	0,025	0,025	0,020	0,6709	2	0	1,13	0,56	0,287
G-G	52	0,001	6,972	0,010		60	0	14,23	1,25	
<b>-592A/C</b>										
A-A	6	0,001	0,231	0,030	0,6464	8	0	2,76	0,56	0,285
A-C	25	0,001	0,630	0,010		26	0	14,23	1,16	
C-C	23	0,001	6,972	0,020		29	0	12,23	1,35	

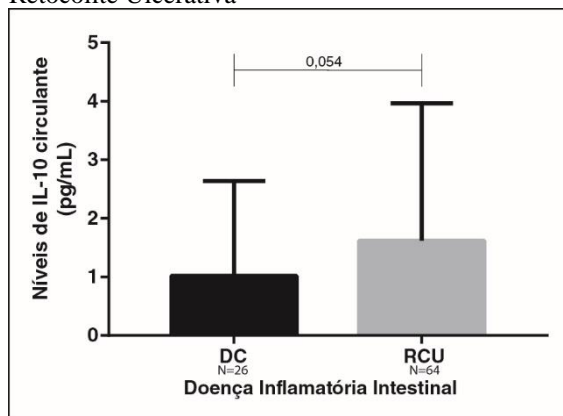
**Fonte:** O autor.

**Nota:** N= número amostral; Min= valor mínimo; Max= valor máximo. Foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, considerando  $P < 0,05$ ).

#### 4.4.3 Nível de IL-10 circulante em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

Os níveis de IL-10 circulante foram quantificados em 26 pacientes com DC e 64 com RCU (Figura 16). A maior expressão de IL-10 foi observada em paciente com RCU (Mediana=1,2 pg/mL) em relação aos com DC (Mediana=0; Mann-Whitney,  $P=0,054$ ).

**Figura 16-** Comparação dos níveis circulantes de IL-10 entre pacientes com Doença de Crohn e Retocolite Ulcerativa



**Fonte:** O autor.

**Legenda:** DC=Doença de Crohn; RCU=Retocolite Ulcerativa.

A maior expressão da citocina IL-10 foi observada em pacientes com DC portadores do genótipo -819T-T (Mediana=1,5pg/mL; N=5) quando comparado com aqueles de genótipo



-819C-T (Mediana=0; N=14;  $P=0,037$ ;  $P_{Bon}=0,112$ ) e genótipo -819C-C (Mediana=0; N=7;  $P=0,011$ ;  $P_{Bon}=0,032$ ). O mesmo foi observado no sítio -592A/C, onde indivíduos com genótipo -592A-A (Mediana=1,5 pg/mL; N=5) tem maior expressão de IL-10 plasmático do que os genótipos -592A-C (Mediana=0; N=14;  $P=0,037$ ;  $P_{Bon}=0,112$ ) e -592C-C (Mediana=0; N=7;  $P=0,011$ ;  $P_{Bon}=0,032$ ). Não foi observada relação entre níveis de IL-10 circulante e os sítios polimórficos do gene *IL10* em pacientes com RCU (Tabela 8).

#### **4.5 Estudo do íntron 1 do gene *IFNG* e expressão de IFN- $\gamma$ em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal**

Foi realizado o estudo de variabilidade genética do íntron 1 do gene *IFNG* entre os indivíduos portadores de Doença Inflamatória Intestinal e os indivíduos saudáveis. Adicionalmente, os genótipos dos pacientes foram comparados aos níveis de expressão da molécula na mucosa intestinal e circulante na corrente sanguínea.

##### 4.5.1 Variabilidade genética da região do íntron 1 do gene *IFNG*

A variação genética dos sítios +874T/A e +875(CA)<sub>n</sub> foi avaliada em 45 pacientes com DC e 94 pacientes com RCU em relação a 238 controles saudáveis (Tabela 9). Os alelos e genótipos do sítio +874 apresentam distribuição semelhante entre os grupos estudados. Em relação ao microsatélite, foram identificados sete alelos, (CA)<sub>11</sub> a (CA)<sub>17</sub>. No grupo controle saudável, os alelos (CA)<sub>12</sub> e (CA)<sub>13</sub> juntos correspondem a 88% dos alelos e o genótipo mais frequente foi o (CA)<sub>12</sub>-(CA)<sub>12</sub> (36,4%).

O alelo raro (CA)<sub>14</sub> do microsatélite foi mais prevalente em pacientes com DC em comparação com controles saudáveis (Teste exato de Fisher, OR=4,41,  $P=0,001$ ) e para pacientes com RCU (OR=3,2;  $P=0,03$ ). Considerando a frequência do genótipo, observou-se que microsatélites heterozigotos +875(CA)<sub>n</sub> aumentam as chances de desenvolver DC (OR=3,55;  $P=0,0003$ ) e RCU (OR=6,63;  $P<0,0001$ ). Corolário, as frequências de genótipos homozigotos (CA)<sub>12</sub>-(CA)<sub>12</sub> e (CA)<sub>13</sub>-(CA)<sub>13</sub> foram menores nos pacientes do que nos controles saudáveis, e não houve diferença na distribuição dos genótipos homozigotos entre os indivíduos com DC e RCU.

**Tabela 9-** Distribuição alélica e genotípica dos sítios polimórficos do íntron 1 do gene *IFNG* em pacientes com Doença de Crohn, Retocolite ulcerativa e Controles saudáveis em Recife, Brasil

Variáveis	População de estudo			DC X CT			RCU X CT		
	DC	RCU	CT	Pvalor	OR	IC95%	Pvalor	OR	IC95%
<b>Alelo +874T/A</b>									
A	64,44	61,70	62,18	0,723	1,10	0,69-1,76	0,929	0,98	0,69-1,39
T	35,56	38,30	37,82		0,91	0,57-1,45		1,02	0,72-1,45
A-A	46,67	37,23	38,24	0,320	1,41	0,74-2,68	0,901	0,96	0,59-1,57
A-T	35,56	48,94	47,90	0,144	0,60	0,31-1,16	0,903	1,04	0,65-1,68
T-T	17,78	13,83	13,87	0,492	1,34	0,56-3,14	1,000	1,00	0,50-1,99
<b>Alelo +875(CA)n</b>									
(CA) <sub>11</sub>	3,33	1,63	1,48	0,205	2,29	0,58-9,03	0,205	2,29	0,58-9,03
(CA) <sub>12</sub>	44,44	45,65	52,33	0,206	0,73	0,46-1,15	0,140	0,77	0,54-1,08
(CA) <sub>13</sub>	35,56	36,41	35,38	1,000	1,01	0,63-1,61	0,856	1,05	0,73-1,49
(CA) <sub>14</sub>	11,11	3,80	2,75	<b>0,001</b>	4,41	1,87-10,4	0,458	1,40	0,55-3,56
(CA) <sub>15</sub>	2,22	8,70	6,57	0,141	0,32	0,08-1,38	0,399	1,35	0,72-2,54
(CA) <sub>16</sub>	1,11	1,63	0,64	0,504	1,76	0,18-17,1	0,357	2,59	0,52-13,0
(CA) <sub>17</sub>	2,22	2,17	0,85	0,247	2,66	0,48-14,7	0,230	2,60	0,64-10,5
(CA) <sub>11</sub> -(CA) <sub>12</sub>	6,67	0,00	1,69	0,084	4,14	0,89-19,2	-	-	-
(CA) <sub>11</sub> -(CA) <sub>13</sub>	-	2,17	0,85	-	-	-	0,314	2,60	0,36-18,7
(CA) <sub>12</sub> -(CA) <sub>12</sub>	17,78	13,04	36,44	<b>0,016</b>	0,38	0,17-0,85	<b>&lt;0,0001</b>	0,26	0,14-0,51
(CA) <sub>12</sub> -(CA) <sub>13</sub>	40,00	54,35	21,61	<b>0,013</b>	2,42	1,23-4,74	<b>&lt;0,0001</b>	4,32	2,58-7,22
(CA) <sub>12</sub> -(CA) <sub>14</sub>	4,44	5,43	2,97	0,640	1,52	0,31-7,58	0,328	1,88	0,58-6,08
(CA) <sub>12</sub> -(CA) <sub>15</sub>	2,22	4,35	5,51	0,706	0,39	0,05-3,06	0,788	0,78	0,25-2,46
(CA) <sub>13</sub> -(CA) <sub>13</sub>	6,67	3,26	19,92	<b>0,034</b>	0,29	0,09-0,97	<b>&lt;0,0001</b>	0,14	0,04-0,45
(CA) <sub>13</sub> -(CA) <sub>14</sub>	11,11	-	1,27	<b>0,004</b>	9,54	2,19-41,5	-	-	-
(CA) <sub>13</sub> -(CA) <sub>15</sub>	-	7,61	5,08	-	-	-	0,431	1,54	0,59-4,04
(CA) <sub>13</sub> -(CA) <sub>16</sub>	2,22	1,09	0,85	0,409	2,66	0,24-30,0	1,000	1,29	0,12-14,4
(CA) <sub>13</sub> -(CA) <sub>17</sub>	4,44	1,09	1,27	0,183	3,61	0,59-22,3	1,000	0,85	0,09-8,32
(CA) <sub>14</sub> -(CA) <sub>15</sub>	2,22	2,17	1,27	0,505	1,77	0,18-17,4	0,622	1,73	0,28-10,5
Outros genótipos	2,22	5,43	1,27	0,505	1,77	0,18-17,4	0,042	4,46	1,04-19,1
<b>Genótipos acumulados</b>									
(CA) <sub>12</sub> -(CA) <sub>12</sub> e (CA) <sub>13</sub> -(CA) <sub>13</sub>	26,67	16,30	56,36	<b>0,0003</b>	0,28	0,14-0,57	<b>&lt;0,0001</b>	0,15	0,08-0,29
Todos heterozigotos	73,33	83,70	43,64		3,55	1,75-7,22		6,63	3,60-12,2
<b>DC X RCU</b>									
	<b>DC</b>	<b>RCU</b>		<b>Pvalor</b>	<b>OR</b>	<b>IC95%</b>			
(CA) <sub>14</sub>	11,11	3,80		0,030	3,20	1,2-8,6			
Não (CA) <sub>14</sub>	88,89	96,20			0,32	0,12-0,86			
(CA) <sub>12</sub> -(CA) <sub>12</sub>	17,78	13,04		0,453	1,40	0,54-3,8			
Não (CA) <sub>12</sub> -(CA) <sub>12</sub>	82,22	86,96			0,69	0,26-1,8			
(CA) <sub>12</sub> -(CA) <sub>13</sub>	40,00	54,35		0,146	0,56	0,27-1,2			
Não (CA) <sub>12</sub> -(CA) <sub>13</sub>	60,00	45,65			1,80	0,87-3,7			
(CA) <sub>13</sub> -(CA) <sub>13</sub>	6,67	3,26		0,394	2,10	0,41-11			
Não (CA) <sub>13</sub> -(CA) <sub>13</sub>	93,33	96,74			0,47	0,09-2,4			
(CA) <sub>12</sub> -(CA) <sub>12</sub> e (CA) <sub>13</sub> -(CA) <sub>13</sub>	26,67	16,30		0,174	1,90	0,79-4,4			
Todos heterozigotos	73,33	83,70			0,54	0,23-1,3			

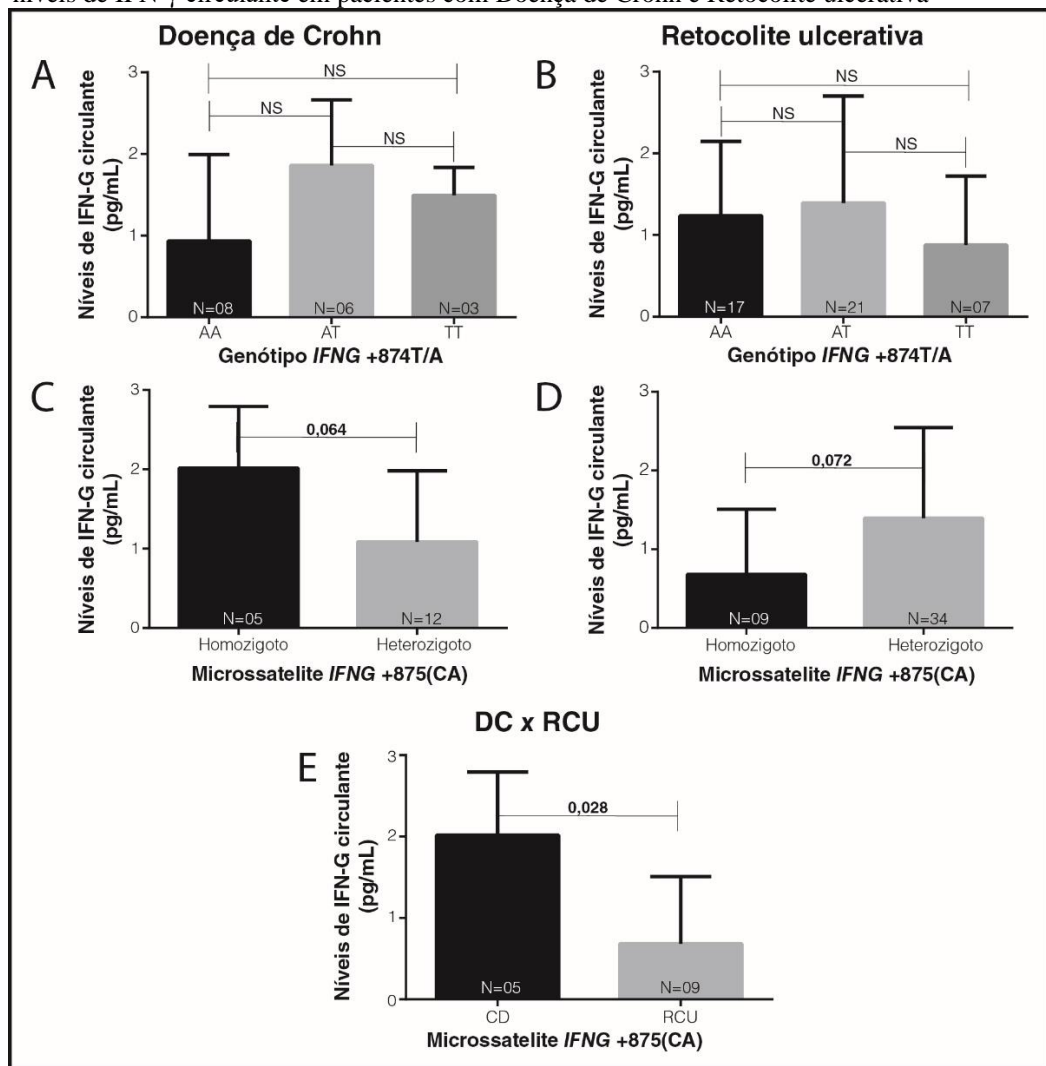
**Nota:** O autor.

**Nota:** DC= Doença de Crohn; RCU= Retocolite ulcerativa; CT= Controle saudáveis; OR= Razão de Odds; IC95%= 95% Intervalo de confiança.

#### 4.5.2 Nível de IFN- $\gamma$ circulante em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

Para avaliar a influência de polimorfismos genéticos na expressão de interferon- $\gamma$  circulante em pacientes com DC (N=e RCU, os genótipos foram comparados com a expressão de IFN- $\gamma$  no plasma dos pacientes (Figura 17A-D). Não foi encontrada relação significativa entre o genótipo +874T/A e os níveis de proteína circulante em pacientes com DII (Kruskal-Wallis,  $P=0,511$ ), nem quando os pacientes foram estratificados por doença, DC ( $P=0,361$ ) ou RCU ( $P=0,556$ ).

**Figura 17-** Comparação entre genótipos dos sítios +874T/A e +875(CA)<sub>n</sub> do gene *IFNG* e os níveis de IFN- $\gamma$  circulante em pacientes com Doença de Crohn e Retocolite ulcerativa



Fonte: O autor.

**Legenda:** Níveis plasmáticos de Interferon- $\gamma$  e expressão de mRNA de *IFNG* tecidual de acordo com os genótipos do intron 1 do gene *IFNG* em Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU). A-B, comparação dos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  de acordo com o genótipo +874T/A em DC (Kruskal-Wallis,  $P=0,361$ ) e RCU ( $P=0,556$ ). C-D, comparação dos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  de acordo com o genótipo +875(CA)<sub>n</sub> em DC (Mann-Whitney,  $P=0,064$ ) e RCU ( $P=0,072$ ). E, comparação dos níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  entre indivíduos com DC e RCU que possuem genótipo do microssatélite +875(CA)<sub>n</sub> em homozigose (Mann-Whitney,  $P=0,028$ ).

Em relação ao microssatélite de +875(CA)<sub>n</sub>, também não houve relação entre os níveis de genótipo e proteína circulante em pacientes com DII; no entanto, foi notada uma tendência na diferença de expressão de IFN- $\gamma$  em pacientes com DC e RCU, considerando o genótipo do microssatélite. Pacientes com DC e portadores de genótipo homozigoto apresentaram mais IFN- $\gamma$  circulante (Mediana=1,73) do que aqueles com genótipo heterozigoto (Mediana=1,31;  $P=0,064$ ), em contraste pacientes com RCU e portadores do genótipo heterozigoto (Mediana=1,40) apresentaram maior expressão de IFN- $\gamma$  do que os com genótipo homozigoto (Mediana=0,0;  $P=0,072$ ). Interessante notar que a mediana do nível plasmático de IFN- $\gamma$  em DC e RCU foi semelhante considerando os indivíduos portadores de microssatélites de genótipo heterozigotos ( $P=0,355$ ), mas pacientes com DC portadores de genótipo homozigoto apresentaram maiores níveis plasmáticos de IFN- $\gamma$  que pacientes com RCU (Figura 17E;  $P=0,028$ ). Não houve diferença no nível plasmático de IFN- $\gamma$  em pacientes portadores do genótipo (CA)<sub>12</sub>-(CA)<sub>12</sub> em comparação com quem tem o genótipo (CA)<sub>13</sub>-(CA)<sub>13</sub> (DC:  $P>0,999$ ; RCU:  $P=0,389$ ).

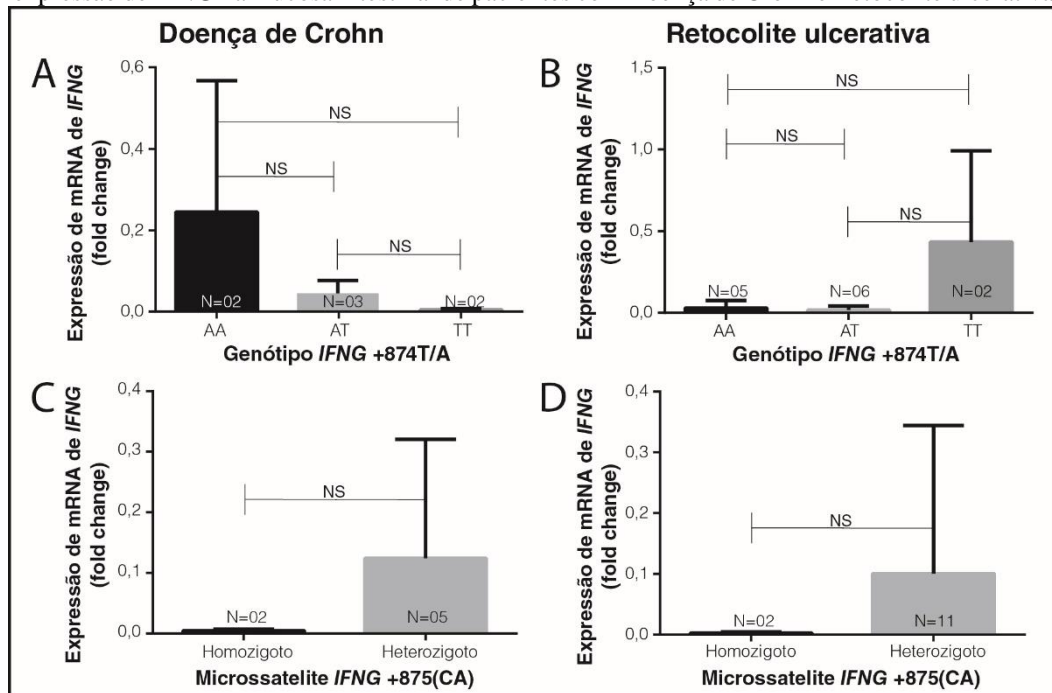
#### 4.5.3 Expressão de *IFNG* na mucosa intestinal de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

Para avaliar se os polimorfismos genéticos influenciariam a expressão de interferon-gama no sítio inflamatório, os genótipos foram comparados com a expressão do mRNA de *IFNG* na mucosa intestinal de pacientes com DC e RCU (Figura 18A-D). Não houve diferença entre os genótipos do sítio +874T/A e a expressão de mRNA em pacientes com DII (Kruskal-Wallis,  $P=0,863$ ), nem quando os pacientes foram classificados por doença, DC ( $P=0,181$ ) ou RCU ( $P=0,197$ ). Por outro lado, observou-se uma relação entre o genótipo do microssatélite +875(CA)<sub>n</sub> e a expressão de mRNA em pacientes com DII (Mann-Whitney,  $P=0,022$ ), mas ao estratificar a análise por doença, a relação não foi confirmada (CD:  $P=0,095$ ; RCU,  $P=0,154$ ), sugerindo uma limitação amostral.

#### 4.5.4 Correlação entre IFN- $\gamma$ circulante e expressão de mRNA na mucosa intestinal de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

A relação entre o nível de *IFNG* da mucosa e circulante foi avaliado pela correlação de Pearson. Não foi encontrada nenhuma relação entre o nível de IFN- $\gamma$  circulante e a expressão da mucosa local em pacientes com DC (Correlação de Pearson,  $P=0,743$ ;  $r^2=0,023$ ), ou com RCU ( $P=0,756$ ;  $r^2=0,013$ ).

**Figura 18-** Comparação entre genótipos dos sítios +874T/A e +875(CA)<sub>n</sub> do gene *IFNG* e a expressão de *IFNG* na mucosa intestinal de pacientes com Doença de Crohn e Retocolite ulcerativa



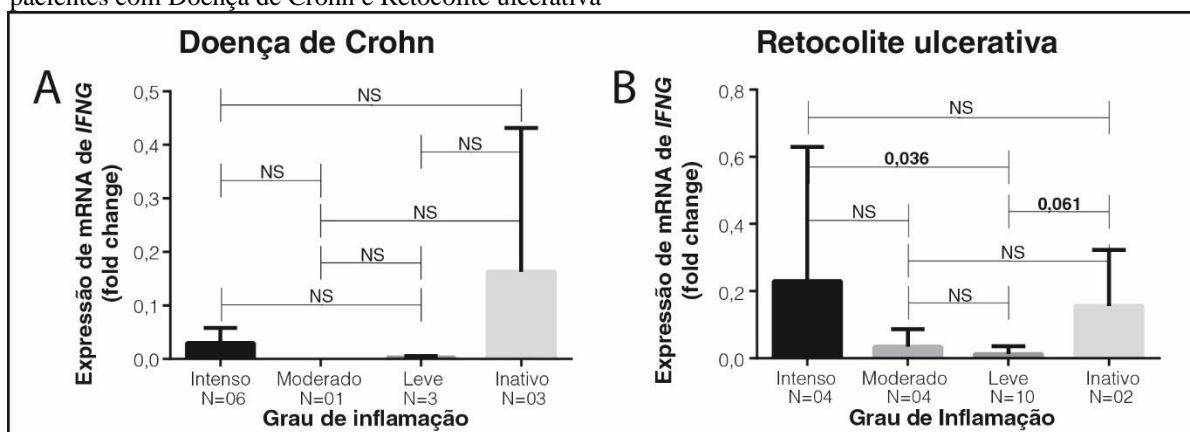
**Fonte:** O autor.

**Legenda:** A-B, comparação da expressão do mRNA do *IFNG* tecidual de acordo com o genótipo +874T/A em DC (Kruskal-Wallis,  $P=0,181$ ) e RCU ( $P=0,197$ ). C-D, comparação da expressão do mRNA do *IFNG* intestinal de acordo com o genótipo +875(CA)<sub>n</sub> em DC (Mann-Whitney,  $P=0,095$ ) e RCU ( $P=0,154$ ).

#### 4.5.5 Expressão de *IFNG* em lesão de mucosa intestinal em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

Como não houve relação entre o polimorfismo genético e a expressão de *IFNG* na mucosa intestinal na DII, verificamos se a expressão de mRNA de *IFNG* está relacionada ao grau de inflamação intestinal (Figura 19A-B), classificada em inativo (N=05), leve (N=13), moderada (N=05) e intensa (N=10). Observou-se que a quantidade de expressão de mRNA de *IFNG* na lesão intestinal aumentou com o grau de inflamação (Kruskal-Wallis,  $P=0,054$ ). Este efeito também foi observado em amostras de pacientes com RCU (Kruskal-Wallis,  $P=0,040$ ), mas não em DC ( $P=0,318$ ).

**Figura 19-** Comparação entre o grau de inflamação intestinal e a expressão de mRNA de *IFNG* na mucosa de pacientes com Doença de Crohn e Retocolite ulcerativa



Fonte: O autor.

**Legenda:** A-B, comparação da expressão do mRNA de *IFNG* no intestino de acordo com o grau de inflamação da mucosa em DC (Kruskal-Wallis,  $P=0,318$ ) e RCU ( $P=0,040$ ).

#### 4.6 Expressão de *HLA-G*, *TNF* e *IL10* em amostras pareadas na lesão de mucosa intestinal de pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

Com o objetivo de avaliar a relação entre a expressão de mRNA e proteína de *HLA-G* e mRNA das citocinas *TNF* e *IL10* e o grau de lesão de mucosa, minimizando a influência de sítios polimórficos que podem influenciar a expressão do gene, foi realizado teste pareado com duas amostras de biópsias de um mesmo paciente com DII, obtidas no mesmo procedimento cirúrgico de locais diferentes com diferentes graus de lesão intestinal.

As comparações dos resultados em relação a expressão gênica de *HLA-G5*, *IL10* e *TNF* e da proteína *HLA-G* foram realizadas da seguinte forma: i) comparações de amostras pareadas (obtidas do mesmo paciente), considerando dois diferentes graus de inflamação intestinal, por exemplo, comparação entre uma área de inflamação intensa com uma área com inflamação leve; ii) comparações de amostras pareadas, estratificadas de acordo com o subtipo de DII, DC e RCU; iii) comparações não pareadas de amostras de DII, estratificadas de acordo com os diferentes graus de inflamação e depois separadas de acordo com a doença; e iv) correlações entre as variáveis estudadas.

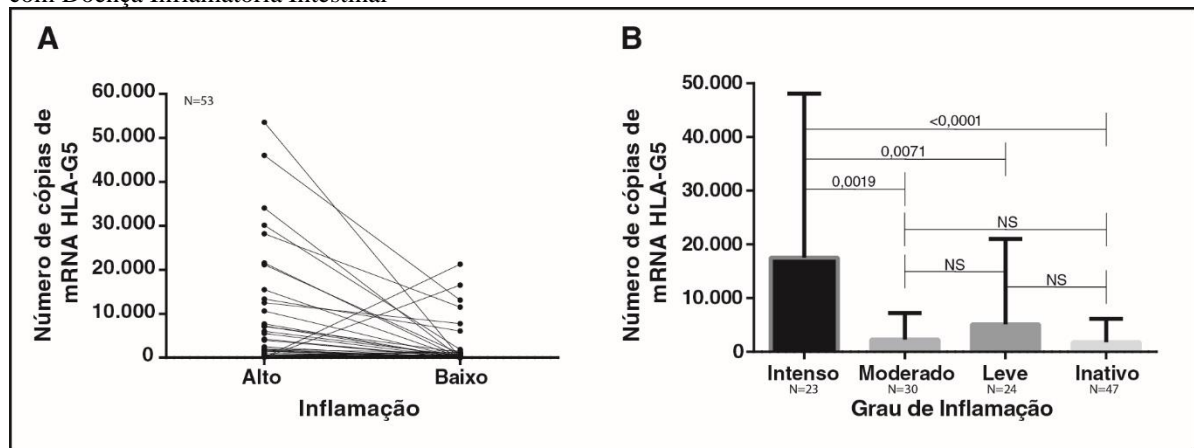
##### 4.6.1 Expressão de mRNA de *HLA-G* em lesão de mucosa intestinal

Considerando que o *HLA-G5* é a isoforma mais comum, foi analisada a expressão da isoforma *HLA-G5* quanto à gravidade da lesão, foram comparados os níveis de mRNA de *HLA-G5* em dois segmentos intestinais com diferentes graus de inflamação, obtidos do mesmo indivíduo no mesmo evento de biópsia. Para esta análise, foram avaliadas 106 amostras de 53

pacientes com DII, estratificados de acordo com o grau de inflamação: i) intenso/inativo (14 amostras), ii) intenso/leve (5 amostras), iii) intenso/moderado (3 amostras), iv) moderado/inativo (14 amostras), v) moderado/leve (4 amostras) e vi) leve/inativo (13 amostras). A expressão de *HLA-G5* observada em amostras de DII foi maior no segmento intestinal exibindo inflamação mais grave em comparação com áreas de menor inflamação ou ausência de inflamação ( $P < 0,0001$ ; Figura 20A). Resultados semelhantes foram observados quando estratificado pela doença em RCU ( $N=37$ ,  $P=0,001$ ) e DC ( $N=16$ ,  $P=0,030$ ).

A análise não pareada da expressão de mRNA de *HLA-G5* foi estudada em 124 amostras (DC=37; RCU=87). As amostras de DII classificadas como inflamação intensa ( $N=23$ ) apresentaram maior expressão quando comparadas às amostras apresentando inflamação moderada ( $N=30$ ;  $P_{Bon}=0,014$ ), leve ( $N=24$ ;  $P_{Bon}=0,041$ ) ou sem inflamação ( $N=47$ ;  $P_{Bon}=0,001$ ; Figura 20B). Também foi observada maior expressão de *HLA-G5* em áreas com inflamação intensa em comparação a áreas não inflamadas em amostras de DC ( $N=14$ ;  $P_{Bon}=0,006$ ) e em pacientes com RCU ( $N=33$ ;  $P=0,043$ ); no entanto, a significância foi perdida nas amostras de RCU após a correção de Bonferroni.

**Figura 20-** Comparação entre grau de inflamação intestinal e expressão de mRNA de *HLA-G5* em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal



**Fonte:** O autor.

**Legenda:** A, A expressão de mRNA de *HLA-G5* é menor no segmento intestinal com baixo grau de inflamação (Wilcoxon,  $P < 0,0001$ ); B, O tecido com inflamação intensa apresenta maior expressão de mRNA de *HLA-G5* (Kruskal-Wallis,  $P=0,0009$ ).

#### 4.6.2 Expressão da proteína HLA-G em lesão de mucosa intestinal

Para confirmar que a proteína também foi expressa em amostras intestinais, foi comparada a expressão da proteína HLA-G em dois cortes histológicos com diferentes níveis de inflamação obtidas do mesmo paciente no mesmo evento de biópsia (Figura 21). Primeiro,

foi testado se existia correlação entre a análise qualitativa em cruces com a análise quantitativa em pixels, mostrando um resultado significativo (Correlação de classificação de Spearman,  $P < 0,0001$ ,  $r^2 = 0,756$ ).

Em relação às amostras pareadas obtidas de 21 pacientes com DII, a expressão de proteína HLA-G em amostras apresentando inflamação intensa não foi diferente de amostras que apresentam menor grau de inflamação ( $P = 0,488$ ; Figura 22A), independentemente do tipo de doença (DC:  $N = 7$ ,  $P = 0,613$ ; RCU:  $N = 14$ ,  $P = 0,645$ ). Além disso, a análise não pareada de amostras de DII (DC=19; RCU=47) mostrou que a expressão de HLA-G não diferiu de acordo com o grau de inflamação ( $P = 0,180$ ; Figura 22B), independentemente do tipo de doença ( $P = 0,515$ ). Além do mais, os níveis de mRNA de *HLA-G5* não foram correlacionados com a proteína HLA-G total nas amostras de pacientes com DII, independente do grau de inflamação tecidual e tipo de doença ( $P > 0,05$ ), mas esse resultado deve ser interpretado com cautela porquê o anticorpo 4H84 reconhece todas as isoformas do HLA-G. Nas amostras sem inflamação, a proteína HLA-G foi detectada predominantemente nas células epiteliais intestinais, mas enquanto a inflamação progride, o a detecção do HLA-G na lâmina própria aumenta.

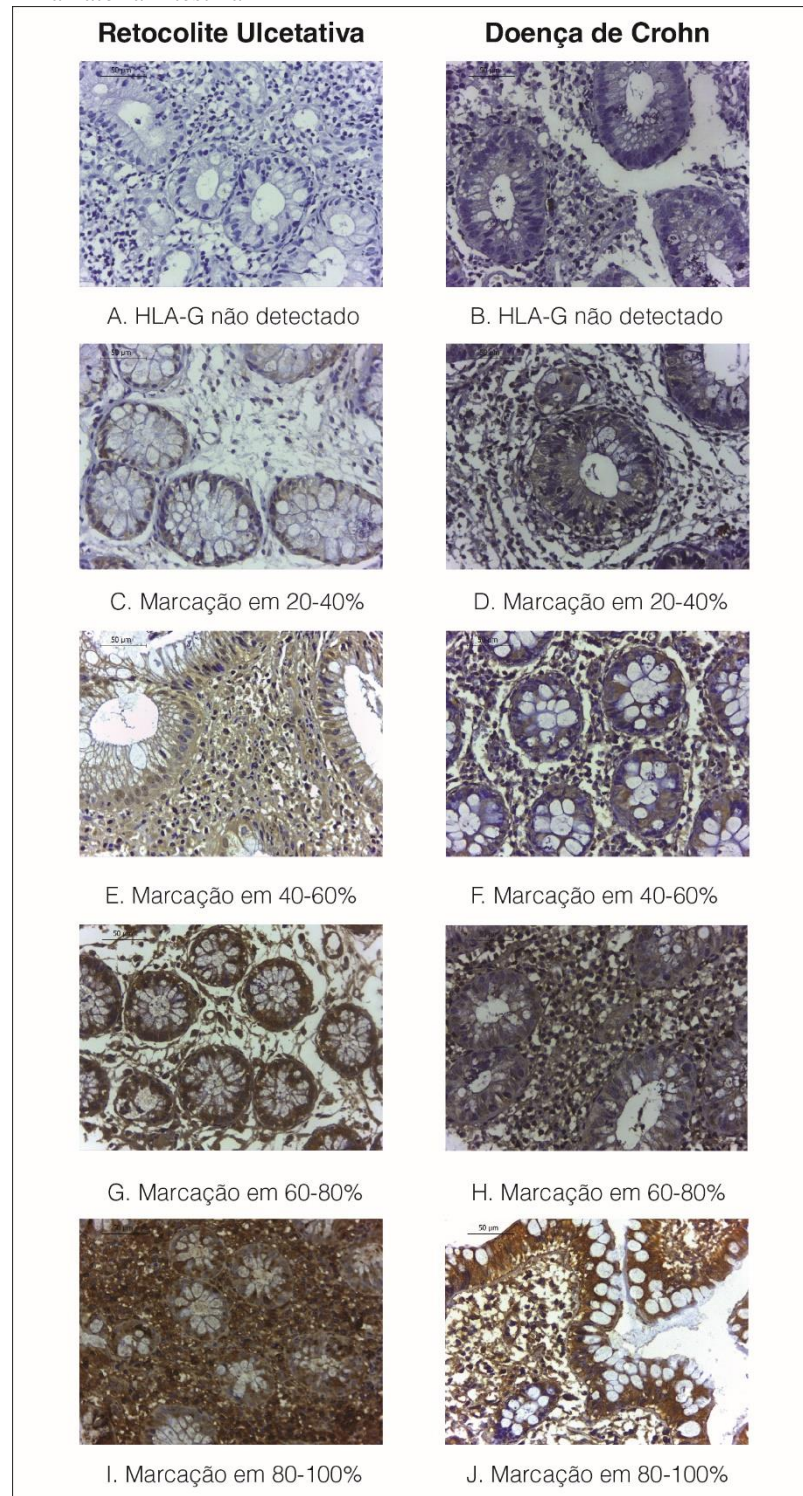
#### 4.6.3 Expressão de mRNA de *TNF* e *IL10* em lesão de mucosa intestinal

Considerando que a expressão de mRNA *HLA-G5* na lesão intestinal de pacientes com DII foi associada ao grau de inflamação, também avaliamos os níveis de expressão de *TNF* e *IL10* (Figura 23).

A expressão de mRNA de *TNF* em amostras pareadas de pacientes com DII foi maior na lesão intestinal apresentando maior grau de inflamação quando comparada a áreas que apresentam menor grau de inflamação ( $N = 34$ ;  $P = 0,0004$ ). Resultado semelhante foi observado para amostras de RCU ( $N = 23$ ;  $P = 0,001$ ), enquanto não houve diferença significativa para amostras de DC ( $N = 11$ ;  $P = 0,0731$ ). Além disso, na análise não-pareada, a expressão de mRNA de *TNF* foi maior em lesão com inflamação intensa em comparação com áreas sem inflamação ( $P_c = 0,001$ ) e com inflamação leve ( $P_c = 0,005$ ). Relação semelhante foi observada para amostras de DC, comparando áreas intensas com inflamação leve ( $P_c = 0,023$ ), moderada com leve ( $P_c = 0,017$ ) e moderada com sem inflamação ( $P_c = 0,057$ ). Na RCU, observamos uma tendência no aumento da expressão de *TNF* em amostras que apresentam inflamação intensa quando comparadas a áreas sem inflamação ( $P_c = 0,078$ ).



**Figura 21-** Níveis de proteína HLA-G intestinal em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

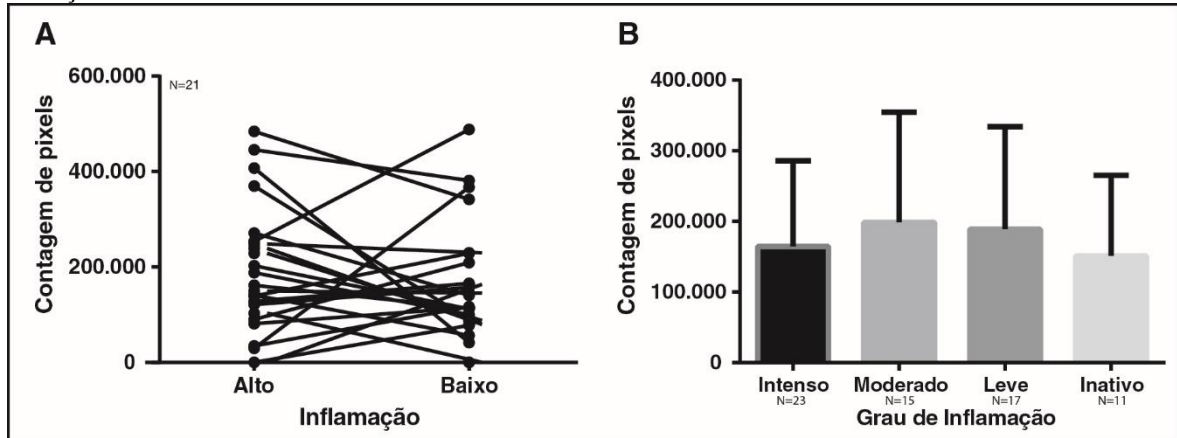


**Fonte:** O autor.

**Legenda:** Amostras intestinais de diferentes graus de inflamação obtidas de pacientes com doença ulcerativa (esquerda) e doença de Crohn (direita) foram submetidas à avaliação imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal 48H4 para detecção de todas as isoformas da proteína HLA-G. A proteína HLA-G tecidual foi variável, com espécimes apresentando níveis indetectáveis de HLA-G (A, B) ou 20-40% (C, D), 40-60% (E, F), 60-80% (G, H) e 80-100% (I, J) de marcação celular.

Nas análises de amostras intestinais pareadas de DII (N=38), a expressão de mRNA de *IL10* foi maior em amostras que apresentaram maior inflamação em comparação com áreas com menor inflamação ( $P=0,017$ ). Relação semelhante foi observada para amostras de DC (N=12;  $P=0,054$ ), enquanto não houve diferença significativa para amostras de RCU (N=26;  $P=0,099$ ).

**Figura 22-** Comparação entre o grau de inflamação intestinal e os níveis de proteína HLA-G em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal



Fonte: O autor.

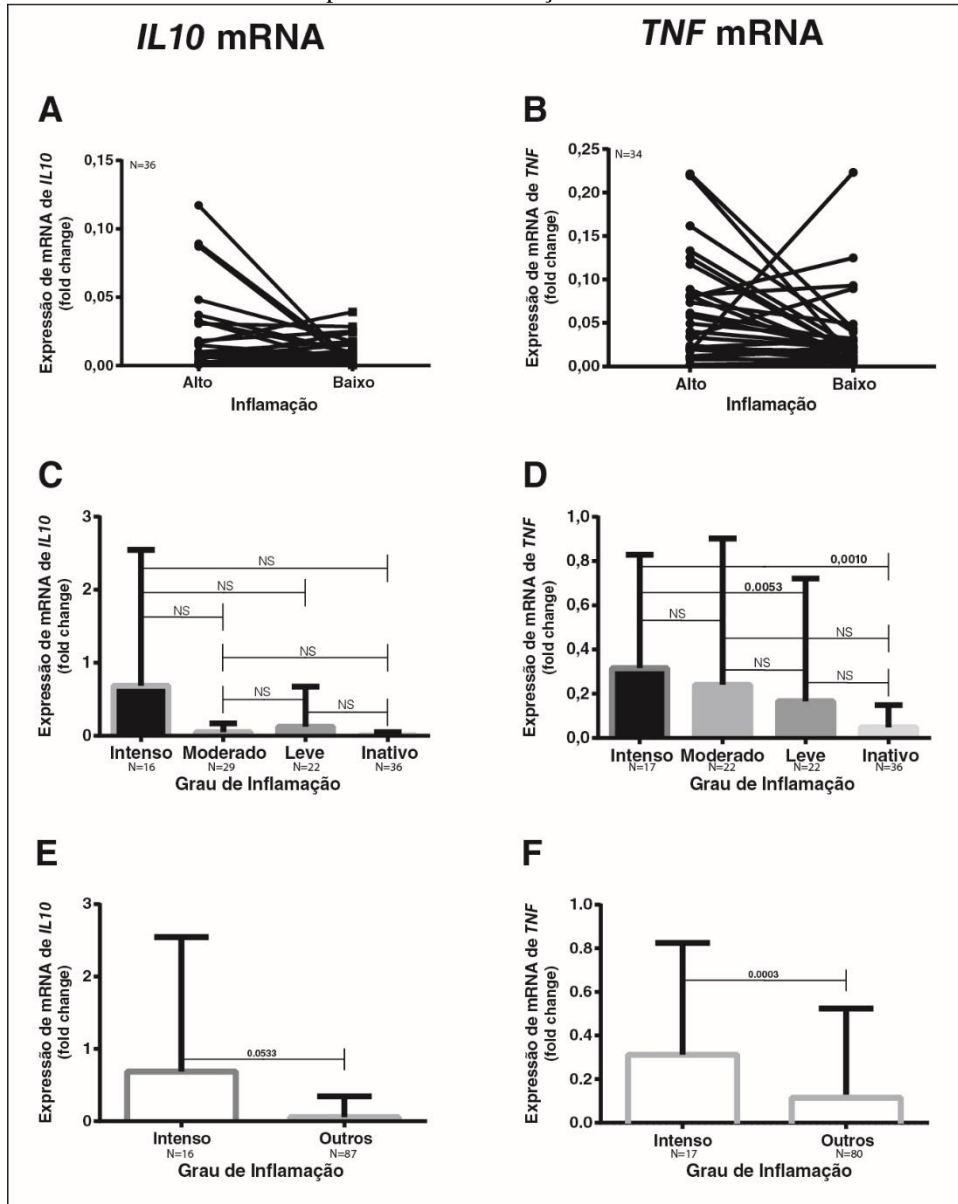
**Legenda:** A, Os níveis de proteína HLA-G em segmentos intestinais com diferentes níveis de inflamação no mesmo evento de biópsia do paciente são semelhantes ( $P>0,05$ ); B, Os níveis de proteína HLA-G nas seções histológicas não se correlacionaram com o grau de inflamação intestinal ( $P>0,05$ ).

Considerando o grau de inflamação em dados não-pareados, independentes, não foram observadas diferenças significativas para a expressão de mRNA de *IL10* em amostras de DII (N=103;  $P=0,136$ ); No entanto, em amostras de DC (N=32), observou-se níveis mais elevados de mRNA de *IL10* em áreas com inflamação intensa (N=7) em relação às áreas com inflamação leve (N=6;  $P=0,027$ ), mas as diferenças perderam a significância após a correção de Bonferroni. As amostras classificadas como inflamação moderada (N=8) apresentaram aumento da expressão de *IL10* quando comparada à inflamação leve ( $P=0,019$ ) e com amostras que sem inflamação (N=11;  $P=0,043$ ), mas as diferenças também perderam a significância após a correção de Bonferroni. Não foram observadas diferenças entre os níveis de expressão de mRNA de *IL10* e os graus de inflamação para amostras de RCU (N=71).

Para investigar o balanço entre a expressão de mRNA de *TNF* e de *IL10*, avaliamos a razão entre os níveis de expressão de *TNF* e *IL10*. Em áreas não inflamadas, a relação entre a expressão de mRNA de *TNF* e *IL10* foi semelhante para amostras de DC (3,5-folds) e para amostras de RCU (3,8-folds). No entanto, nas áreas inflamadas essa relação variou de acordo com o tipo de doença e com a gravidade da lesão. Enquanto na RCU, a relação entre os níveis de mRNA do *TNF/IL10* mostrou pequenas variações (3,1-folds para leve, 4,4-folds para

moderada e 5,4-folds para intensa inflamação intestinal), em DC essa relação exibiu uma clara variação (4,6-folds para inflamação leve, 9,7-folds para moderada e 9,2-folds para intensa inflamação intestinal).

**Figura 23-** Comparação entre os graus de inflamação intestinal e os níveis de expressão de mRNA de *TNF* e *IL10* em pacientes com Doença Inflamatória Intestinal

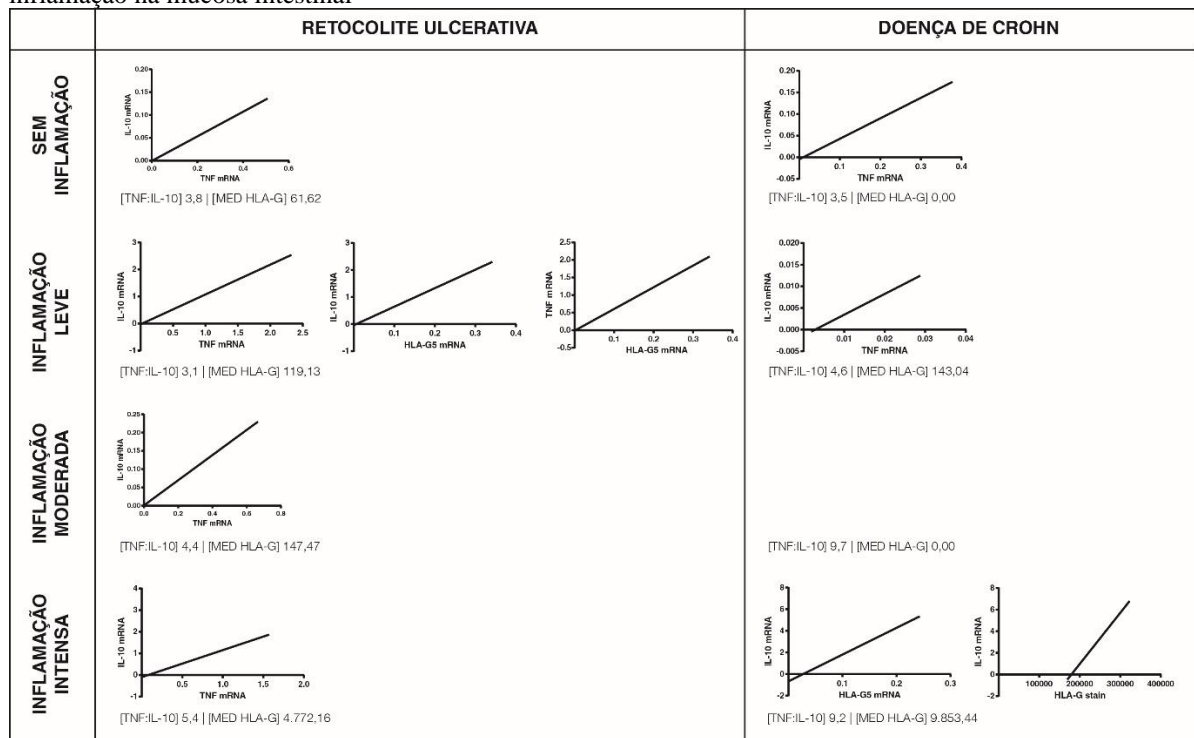


**Fonte:** O autor.

**Legenda:** A expressão de mRNA de *IL10* (A, C, E) e a expressão de mRNA de *TNF* (B, D, F) foram avaliadas por  $\Delta Cq$ , utilizando o gene *GAPDH* como referência passiva. Comparação da expressão de mRNA (A, B) em amostras pareadas de diferentes segmentos intestinais do mesmo evento de biópsia do paciente (Wilcoxon, *IL10*:  $P=0,017$ ; *TNF*:  $P=0,0004$ ); (C, D) expressão de mRNA na lesão intestinal de acordo com o grau de inflamação (Kruskal-Wallis, *IL10*:  $P=0,134$ ; Anova, *TNF*:  $P=0,001$ ); e (E, F) comparação da expressão de mRNA na lesão intestinal com inflamação intensa com níveis observados na menor inflamação, ou seja, subgrupo de inflamação moderada, leve ou inativa (Mann-Whitney, *IL10*:  $P=0,051$ ; *TNF*:  $P=0,0004$ ).

Para explorar ainda mais a influência recíproca da expressão do mRNA de *HLA-G*, *TNF* e *IL10*, várias correlações foram realizadas (Figura 24). Em DC, os níveis de mRNA de *IL10* e *TNF* foram positivamente correlacionados em áreas não inflamadas ( $P<0,0001$ ;  $r^2=0,993$ ) e em áreas com inflamação leve ( $P=0,023$ ;  $r^2=0,874$ ), enquanto em áreas com inflamação moderada/intensa, a correlação não foi estatisticamente significativa ( $P=0,062$ ;  $r^2=0,732$ ). Além disso, os níveis de mRNA de *IL10* correlacionou-se positivamente os níveis de mRNA de *HLA-G5* com ( $r^2=0,859$ ) e proteína HLA-G ( $r^2=0,982$ ) em áreas com inflamação intensa. Na RCU, os níveis de mRNA de *TNF* e *IL10* foram positivamente correlacionados nos grupos não-inflamado ( $P<0,0001$ ;  $r^2=0,958$ ), com inflamação leve ( $P<0,0001$ ;  $r^2=0,999$ ), moderada ( $P<0,0001$ ;  $r^2=0,945$ ) e intensa ( $P=0,014$ ;  $r^2=0,774$ ). Adicionalmente, foi observada uma correlação positiva significativa ( $P<0,0001$ ) entre os níveis de mRNA de *HLA-G* e *IL10* ( $r^2=0,946$ ) e entre os níveis de mRNA de *HLA-G* e *TNF* ( $r^2=0,941$ ) na mucosa intestinal exibindo inflamação leve.

**Figura 24-** Análises de correlação entre a expressão de mRNA de *HLA-G5*, *TNF* e *IL10* e níveis globais de proteína HLA-G de acordo com o tipo de doença, Retocolite Ulcerativa e Doença de Crohn, e o grau de inflamação na mucosa intestinal



**Fonte:** O autor.

**Nota:** A razão entre os níveis de mRNA de *TNF* e *IL10* [TNF: IL10] e a mediana do nível de mRNA de *HLA-G5* [MED HLA-G] é mostrado para cada situação.

## 5 DISCUSSÃO

A doença de Crohn (DC) e a Retocolite ulcerativa (RCU) são doenças inflamatórias crônicas da mucosa intestinal, com características clínicas e epidemiológicas distintas, e etiopatogenia não completamente esclarecida (BAUMGART; SANDBORN, 2007). A mucosa intestinal é uma barreira à penetração de patógeno e toxinas advindos da dieta, e a inflamação de mucosa é um mecanismo de proteção relacionado a imunidade inata, envolvendo os receptores Toll-like no reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (do inglês, *pathogen-associated molecular pattern*-PAMPS) não próprios e ativação do fator de transcrição NFκB, responsável por ativar a transcrição de genes relacionados a inflamação, como das citocinas TNF, IL-1, IL-18, quimiocinas, moléculas de adesão, dentre outras que irão recrutar células de defesa para o local do estímulo e promover a eliminação do patógeno, além de estimular a resposta imune adaptativa (ALLAIRE et al., 2018; LIU et al., 2017). O equilíbrio na produção desses mediadores da resposta imune inata é essencial para a eliminação do patógeno e retorno a homeostasia da mucosa, e variantes genéticas podem levar a desvios na produção desses mediadores, causando resposta imune inadequada na mucosa e desenvolvimento de patologias como a inflamação crônica na DC e RCU (KAMADA; ROGLER, 2016).

Dos cinco sítios polimórficos do gene *TNF* analisados, apenas o sítio -863C>A é sítio de ligação do fator de transcrição NFκB, com o alelo -863A associado a diminuição da expressão da proteína TNF (SKOOG et al., 1999; UDALOVA et al., 2000). No modelo dominante (-863A-C e -863A-A), a presença do alelo mutante aumentou em 1,7 vezes ( $P=0,024$ ) e o haplótipo -1031C/-863A/-857C em 1,5 vezes o risco de RCU, mas não em pacientes com DC. A associação entre o haplótipo -1031C/-863A/-857C e a predisposição a DC em indivíduos infante-juvenis também foi relatada em estudo canadense (SANCHEZ et al., 2009). E o estudo com a população indiana mostrou a associação do genótipo -863A-A, relacionado a baixa produção de TNF, com o aumento de 6 vezes o risco de RCU e de 3 vezes o risco de DC (AHIRWAR et al., 2012). Esses achados ressaltam a importância da via de ativação do NFκB na imunidade de mucosa nas doenças inflamatórias intestinais, mas deve-se considerar também que a expressão de *TNF* pode ser estimulada pelo próprio NFκB ou outros fatores de transcrição que reconhecem diferentes sequências no promotor do *TNF* (FALVO et al 2010).

Outros sítios polimórficos no gene *TNF* tem sido associado a susceptibilidade da DII em diferentes populações (AL-MEGHAISEEB et al., 2016; BONYADI et al., 2014;

FERGUSON et al., 2008; MAO; DONG; GAO, 2015; NADERI et al., 2014; RAHBAR KAFSHBORAN et al., 2014; SASHIO et al., 2002; YANG et al., 2006), inclusive já foi relatado que o alelo -308A é mais frequente em portadores de RCU oriundos da mesma localização geográfica da nossa população de estudo (TAVARES et al., 2016). Contudo, o presente estudo não encontrou associação entre o sítio polimórfico -308G/A e a susceptibilidade a DC ou RCU, esta diferença pode estar relacionada ao tamanho amostral e força de associação do nosso estudo que é superior ao estudo publicado.

A expressão de mRNA de *TNF* na mucosa intestinal e o nível circulante de TNF não estiveram associadas a nenhum genótipo específico em RCU, mas foi possível observar que os níveis de expressão de mRNA de *TNF* estavam associados à inflamação tecidual em amostras pareadas e não pareadas de pacientes com DC e em menor magnitude em pacientes com RCU. Níveis aumentados de proteína TNF na mucosa intestinal de pacientes com DII em relação a indivíduos saudáveis também foram relatados por outros estudos, e também maior expressão de TNF em áreas inflamadas do que em áreas intestinais não inflamadas, corroborando nossos achados de expressão de mRNA (AUTSCHBACH et al., 1998; GOLOGAN et al., 2013; LEÓN et al., 2009; MATSUDA et al., 2009).

A ausência de associação de genótipo do gene *TNF* com níveis de TNF circulante pode estar relacionada ao fato dos pacientes com doença ativa com indicação para colonoscopia e biópsia possam ter iniciado tratamento específico com anti-TNF antes da coleta, levando a diminuição de níveis da proteína TNF por neutralização, mas o tratamento não interfere na expressão de mRNA de *TNF* na mucosa (DANESE et al., 2013). O esquema terapêutico desses pacientes inclui o uso de infliximab ou adalimumab, ambos fármacos neutralizam tanto a forma solúvel como a forma ligada a membrana de TNF, e a forma ligada a membrana é responsável pela ativação específica do receptor TNFR2 em células T intraepiteliais na mucosa intestinal, e pelo agravo da colite (NEURATH, 2014).

TNF é o principal mediador na fase inicial da inflamação. A associação da expressão de *TNF* com grau de lesão de mucosa na RCU sugere que, apesar da sua expressão em resposta a ativação do NF $\kappa$ B pela imunidade inata não ser eficiente, outros mecanismos compensatórios podem ser deflagrados para aumentar sua expressão, tornando a regulação imune na mucosa menos efetiva com maior dano nas células intestinais (SEDDER; MCDERMOTT, 2014).

Em resposta a presença de antígeno não próprios, células imunes que infiltram a mucosa intestinal secretam IFN- $\gamma$ , que induzem o aumento da expressão de receptores de TNF, com o objetivo de ampliarem a resposta imune mediada pelo TNF na mucosa (AGGARWAL;

EESSALU; HASS, 1985). Dois sítios polimórficos no gene *IFNG* (+874T/A e o microsatélite +875(CA)<sub>n</sub>) têm sido associados a diferença na expressão da molécula (PRAVICA et al., 2000).

Alguns estudos têm mostrado associação do alelo +874T do gene *IFNG* com a suscetibilidade a doenças autoimunes como púrpura trombocitopenica (32% versus 12%, OR=3,3;  $P=0,009$ ) em pacientes turcos (PEHLIVAN et al., 2011), e com doença celíaca (59% versus 49%, OR=1,5;  $P=0,030$ ) em pacientes italianos (LIO et al., 2005). No vitiligo, o alelo +874T está associada a altos níveis de mRNA e proteína IFN- $\gamma$  no sangue periférico nos pacientes e gravidade da doença, mas não a suscetibilidade a doença na população indiana e na população egípcia (DWIVEDI et al., 2013; KARAM; ZIDAN; KHATER, 2017). Por outro lado, um estudo mostrou a associação do alelo +874T com proteção (37% versus 51%, OR=0,58;  $P=0,012$ ) a esclerose sistêmica em pacientes brasileiros (WASTOWSKI et al., 2009). Em relação a DII, nós não observamos associação entre alelos do sítio +874A/T e a ocorrência de DC ou RCU, semelhante ao relatado em um estudo com população canadense (CANTOR; NICKERSON; BERNSTEIN, 2005). Contudo, o genótipo +874A-A foi associado ao desenvolvimento de câncer colorretal em pacientes chineses (FEI et al., 2014), e que tal malignidade está frequentemente associada ao desfecho das DII (BAUMGART; SANDBORN, 2007).

O número de microsatélite do gene *IFNG* também varia com a população estudada. A frequência dos alelos (CA)<sub>12</sub> e (CA)<sub>13</sub> em nossa população foi menor (88%) do que o relatado para as populações italianas (DUFOUR et al., 2004) e indianas (DWIVEDI et al., 2013) (94%), e maior do que o relatado na população britânica (JAHROMI; MILLWARD; DEMAINE, 2000) (42%). A nível genotípico, nosso estudo mostrou uma predominância (36,4%) de (CA)<sub>12</sub>-(CA)<sub>12</sub> em indivíduos saudáveis, enquanto em indianos e italianos foi reportado um excesso de heterozigose, ou seja, 42% do genótipo (CA)<sub>12</sub>-(CA)<sub>13</sub>. Surpreendentemente, o genótipo homozigoto (CA)<sub>12</sub>-(CA)<sub>12</sub> foi relatado associado com doenças autoimunes, como anemia aplásica (Itália, 58%) (DUFOUR et al., 2004), vitiligo (Índia, 57%) (DWIVEDI et al., 2013) e diabetes tipo 1 (Reino Unido, 34, 3%) (JAHROMI; MILLWARD; DEMAINE, 2000). Enquanto em nosso estudo, os genótipos heterozigotos independentemente do número de resíduos (CA) estiveram associados com a DC e RCU. Não foi identificado na literatura outro estudo sobre as Doenças Inflamatórias Intestinais e o polimorfismo do microsatélite +875(CA)<sub>n</sub> do gene *IFNG*, sendo este o primeiro.

O genótipo +875(CA)<sub>12</sub>-(CA)<sub>12</sub> foi relatado associado a maiores níveis de IFN- $\gamma$  quando comparado a outros genótipos em indivíduos saudáveis (DWIVEDI et al., 2013; PRAVICA et al., 1999). No entanto, não observamos associação de altos níveis de IFN- $\gamma$  circulante com o

genótipo (CA)<sub>12</sub>-(CA)<sub>12</sub>, nem diferença nos níveis de IFN- $\gamma$  em pacientes portadores dos genótipos homozigotos (CA)<sub>12</sub>-(CA)<sub>12</sub> e (CA)<sub>13</sub>-(CA)<sub>13</sub>, nem entre o genótipo homozigoto (CA)<sub>12</sub>-(CA)<sub>12</sub> em relação aos demais genótipos.

Níveis elevados de IFN- $\gamma$  circulante em pacientes com DC foram relatados em relação aos controles, mas não em relação aos pacientes com RCU (KOROLKOVA et al., 2015). No entanto, esses autores não avaliaram a associação da expressão de IFN- $\gamma$  com microssatélites +875(CA)<sub>n</sub> do gene; e, infelizmente, não tivemos dados de controles saudáveis para comparar. Mais estudos devem ser realizados para investigar a influência da distribuição de microssatélites de +875(CA) entre diferentes populações, o que pode revelar diferenças na evolução do sistema imune. Além disso, estudos são necessários para confirmar se as diferenças na expressão de IFN- $\gamma$  entre pacientes portadores de microssatélites homozigotos para DC e RCU estão relacionados à regulação imunológica e manifestações clínicas, uma vez que em pacientes heterozigotos não houve diferenças nos níveis de IFN- $\gamma$  e o perfil da resposta imunológica diverge entre DC (Th1) e RCU (Th2).

Também não foi encontrado na literatura dados publicados associando os níveis de expressão de mRNA de *IFNG* na mucosa intestinal de pacientes com DII com o polimorfismo do gene *IFNG*. Na doença celíaca, a expressão de mRNA de *IFNG* na mucosa intestinal foi relatada ser semelhante antes e após o tratamento do paciente (BROTTVEIT et al., 2013), e alta em comparação com controles saudáveis (WAPENAAR et al., 2004). Os autores demonstraram que o polimorfismo de microssatélites +875(CA)<sub>n</sub> não foi associado à suscetibilidade à doença celíaca, mas não comparou a presença de polimorfismo e expressão de *IFNG* (RUEDA et al., 2004; WAPENAAR et al., 2004). Futuros estudos com mais pacientes com DII podem esclarecer se a expressão de *IFNG* na lesão intestinal pode influenciar os níveis circulantes de IFN- $\gamma$ , ou vice-versa, ou não.

Na DC, foi relatada secreção espontânea da molécula de IFN- $\gamma$  na mucosa intestinal (FAIS et al., 1991), e que os níveis de mRNA de *IFNG* e proteína no sangue periférico também eram altos em comparação com indivíduos saudáveis (FAIS et al., 1994; KOROLKOVA et al., 2015). Desta forma, é provável que a desregulação na expressão de IFN- $\gamma$  seja a principal causa e efeito da patogênese na DC, onde a alta expressão de *IFNG* na mucosa está contribuindo para aumentar o nível de IFN- $\gamma$  circulante, o que pode explicar a resposta imune Th1 associada à DC.

Os resultados obtidos no nosso estudo mostraram que o nível de mRNA de *IFNG* é alto na área de inflamação intensa do intestino em RCU, mas não em pacientes com DC. Esses dados devem ser interpretados com cautela devido ao baixo número de amostras avaliadas.



Níveis elevados de mRNA de *IFNG* na mucosa intestinal foram relatados em pacientes com DC e RCU em comparação com o grupo controle, mas nenhuma diferença foi encontrada entre áreas inflamadas e não inflamadas (LEÓN et al., 2009; NIESSNER; VOLK, 1995). No entanto, os autores desses estudos mostraram que o nível de proteína também era alto na mucosa intestinal de pacientes com RCU, independente do grau de inflamação tecidual, mas não na DC. Essa divergência pode ser explicada por fatores reguladores que agem diferentemente para suprimir a tradução do mRNA de *IFNG* em proteína em DC e em RCU. Uma evidência de que a regulação imunogenética é distinta em DC e RCU, é o fato de que os níveis circulantes de IFN- $\gamma$  em pacientes portadores de microssatélites +875(CA) homocigotos foram significativamente maiores em pacientes com DC do que em pacientes com RCU.

Um dos mecanismos utilizado pela mucosa intestinal para diminuir o reconhecimento de antígenos aos quais as células epiteliais são constantemente expostas é a expressão contínua de IL-10 pelos macrófagos e células dendríticas residentes na lâmina própria (AHLUWALIA; MAGNUSSON; ÖHMAN, 2017). IL-10 induz a proliferação de células Treg, e desta forma inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o interferon- $\gamma$ , mantendo ou restaurando a homeostasia da mucosa intestinal (OKUMURA; TAKEDA, 2016).

Dos cinco sítios polimórficos do gene *IL10* que avaliamos quanto a associação de alelos com o desenvolvimento da doença inflamatória intestinal, apenas o sítio -1082A>G mostrou diferença na distribuição da frequência de seus alelos entre pacientes e indivíduos saudáveis. O alelo -1082G está associado a alta produção de IL-10 (TURNER et al., 1997). Esse sítio está localizado no interior da sequência de reconhecimento para fatores de transcrição, cujo o alelo -1082G mutante permite a ligação de fatores de transcrição da família ETS (*E26 transformation specific*), que tem como função facilitar a ligação de outros fatores de transcrição no promotor do *IL10*, regulando a expressão da IL-10 em diferentes tipos de células T auxiliar (LI; LAU, 2007). O fator de transcrição ETS5 estimula a produção de IL-10 in vitro e in vivo, não interferindo na expressão de IFN- $\gamma$  nas células Th1, nem na expressão de IL-4 nas células Th2 (KOH et al., 2017), enquanto o fator de transcrição ETS1 inibe a expressão de IL-10 em células Th1 (GRENNINGLOH; KANG; HO, 2005), e talvez esteja associado a polarização da resposta Th2. Esse achado foi confirmado pelo modelo animal de camundongo deficiente em ETS1 que apresentou aumento da expressão de IL-10 em células Th1 e Th2, com diminuição da expressão de citocinas anti-inflamatórias IL-2 e IFN- $\gamma$  em células Th1, e diminuição da expressão de IL-4 em células Th2 (GRENNINGLOH; KANG; HO, 2005). O alelo -1082A selvagem também foi associado a menor expressão de IL-10 nas células B através do fator de transcrição SP1 que também reconhece o sítio -1082A>G (LARSSON et al., 2010). A regulação da expressão de

IL-10 ainda não está clara, mas aparentemente a produção de IL-10 pelos diferentes tipos de células na mucosa estaria relacionada a manutenção da homeostase da mucosa, e a menor expressão da proteína nas diferentes células, mediada por diferentes fatores de transcrição, que reconhecem o alelo selvagem -1082A do gene *IL10* interfere no equilíbrio das forças entre a ativação e inibição da expressão de diferentes citocinas e, consequente, resposta imune de mucosa.

É interessante notar que a presença do alelo -1082A (genótipos A-A e A-G), que está relacionado a menor expressão de IL-10, aumentou em 4 vezes o risco de os indivíduos apresentarem DC, mas não com RCU. Este fato explicaria o desenvolvimento da inflamação crônica intestinal em resposta a estimulação antigênica mantida pelas moléculas da dieta e substâncias liberadas por patógenos e microrganismos comensais residentes no lúmen intestinal, mas os níveis de mRNA de *IL10* tecidual foram semelhantes em ambas doenças e na DC não esteve associada a inflamação, já na RCU os níveis de mRNA de *IL10* tecidual estiveram associados com a inflamação. Alguns estudos demonstraram que a expressão de IL-10 no tecido intestinal na DC em relação ao paciente sem DC, e na RCU também em relação ao paciente sem RCU não apresentaram diferença significativa (AUTSCHBACH et al., 1998; LEÓN et al., 2009; PEARL et al., 2013), mas há relatos que a expressão de IL-10 tecidual é maior na DC e RCU em relação aos controles (MATSUDA et al., 2009; NIESSNER; VOLK, 1995). Da mesma forma, há controvérsias em relação a diferença na expressão de IL-10 tecidual em função do grau de inflamação, com achados demonstrando relação entre expressão de IL-10 e inflamação (AUTSCHBACH et al., 2002; NIESSNER; VOLK, 1995; PEARL et al., 2013), e achados demonstrando ausência de relação com a inflamação (GOLOGAN et al., 2013; INOUE et al., 1999).

Adicionalmente, avaliamos a expressão da mRNA de *IL10* em amostras de mucosa pareadas obtidas do mesmo paciente e no mesmo evento de biópsia, identificar diferenças na expressão de *IL10* associada com o grau de inflamação, minimizando o efeito dos sítios polimórficos, e as diferenças na microbiota e no processamento da amostra encontradas em análises não-pareadas. Similarmente ao que mostramos, níveis aumentados de mRNA de *IL10* também foram relatados em amostras de áreas inflamadas intestinais comparadas com áreas não inflamadas em pacientes com DII (AUTSCHBACH et al., 1998, 2002; NIESSNER; VOLK, 1995). No entanto, estudos mostram resultados controversos em UC, com níveis de expressão de mRNA de *IL10* na área inflamada intestinal menores (GOLOGAN et al., 2013; LEÓN et al., 2009), maiores (MATSUDA et al., 2009) ou sem diferença em relação a área não inflamada (INOUE et al., 1999). Segundo Autschbach et al. (1998), os níveis de mRNA e

proteína de IL-10 variam de acordo com a camada de células intestinais estudada. Os autores mostraram que os níveis de mRNA da *IL10* se correlacionaram com os níveis de proteína na área inflamada e nas biópsias intestinais não inflamadas. A coloração de IL-10 foi difusa na camada mucosa e esparsa na lâmina própria, sugerindo que a IL-10 é produzida principalmente por células epiteliais, com produção escassa por células mononucleares, principalmente macrófagos e células T, mas não por células B. No entanto, foi relatado que no intestino inflamado, os níveis de mRNA e proteína de IL-10 aumentaram na lâmina própria próximo à borda da mucosa na RCU, e espalharam-se na submucosa em amostras de CD (AUTSCHBACH et al., 1998).

Em relação aos níveis circulantes de IL-10, os estudos relatam resultados controversos. Os níveis de IL-10 circulantes em DC e RCU podem ser semelhantes (KOROLKOVA et al., 2015), ou superiores (KUCHARZIK et al., 1995) aos níveis de indivíduos controles sem a doença. Apenas o estudo de Szkaradkiewicz et al. (2009) mostrou que pacientes com RCU, e não DC, apresentaram níveis circulantes mais altos do que o grupo DC e do que o controle sem doença. Apesar de não termos dosagens de citocinas em pacientes saudáveis, os níveis circulantes de IL-10 observados foram maiores em RCU do que em DC. Considerando que a associação do genótipo de baixa produção de IL-10 foi encontrado apenas em pacientes com DC, e que na RCU os nível circulante de IL-10 foram mais altos do que em pacientes com DC, é possível que a patogênese da DC esteja relacionada a menor produção de IL-10 dependente do fator de transcrição ETS na manutenção do equilíbrio da reação imune na mucosa, levando a cronificação da inflamação e a polarização da resposta imune tipo Th1 que é característica da doença com maior produção de TNF de mucosa (CORREA et al., 2009; SHIH; TARGAN, 2008). Por outro lado, a RCU não está associada ao genótipo determinante da produção baixa de IL-10, o que sugere uma reação imune de mucosa mais controlada, onde a polarização da resposta imune Th2 característica da RCU, pode ser mediada por fatores de transcrição da família ETS através do aumento da expressão de IL-10 nas células Th2.

Evidências de que a citocina IL-10 também estimula a expressão da molécula HLA-G (HVIID et al., 2006), e que o HLA-G é capaz de modular a resposta imune inibindo a produção de TNF e IFN- $\gamma$  nas células T (SAURABH et al., 2018), sugere um possível papel para a molécula HLA-G na regulação da resposta imune na mucosa intestinal.

Em nosso estudo, a associação entre variantes genéticas relacionadas a presença de sítios polimórficos nas regiões reguladoras (5'URR e 3'UTR) do gene *HLA-G* foi investigada. Em relação a 5'URR do *HLA-G*, nove sítios polimórficos foram associados a proteção à RCU, e seus alelos estão relacionados a três haplótipos, 010102a, 010104a e 010104b já descritos

(CASTELLI et al., 2014a). Contudo, apenas os genótipos -762T-T, -716G-G e -689G-G estiveram associados a menor expressão de mRNA de *HLA-G* na mucosa intestinal, assim como o haplótipo formado por esses 3 sítios (-762T:-716G:-689G) em homozigose. O sítio polimórfico -762C>T está localizado na extremidade 3' do sítio de reconhecimento para o cAMP (CRE, posição -777 a -771), e na extremidade 5' para o sítio de reconhecimento pelo IFN- $\beta$  (ISRE, posição -754 a -743), sugerindo um possível envolvimento desse sítio (-762) indiretamente através do processo de interação de fatores de transcrição nos sítios vizinhos, ou diretamente por algum fator ainda não descrito (CASTELLI et al., 2014b).

Surpreendentemente, apenas o genótipo -1140A-A esteve associado a maior produção de mRNA de *HLA-G*, mas não a susceptibilidade a doença. A associação entre o alelo -1140T com a menor produção de HLA-G solúvel já foi relatada, e até o momento só há referência desse alelo no haplótipo G010102a em 30% de indivíduos brasileiros e também no haplótipo raro G010102e (DIAS et al., 2018). O sítio -1140 do gene HLA-G está em uma região envolvida na regulação espaço-temporal do HLA-G e a alteração neste sítio pode contribuir para distúrbio na expressão de HLA-G (SCHMIDT et al., 1993; YELAVARTHI et al., 1993). O fato de que todos nossos pacientes de RCU ou DC com haplótipo -762C:-716T:-689A em homozigose terem apresentado genótipo -1140A-A, mas o inverso não ser verdadeiro, sugere um possível desequilíbrio de ligação entre esses sítios, que devem ser avaliados em futuros experimentos.

Em relação a região 3'UTR, a associação entre a presença do alelo +3003C e a susceptibilidade a RCU foi encontrada apenas no grupo de indivíduos com ancestralidade africana. A menor frequência do alelo +3003C nos indivíduos de ancestralidade africana em relação aos indivíduos com ancestralidade caucasiana na população saudável estudada já foi reportada (LUCENA-SILVA et al., 2012), de forma que o aumento em 6 vezes na frequência do alelo +3003C em homozigose ou heterozigose observado nos pacientes em relação aos indivíduos saudáveis na população de pele negra (OR=6,0;  $P=0,006$ ; 47,2% vs 13,2%) evidencia que brasileiros afrodescendentes portadores deste alelo sejam mais susceptíveis ao desenvolvimento da RCU. (MATRICON; BARNICH; ARDID, 2010). O haplótipo UTR-4 formado pelos oito sítios polimórficos +2960(14pb)Del: +3003C: +3010G: +3027C: +3035C: +3142C: +3187A: +3196C, foi o único associado com a susceptibilidade ao desenvolvimento de RCU. Esse haplótipo inclui, além do alelo +3003C, os alelos +3010G e +3142C que são sítios de microRNAs (CASTELLI et al., 2010), e cujos alelos contrários estiveram associados a proteção. Os sítios +3010 e +3142 apresentaram desequilíbrio de ligação, mas não foi encontrado diferença estatística entre os diplótipos formado por esses sítios polimórficos e a expressão de sHLA-G (CC:GG=16,64pg/mL; GG:CC=12,48pg/mL; e CG:CG=14,74;

$P=0,568$ ), porém pacientes homozigotos para +3010C:+3142G apresentaram menor número de cópias de mRNA de *HLA-G5* na mucosa intestinal em relação aos pacientes homozigotos +3010G:+3142C (221 versus 567 cópias,  $P=0,079$ ), mas sem significância estatística. Adicionalmente, a presença de haplótipo UTR-4 já foi relacionado a presença do haplótipo G010101 da 5'URR do gene *HLA-G* (CASTELLI et al., 2014a), que inclui os alelos -762C:-716T:-689A, sequência associada a pacientes com RCU que apresentaram maiores níveis de mRNA do *HLA-G* na mucosa intestinal. Esse achado sugere que a regulação da expressão de *HLA-G* em RCU tem um importante componente *cis* agindo no promotor do gene *HLA-G*, mas não em variantes genéticas da 3'UTR, e que possivelmente essa expressão de *HLA-G* na mucosa e no plasma seja regulada por diferentes mecanismos.

Em relação aos pacientes com DC, aparentemente polimorfismos na região 5'URR do gene *HLA-G* não contribuiu para a susceptibilidade à doença. Por outro lado, a presença do genótipo +2960(14pb)In-In na 3'UTR do gene *HLA-G* esteve associada a proteção da DC. Historicamente, o alelo +2960(14pb)In está associado a menor expressão de *HLA-G* (HVIID et al., 2003), mas não encontramos diferença estatística na expressão de mRNA de *HLA-G* na mucosa de pacientes portadores de alelo +2960(14pb)In ou alelo +2960(14pb)Del. Apesar de não estarem associados a susceptibilidade ou proteção a DC, os sítios +3010 e +3142 apresentaram desequilíbrio de ligação e diferença significativa na expressão de *HLA-G* em plasma (CC:GG=13,76pg/mL; GG:CC=6,95pg/mL; e o heterozigoto CG:CG=13,67;  $P=0,021$ ), mas não na expressão de mRNA de *HLA-G5* na mucosa intestinal ( $P=0,994$ ). Esses achados confirmam as diferenças imunogenéticas entre a DC e a RCU.

No estudo das amostras pareadas do mesmo indivíduo, demonstramos a presença da proteína *HLA-G* em diferentes segmentos da mucosa intestinal de pacientes com DC e RCU. Torres et al. (2004) relataram a presença de proteína *HLA-G* em diferentes segmentos intestinais de amostras de RCU, mas não em amostras de DC, usando o mesmo anticorpo monoclonal 4H84 usado por nós. Os autores relataram que a expressão de *HLA-G* estava restrita à superfície apical das células epiteliais do intestino, e o padrão de coloração foi semelhante em áreas que exibiam ou não inflamação ativa (TORRES et al., 2004). Observamos também que a intensidade da marcação tecidual não estava relacionada ao grau de inflamação. Além disso, observamos que em áreas não inflamadas ou com inflamação leve a proteína *HLA-G* é observada predominantemente na camada epitelial, mas em áreas altamente inflamadas, os níveis de proteína também foram observados na lâmina própria. Além de em RCU e DC, o alto nível da proteína *HLA-G*, detectado usando os anticorpos monoclonais 4H84, MEM-G/1, MEM-G/2 e MEM-G/9, também foi observado em outros distúrbios intestinais, incluindo

doença celíaca e câncer colorretal (GUO et al., 2015; REIMERS et al., 2014; TORRES et al., 2006; ZHU et al., 2011).

O fato do nível de mRNA de *HLA-G5* não estar correlacionado com o nível de proteína HLA-G no tecido intestinal de pacientes com DII sugere uma expressão heterogênea de mRNA de *HLA-G* na mucosa intestinal, uma ideia que não pôde ser confirmada neste estudo, porque avaliamos apenas a expressão de mRNA da isoforma solúvel *HLA-G5*, enquanto todas as isoformas de *HLA-G* foram detectadas em amostras de DII usando o anticorpo 4H84. Este achado também pode ser uma evidência para a regulação pós-transcricional da expressão de HLA-G por moléculas como microRNAs. Diversos sítios de ligação de microRNA foram identificados na região 3'UTR do mRNA de *HLA-G* (CASTELLI et al., 2014b; MANASTER et al., 2012; PORTO et al., 2015). Adicionalmente, foi relatado que elevados níveis de expressão de miR-152 induz o padrão de expressão de mRNA de *HLA-G(+)*/proteína HLA-G(-) na linhagem celular MZ2905RC do carcinoma de células renais, contrastando com o nível miR-152 diminuído 1.000 vezes na linhagem celular JEG-3, que é uma célula que expressa mRNA de HLA-G(+)/proteína HLA-G(+) (JASINSKI-BERGNER et al., 2015). Além disso, esses autores relataram a associação de proteína HLA-G solúvel, mas não HLA-G ligada à membrana, com maior grau de câncer renal, corroborando nossa observação de que o grau de inflamação da mucosa intestinal em pacientes com DII estava associado aos níveis de mRNA de *HLA-G5* no tecido intestinal, mas não com os níveis globais de proteína HLA-G.

Análises de correlação entre a expressão de mRNA dos genes *HLA-G*, *IL10*, *IFNG* e *TNF* foram realizadas com as amostras de mesmo grau de inflamação e mostram que a expressão de mRNA de *IL10* está positivamente correlacionada com a expressão de mRNA de *TNF* em tecido intestinal não inflamado em CD e RCU, mas não com expressão de mRNA de *HLA-G5*, sugere que o equilíbrio entre as citocinas TNF e IL-10 seja importante para manter a homeostase do tecido.

Na DC, a expressão desbalanceada de mRNA de *TNF* e *IL10* foi devida à superexpressão de mRNA de *TNF* observada em áreas inflamadas moderadas/intensas. Esse resultado é o esperado para pacientes com DC que apresentam o alelo selvagem -863G de *TNF* e alelo mutante -1082A de *IL10*. O indivíduo com esse genótipo apresenta a expressão de mRNA de *TNF* via NFkB ativado pela resposta imune inata mediada pelos receptores toll-like preservada, e expressão de mRNA de *IL10* via os fatores de transcrição ETS5 em linfócitos T e SP1 em linfócitos B comprometida, de forma que a imunidade natural atribuída aos linfócitos intraepiteliais na homeostasia na mucosa pode estar ineficiente. Um estudo em células cultivadas obtidas de biópsias intestinais mostrou que o TNF é produzido por células

mononucleares da lâmina própria, mas não por células epiteliais (REIMUND et al., 1996). O TNF aumenta as citocinas pró-inflamatórias, induz a apoptose de células epiteliais intestinais e aumenta a expressão de metaloproteínas, causando lesão tecidual (NEURATH, 2014), corroborando com nossos resultados que mostraram o aumento da proporção entre níveis teciduais de mRNA *TNF* e *IL10* de 2,4 vezes em áreas com inflamação intensa do que em áreas com pouca ou sem inflamação. Apesar do aumento da expressão de mRNA de *IL10* ser discreto com o agravamento da lesão, nas áreas com intensa inflamação já se observa um aumento na expressão de mRNA *HLA-G5*, com correlação positiva com os níveis de mRNA de *IL10*, possivelmente produzidos pelas células imune que infiltraram a mucosa. Já foi demonstrado que o sHLA-G produzido pelas células mononucleares da lâmina própria pode induzir expressão elevada de TNF, piorando a lesão tecidual (VAN DER MEER et al., 2007), o que explicaria a gravidade das lesões em DC. Na espondilite anquilosante, outra doença inflamatória crônica, altos níveis de HLA-G ligados à superfície das PBMC também foram relatados como associados a altos níveis de TNF durante a fase aguda da doença, que foi reduzida em 3 meses após a terapia anti-TNF (CHEN et al., 2010). Nesse contexto, foi relatado que a terapia anti-TNF, mas não anti-IL-10, inibe várias vias pró-inflamatórias e melhora os sintomas de pacientes com DII (NEURATH, 2014), demonstrando que o balanço entre a expressão de TNF e IL-10 na mucosa intestinal exerce papel importante na homeostasia da mucosa.

Na RCU, a razão entre os níveis de mRNA de *TNF* e *IL10* nas áreas inflamadas aumentou muito pouco em comparação com as áreas não inflamadas. Além disso, seus níveis de expressão foram positivamente correlacionados em áreas não inflamadas e em áreas com inflamação leve, moderada ou intensa. Esse resultado é esperado para indivíduos susceptíveis a RCU com genótipo -863A do gene *TNF*, que apresentam uma diminuição da produção de TNF possivelmente associado a menor ativação da via NFκB relacionada a imunidade inata, mas com produção de IL-10 basal é preservada. No entanto, os níveis de mRNA de *TNF* e *IL10* foram positivamente correlacionados com os níveis de mRNA de *HLA-G5* apenas em áreas de inflamação leve. A literatura relata que os pacientes com RCU apresentam níveis elevados de macrófagos CD14<sup>+</sup> residentes na mucosa intestinal não inflamada/inativa e uma expressão difusa da quimiocina MIP-2α na camada de células epiteliais no intestino inflamado, o que pode contribuir para elevar o HLA-G ligado à membrana de células imunes e células secretoras de sHLA-G na inflamação intestinal (AUTSCHBACH et al., 2002). Observou-se que PBMC's cultivadas na presença de sHLA-G induz células mononucleares a produzir IL-10, TNF e INF-γ e diminui a expressão de IL-3; com uma regulação autócrina entre a expressão de IL-10 e

sHLA-G em células mononucleares (KANAI et al., 2001b, 2003). A descoberta de que o mRNA de *HLA-G5* estava correlacionado com os níveis de mRNA de *IL10* e *TNF* no intestino com inflamação leve na RCU sugere que a isoforma sHLA-G5 pode ter um papel na patogênese da RCU. De fato, IL-10 e HLA-G são requeridos pelas células dendríticas tolerogênicas (DC-10) para se diferenciar em células reguladoras Tr1 (GREGORI et al., 2010). Além disso, a presença de uma fonte de HLA-G ligada à membrana aumenta a produção de IL-4 e IL-3, mudando o padrão de resposta imune de Th1 (TNF e IFN- $\gamma$ ) para Th2 (IL-10 e IL-4) (KANAI et al., 2001a), essa última característica da RCU.

Conclui-se que a DC e RCU são duas patologias distintas na clínica, na epidemiologia e na patogênese, sendo a RCU caracterizada por um possível comprometimento da resposta imune inata, mostrando associação entre intensidade de inflamação de mucosa e ao aumento da expressão tecidual de mRNA de *HLA-G5*, *IL10* e *TNF*; enquanto que na DC encontramos uma menor expressão basal de mRNA de *IL10*, levando a um desequilíbrio na produção de mRNA de *TNF*, que em excesso contribui para o desenvolvimento de lesões graves de mucosa. Ainda identificamos que a alteração na expressão de mRNA de *HLA-G5* na RCU deve estar relacionada a maior produção determinada pela presença de sítios polimórficos na região promotora do gene, enquanto na DC aparentemente a regulação na expressão de HLA-G deve ser pós-transcricional, possivelmente por microRNAs nos sítios +3010 e +3142. Menos claro é o papel dos microsatélites de *IFNG* na DC e RCU, pois apesar do genótipo heterozigoto independentemente do número de repetições está associado a susceptibilidade de ambas as doenças, e os níveis de INF- $\gamma$  circulante ser semelhante no heterozigoto, a regulação da expressão nos homozigotos diferem, com os níveis mais altos em pacientes com DC, do que em RCU. Para responder essas perguntas outros estudos são necessários, contudo, nós já demonstramos com esses dados a importância na caracterização genética desses pacientes para a indicação de tratamento com biomoléculas.



## 6 CONCLUSÃO

- a) Na DC, foi encontrada baixa frequência do genótipo -1082G-G e maior frequência do genótipo dominante -657(AG+AA) de *IL10*, maior frequência do microssatélite *IFNG* (CA)heterozigoto, baixa frequência do genótipo +2960(14pb)In-In e maior frequência do genótipo +3027C-C do gene *HLA-G*, e nenhum polimorfismo no promotor do gene *TNF* foi observado.
- b) Na RCU, foi encontrada menor frequência do genótipo -863G-G do *TNF*, maior frequência do microssatélite *IFNG* +875(CA)heterozigoto, baixa frequência dos genótipos -1179G-G, -762T-T, -716G-G, -689G-G, -666T-T, -633A-A, 486C-C, 477G-G, -389A-A, +3003T-T, +3010C-C e 3142G-G e maior frequência do alelo -1121T do gene *HLA-G*, e nenhum polimorfismo no promotor do gene *IL10*.
- c) Níveis circulantes de IL-10 e sHLA-G são maiores em pacientes com RCU quando comparados com pacientes com DC, mas não houve diferença nos níveis de TNF circulante. Os níveis de IFN- $\gamma$  circulante foi superior em pacientes com DC dentre os pacientes que apresentaram genótipo homozigoto para o microssatélite, e semelhantes entre pacientes que apresentaram genótipo heterozigoto.
- d) A expressão de mRNA de *TNF*, *IL10* e *IFNG* na mucosa intestinal variou de acordo com o grau de inflamação nos pacientes com RCU, enquanto a expressão de mRNA de *HLA-G5* variou de acordo com a inflamação em RCU e em DC.
- e) O nível de proteína HLA-G na mucosa intestinal não variou com a inflamação em RCU ou DC.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 7 ed. São Paulo: Elsevier, 2012.

ABEDIANKENARI, S. et al. Dendritic cells bearing HLA-G inhibit T-Cell activation in type 1 diabetes. **Iranian journal of allergy, asthma, and immunology**, Tehran, v. 6, n. 1, p. 1–7, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17303922>>. Acesso em: 13 fev. 2016.

ABRAHAM, C.; CHO, J. Interleukin-23/Th17 pathways and inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, New York, v. 15, n. 7, p. 1090–1100, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19253307>>. Acesso em: 13 jul. 2017.

AGGARWAL, B. B.; EESSALU, T. E.; HASS, P. E. Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. **Nature**, London, v. 318, n. 6047, p. 665–667, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3001529>>. Acesso em: 6 fev. 2017.

AHIRWAR, D. K. et al. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  (C-863A) polymorphism in pathogenesis of inflammatory bowel disease in Northern India. **Journal of gastrointestinal cancer**, New York, v. 43, n. 2, p. 196–204, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21249467>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

AHLUWALIA, B.; MAGNUSSON, M. K.; ÖHMAN, L. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. **Scandinavian journal of gastroenterology**, Oslo, v. 52, n. 11, p. 1185–1193, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28697651>>. Acesso em: 07 fev. 2018.

AL-MEGHAISEEB, E. S. et al. Association of tumor necrosis factor- $\alpha$  and - $\beta$  gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. **Journal of inflammation research**, Auckland, v. 9, p. 133–140, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27382325>>. Acesso em: 13 set. 2017.

ALCAMI, A.; KOSZINOWSKI, U. H. Viral mechanisms of immune evasion. **Trends in microbiology**, Cambridge, v. 8, n. 9, p. 410–418, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10989308>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

ALLAIRE, J. M. et al. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. **Trends in immunology**, Oxford, p. 1–20, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29716793>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

AMIOT, L. et al. Expression of HLA-G by mast cells is associated with hepatitis C virus-induced liver fibrosis. **Journal of hepatology**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 245–252, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24036009>>. Acesso em: 13 set. 2016.

ATREYA, R. et al. Antibodies against tumor necrosis factor (TNF) induce T-cell apoptosis in patients with inflammatory bowel diseases via TNF receptor 2 and intestinal CD14<sup>+</sup> macrophages. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 141, n. 6, p. 2026–2038, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21875498>>. Acesso em: 25 mai. 2018.

AUTSCHBACH, F. et al. In situ expression of interleukin-10 in noninflamed human gut and in inflammatory bowel disease. **The American journal of pathology**, Philadelphia, v. 153, n. 1, p. 121–130, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9665472>>. Acesso em: 27 ago. 2017.

AUTSCHBACH, F. et al. Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. **Virchows Archiv: an international journal of pathology**, Berlin, v. 441, n. 5, p. 500–513, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12447682>>. Acesso em: 27 ago. 2017.

AWATA, T. et al. Association of polymorphism in the interferon gamma gene with IDDM. **Diabetologia**, Berlin, v. 37, n. 11, p. 1159–1062, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7867888>>. Acesso em: 20 mai. 2018.

BANK, S. et al. Associations between functional polymorphisms in the NFκB signaling pathway and response to anti-TNF treatment in Danish patients with inflammatory bowel disease. **The pharmacogenomics journal**, Avenet, v. 14, n. 6, p. 526–534, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24776844>>. Acesso em: 10 mai. 2018.

BAUMGART, D. C.; CARDING, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. **Lancet**, London, v. 369, n. 9573, p. 1627–1640, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499605>>. Acesso em: 15 mai. 2016.

BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. **Lancet**, London, v. 369, n. 9573, p. 1641–1657, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499606>>. Acesso em: 15 mai. 2016.

BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Crohn's disease. **Lancet**, London, v. 380, n. 9853, p. 1590–1605, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22914295>>. Acesso em: 15 mai. 2016.

BEAUREPAIRE, C.; SMYTH, D.; MCKAY, D. M. Interferon-gamma regulation of intestinal epithelial permeability. **Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, New York, v. 29, n. 3, p. 133–144, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196071>>. Acesso em: 7 mai. 2018.

BERG, D. J. et al. Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 98, n. 4, p. 1010–1020, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8770874>>. Acesso em: 30 mai. 2018.

BIDWELL, J. et al. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1. **Genes and immunity**, Houndmills, v. 2, n. 2, p. 61–70, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11393658>>. Acesso em: 13 jun. 2016.

BIJEN, C. B. M. et al. The prognostic role of classical and nonclassical MHC class I expression in endometrial cancer. **International journal of cancer**, New York, v. 126, n. 6, p. 1417–1427, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19728333>>. Acesso em: 15 mai. 2016.

BONYADI, M. et al. TNF-alpha gene polymorphisms in Iranian Azari Turkish patients with inflammatory bowel diseases. **Saudi journal of gastroenterology**: official journal of the Saudi Gastroenterology Association, Mumbai, v. 20, n. 2, p. 108–112, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24705148>>. Acesso em: 5 jul. 2018.

BROTTVEIT, M. et al. Mucosal cytokine response after short-term gluten challenge in celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. **The American journal of gastroenterology**, Philadelphia, v. 108, n. 5, p. 842–850, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23588237>>. Acesso em: 18 mai. 2018.

CANTOR, M. J.; NICKERSON, P.; BERNSTEIN, C. N. The role of cytokine gene polymorphisms in determining disease susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease. **The American journal of gastroenterology**, New York, v. 100, n. 5, p. 1134–1142, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15842590>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

CARDOSO, I. P. et al. Tuberculin skin testing in inflammatory bowel disease patients from an endemic area of Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases**: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases, Rio de Janeiro, v. 18, n. 1, p. 60–64, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055308>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends in immunology**, Oxford, v. 29, n. 3, p. 125–132, 2008. a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18249584>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

CAROSELLA, E. D. et al. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, Washington, v. 111, n. 10, p. 4862–4870, 2008. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18334671>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G: An Immune Checkpoint Molecule. **Advances in immunology**, New York, v. 127, v. 1, p. 33–144, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/bs.ai.2015.04.001>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

CASTELLI, E. C. et al. The genetic structure of 3' untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. **Genes and immunity**, Houndmills, v. 11, n. 2, p. 134–141, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19798077>>. Acesso em: 11 mai. 2016.

CASTELLI, E. C. et al. A comprehensive study of polymorphic sites along the HLA-G gene: implication for gene regulation and evolution. **Molecular biology and evolution**, New York, v. 28, n. 11, p. 3069–3086, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21622995>>. Acesso em: 11 mai. 2016.

CASTELLI, E. C. et al. Insights into HLA-G Genetics Provided by Worldwide Haplotype Diversity. **Frontiers in immunology**, Lausanne, v. 5, n. OCT, p. 476, 2014. a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25339953>>. Acesso em: 11 mai. 2016.

CASTELLI, E. C. et al. Transcriptional and posttranscriptional regulations of the HLA-G gene. **Journal of immunology research**, Cairo, v. 2014, p. 734068, 2014. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24741620>>. Acesso em: 11 mai. 2016.

- CHANG, S.; HANAUER, S. Optimizing pharmacologic management of inflammatory bowel disease. **Expert review of clinical pharmacology**, Abingdon, v. 10, n. 6, p. 595–607, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28475384>>. Acesso em: 23 nov. 2017.
- CHEN, C.-H. et al. Human leukocyte antigen-G in ankylosing spondylitis and the response after tumour necrosis factor- blocker therapy. **Rheumatology**, Oxford, v. 49, n. 2, p. 264–270, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20008091>>. Acesso em: 10 mar. 2016.
- CHEN, J. et al. Analysis of immunoglobulin-like transcripts (ILTs) in lymphocytes with sHLA-G and IL10 from SLE patients. **Clinical and experimental medicine**, Milano, v. 13, n. 2, p. 135–142, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22562117>>. Acesso em: 25 fev. 2016.
- CIRULLI, V. et al. The class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical class Ib antigen HLA-G. **Diabetes**, New York, v. 55, n. 5, p. 1214–1222, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16644675>>. Acesso em: 29 ago. 2015.
- CORREA, I. et al. Defective IL-10 production in severe phenotypes of Crohn's disease. **Journal of leukocyte biology**, New York, v. 85, n. 5, p. 896–903, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19237638>>. Acesso em: 29 ago. 2015.
- CRISA, L. et al. Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 186, n. 2, p. 289–298, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9221758>>. Acesso em: 16 fev. 2016.
- D'ALMEIDA, T. C. et al. Evolution of the levels of human leukocyte antigen G (HLA-G) in Beninese infant during the first year of life in a malaria endemic area: using latent class analysis. **Malaria journal**, London, v. 15, n. 1, p. 78, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26862036>>. Acesso em: 20 out. 2016.
- DANESE, S. et al. Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 130, n. 7, p. 2060–2073, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16762629>>. Acesso em: 25 mai. 2016.
- DANESE, S. et al. Review article: the role of anti-TNF in the management of ulcerative colitis -- past, present and future. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, Oxford, v. 37, n. 9, p. 855–866, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23489068>>. Acesso em: 25 mai. 2016.
- DE SOUZA, H. S. P.; FIOCCHI, C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. **Nature reviews. Gastroenterology & hepatology**, London, v. 13, n. 1, p. 13–27, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26627550>>. Acesso em: 17 jun. 2017.
- DI CRISTOFARO, J. et al. HLA-G haplotype structure shows good conservation between different populations and good correlation with high, normal and low soluble HLA-G expression. **Human immunology**, New York, v. 74, n. 2, p. 203–206, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23127550>>. Acesso em: 25 mar. 2018.

DIAS, F. C. et al. The Role of HLA-G Molecule and HLA-G Gene Polymorphisms in Tumors, Viral Hepatitis, and Parasitic Diseases. **Frontiers in immunology**, Lausanne, v. 6, n. FEB, p. 9, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25699038>>. Acesso em: 2 abr. 2016.

DIAS, F. C. et al. The genetic diversity within the 1.4 kb HLA-G 5' upstream regulatory region moderately impacts on cellular microenvironment responses. **Scientific reports**, London, v. 8, n. 1, p. 5652, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29618829>>. Acesso em: 1 jun. 2018.

DONADI, E. A. et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, Semimonthly, v. 68, n. 3, p. 369–395, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21107637>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

DUFOUR, C. et al. Homozygosity for (12) CA repeats in the first intron of the human IFN-gamma gene is significantly associated with the risk of aplastic anaemia in Caucasian population. **British journal of haematology**, Oxford, v. 126, n. 5, p. 682–685, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15327519>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

DWIVEDI, M. et al. Involvement of interferon-gamma genetic variants and intercellular adhesion molecule-1 in onset and progression of generalized vitiligo. **Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, New York, v. 33, n. 11, p. 646–659, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23777204>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

ELLIS, S. A.; PALMER, M. S.; MCMICHAEL, A. J. Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule. **Journal of immunology** (Baltimore, Md. : 1950), Baltimore, v. 144, n. 2, p. 731–735, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2295808>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

ESKELINEN, E.-L. The dual role of autophagy in cancer. **Current opinion in pharmacology**, Hauppauge, v. 11, n. 4, p. 294–300, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21498118>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics online**, Auckland, v. 1, p. 47–50, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19325852>>. Acesso em: 29 jun. 2018.

FAINARDI, E. et al. Emerging topics and new perspectives on HLA-G. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, Switzerland, v. 68, n. 3, p. 433–451, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21080027>>. Acesso em: 9 jul. 2016.

FAIS, S. et al. Spontaneous release of interferon gamma by intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. Kinetics of in vitro response to interferon gamma inducers. **Gut**, London, v. 32, n. 4, p. 403–407, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1902808>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

FAIS, S. et al. Interferon expression in Crohn's disease patients: increased interferon-gamma and -alpha mRNA in the intestinal lamina propria mononuclear cells. **Journal of interferon research**, New York, v. 14, n. 5, p. 235–238, 1994. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7861027>>. Acesso em: 20 jan. 2018.

FEI, B.-Y. et al. Association between the IFN- $\gamma$  and IL-1 genetic polymorphisms and colorectal cancer in the Chinese Han population. **Journal of genetics**, New Delhi, v. 93, n. 1, p. 235–239, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24840847>>. Acesso em: 29 jan. 2018.

FERGUSON, L. R. et al. Single nucleotide polymorphism in the tumor necrosis factor-alpha gene affects inflammatory bowel diseases risk. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 14, n. 29, p. 4652–4661, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18698679>>. Acesso em: 27 set. 2017.

FLAJOLLET, S. et al. RREB-1 is a transcriptional repressor of HLA-G. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), Baltimore, v. 183, n. 11, p. 6948–6959, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19890057>>. Acesso em: 9 fev. 2016.

FRÓES, R. de S. B. et al. The socio-economic impact of work disability due to inflammatory bowel disease in Brazil. **The European journal of health economics: HEPAC: health economics in prevention and care**, Berlin, v. 19, n. 3, p. 463–470, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28523493>>. Acesso em: 12 mai. 2018.

GARZIERA, M. et al. Association of the HLA-G 3'UTR polymorphisms with colorectal cancer in Italy: a first insight. **International journal of immunogenetics**, Oxford, v. 43, n. 1, p. 32–39, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26752414>>. Acesso em: 13 jun. 2017.

GERAGHTY, D. E.; KOLLER, B. H.; ORR, H. T. A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 84, n. 24, p. 9145–9149, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3480534>>. Acesso em: 20 jan. 2016.

GINEAU, L. et al. Balancing immunity and tolerance: genetic footprint of natural selection in the transcriptional regulatory region of HLA-G. **Genes and immunity**, Houndmills, v. 16, n. 1, p. 57–70, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25393930>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

GLAS, J. et al. The 14-bp deletion polymorphism in the HLA-G gene displays significant differences between ulcerative colitis and Crohn's disease and is associated with ileocecal resection in Crohn's disease. **International immunology**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 621–626, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17446213>>. Acesso em: 22 fev. 2016.

GLOCKER, E.-O. et al. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1246, n. 1, p. 102–107, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22236434>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

GLOCKER, E.; GRIMBACHER, B. Inflammatory bowel disease: is it a primary immunodeficiency? **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, Basel, v. 69, n. 1, p. 41–48, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21997382>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

GOBIN, S. J. P. et al. HLA-G transactivation by cAMP-response element-binding protein (CREB). An alternative transactivation pathway to the conserved major histocompatibility complex (MHC) class I regulatory routes. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 42, p. 39525–39531, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12183445>>. Acesso em: 26 fev. 2016.

GOLOGAN, S. et al. Inflammatory gene expression profiles in Crohn's disease and ulcerative colitis: a comparative analysis using a reverse transcriptase multiplex ligation-dependent probe amplification protocol. **Journal of Crohn's & colitis**, Amsterdam, v. 7, n. 8, p. 622–630, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23014361>>. Acesso em: 15 jan. 2016.

GONEN-GROSS, T. et al. The CD85J/leukocyte inhibitory receptor-1 distinguishes between conformed and beta 2-microglobulin-free HLA-G molecules. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), Baltimore, v. 175, n. 8, p. 4866–4874, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210588>>. Acesso em: 12 jan. 2016.

GRAY, P. W.; GOEDDEL, D. V. Structure of the human immune interferon gene. **Nature**, London, v. 298, n. 5877, p. 859–863, 1982. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6180322>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

GREGORI, S. et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. **Blood**, New York, v. 116, n. 6, p. 935–44, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20448110>>. Acesso em: 17 fev. 2016.

GRENNINGLOH, R.; KANG, B. Y.; HO, I.-C. Ets-1, a functional cofactor of T-bet, is essential for Th1 inflammatory responses. **The Journal of experimental medicine**, New York, v. 201, n. 4, p. 615–626, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15728239>>. Acesso em: 22 jun. 2018.

GÜNTHER, C. et al. Caspase-8 regulates TNF- $\alpha$ -induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. **Nature**, London, v. 477, n. 7364, p. 335–339, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21921917>>. Acesso em: 22 jun. 2018.

GUO, Z.-Y. et al. Predictive value of HLA-G and HLA-E in the prognosis of colorectal cancer patients. **Cellular immunology**, New York, v. 293, n. 1, p. 10–16, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25461612>>. Acesso em: 5 abr. 2017.

GUPTA, R. B. et al. Histologic inflammation is a risk factor for progression to colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a cohort study. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 133, n. 4, p. 1099–1105; quiz 1340–1, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17919486>>. Acesso em: 18 mai. 2016.

HUANG, Y. et al. IFNG+874A/T polymorphisms and IFNG CA repeat polymorphism associated with asthma in Asian--a meta-analysis. **The Journal of asthma: official journal of the Association for the Care of Asthma**, Ossining, v. 51, n. 10, p. 1014–1021, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24995662>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

HVIID, T. V. F. et al. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. **Immunogenetics**, New York, v. 55, n. 2, p. 63–79, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12712263>>. Acesso



em: 16 fev. 2016.

HVIID, T. V. F. et al. Polymorphism in the 5' upstream regulatory and 3' untranslated regions of the HLA-G gene in relation to soluble HLA-G and IL-10 expression. **Human immunology**, New York, v. 67, n. 1–2, p. 53–62, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16698426>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

IBRAHIM, E. C. et al. Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines. **Cell stress & chaperones**, New York, v. 5, n. 3, p. 207–218, 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11005379>>. Acesso em: 28 fev. 2016.

IKENO, M. et al. LINE1 family member is negative regulator of HLA-G expression. **Nucleic acids research**, Oxford, v. 40, n. 21, p. 10742–10752, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23002136>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

INOUE, S. et al. Characterization of cytokine expression in the rectal mucosa of ulcerative colitis: correlation with disease activity. **The American journal of gastroenterology**, New York, v. 94, n. 9, p. 2441–2446, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484006>>. Acesso em: 17 abr. 2016.

ISKANDAR, H. N.; CIORBA, M. A. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. **Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine**, New York, v. 159, n. 4, p. 313–325, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22424434>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

ITO, T. et al. Immunology of the human nail apparatus: the nail matrix is a site of relative immune privilege. **The Journal of investigative dermatology**, Baltimore, v. 125, n. 6, p. 1139–1148, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16354183>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

JAHROMI, M.; MILLWARD, A.; DEMAINE, A. A CA repeat polymorphism of the IFN-gamma gene is associated with susceptibility to type 1 diabetes. **Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, New York, v. 20, n. 2, p. 187–190, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10714554>>. Acesso em: 10 dez. 2017.

JASINSKI-BERGNER, S. et al. Clinical relevance of miR-mediated HLA-G regulation and the associated immune cell infiltration in renal cell carcinoma. **Oncoimmunology**, Philadelphia, v. 4, n. 6, p. e1008805, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26155421>>. Acesso em: 2 mar. 2016.

KAMADA, N.; ROGLER, G. The Innate Immune System: A Trigger for Many Chronic Inflammatory Intestinal Diseases. **Inflammatory intestinal diseases**, Basel, v. 1, n. 2, p. 70–77, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29922660>>. Acesso em: 17 set. 2017.

KANAI, T. et al. Human Leukocyte Antigen-G-Expressing Cells Differently Modulate the Release of Cytokines from Mononuclear Cells Present in the Decidua. New York, p. 94–99, 2001. a. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11216880>> Acesso em: 27 ago. 2017

KANAI, T. et al. Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture. **Molecular human reproduction**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 195–200, 2001. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11160846>> Acesso em: 27 ago. 2017

KANAI, T. et al. A subclass of soluble HLA-G1 modulates the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua additively to membrane-bound HLA-G1. **Journal of reproductive immunology**, Amsterdam, v. 60, n. 2, p. 85–96, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14638437>> Acesso em: 27 ago. 2017

KANCHAN, K. et al. Interferon- $\gamma$  (IFNG) microsatellite repeat and single nucleotide polymorphism haplotypes of IFN- $\alpha$  receptor (IFNAR1) associated with enhanced malaria susceptibility in Indian populations. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, Amsterdam, v. 29, p. 6–14, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25445652>>. Acesso em: 12 out. 2017.

KARAM, R. A.; ZIDAN, H. E.; KHATER, M. H. Genetic variants of interferon-gamma and its mRNA expression and inflammatory parameters in the pathogenesis of vitiligo. **Biochemistry and cell biology**, Ottawa, v. 95, n. 4, p. 474–481, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28273427>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. Regulation of intestinal homeostasis by innate and adaptive immunity. **International immunology**, Oxford, v. 24, n. 11, p. 673–680, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22962437>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, London, v. 474, n. 7351, p. 307–317, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21677747>>. Acesso em: 21 jan. 2016.

KIM, J. M. et al. Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), Baltimore, v. 148, n. 11, p. 3618–3623, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1350294>>. Acesso em: 16 fev. 2018.

KOH, B. et al. ETV5 Regulates IL-10 Production in Th Cells. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), Baltimore, v. 198, n. 5, p. 2165–2171, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28100679>>. Acesso em: 22 jun. 2018.

KOROLKOVA, O. Y. et al. Characterization of Serum Cytokine Profile in Predominantly Colonic Inflammatory Bowel Disease to Delineate Ulcerative and Crohn's Colitides. **Clinical medicine insights. Gastroenterology**, Auckland, v. 8, p. 29–44, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26078592>>. Acesso em: 10 jan. 2016.

KOSS, K. et al. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. **Genes and immunity**, Houndmills, v. 1, n. 3, p. 185–190, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11196710>>. Acesso em: 16 dez. 2015.

KOVATS, S. et al. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. **Science** (New York, N.Y.), New York, v. 248, n. 4952, p. 220–223, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2326636>>. Acesso em: 13 fev. 2016.

- KUCHARZIK, T. et al. Circulating antiinflammatory cytokine IL-10 in patients with inflammatory bowel disease (IBD). **Clinical and experimental immunology**, Oxford, v. 100, n. 3, p. 452–456, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7774055>>. Acesso em: 10 ago. 2017.
- KÜHN, R. et al. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. **Cell**, Cambridge, v. 75, n. 2, p. 263–274, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8402911>>. Acesso em: 10 ago. 2017.
- KUNA, A. T. Serological markers of inflammatory bowel disease. **Biochemia medica**, Zagreb, v. 23, n. 1, p. 28–42, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23457764>>. Acesso em: 12 ago. 2017.
- LAJOIE, J. et al. Characterisation of five novel HLA-G alleles with coding DNA base changes. **Tissue antigens**, Copenhagen, v. 72, n. 5, p. 502–504, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18937797>>. Acesso em: 11 abr. 2016.
- LANE, E. R.; ZISMAN, T. L.; SUSKIND, D. L. The microbiota in inflammatory bowel disease: current and therapeutic insights. **Journal of inflammation research**, Auckland, v. 10, p. 63–73, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28652796>>. Acesso em: 22 jan. 2018.
- LE DISCORDE, M. et al. Expression of HLA-G in human cornea, an immune-privileged tissue. **Human Immunology**, New York, v. 64, n. 11, p. 1039–1044, 2003. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14602233>>. Acesso em: 29 mar. 2016.
- LE DISCORDE, M. et al. HLA-G\*0105N Null Allele Encodes Functional HLA-G Isoforms 1. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 73, n. 2, p. 280–288, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15814900>>. Acesso em: 29 mar. 2016.
- LEÓN, A. J. et al. High levels of proinflammatory cytokines, but not markers of tissue injury, in unaffected intestinal areas from patients with IBD. **Mediators of inflammation**, Oxford, v. 2009, p. 580450, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19657406>>. Acesso em: 29 mar. 2016.
- LI, C. et al. Functional characterization of HLA-G<sup>+</sup> regulatory T cells in HIV-1 infection. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. e1003140, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23382678>>. Acesso em: 14 fev. 2016.
- LI, J. C. B.; LAU, A. S. Y. A role for mitogen-activated protein kinase and Ets-1 in the induction of interleukin-10 transcription by human immunodeficiency virus-1 Tat. **Immunology**, Oxford, v. 121, n. 3, p. 337–348, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17376198>>. Acesso em: 20 mai. 2018.
- LICHTENSTEIN, G. R. et al. Serious infection and mortality in patients with Crohn's disease: more than 5 years of follow-up in the TREAT<sup>TM</sup> registry. **The American journal of gastroenterology**, New York, v. 107, n. 9, p. 1409–1422, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22890223>>. Acesso em: 29 mar. 2016.
- LIO, D. et al. TNFalpha, IFNgamma and IL-10 gene polymorphisms in a sample of Sicilian patients with coeliac disease. **Digestive and liver disease**: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver, Roma, v.

- 37, n. 10, p. 756–760, 2005. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15979955>>. Acesso em: 10 ago. 2017.
- LIU, T. et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. **Signal transduction and targeted therapy**, London, v. 2, p. 17023, 2017. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29158945>>. Acesso em: 29 mai. 2018.
- LUCENA-SILVA, N. et al. Haplotype frequencies based on eight polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene in individuals from two different geographical regions of Brazil. **Tissue Antigens**, Copenhagen, 2012. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22283419>>. Acesso em: 11 mar. 2015.
- LUCENA-SILVA, N. et al. HLA-G 3' untranslated region polymorphisms are associated with systemic lupus erythematosus in 2 Brazilian populations. **The Journal of rheumatology**, Toronto, v. 40, n. 7, p. 1104–1113, 2013. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23678155>>. Acesso em: 11 mar. 2015.
- MACE, K. F. et al. Role of tumor necrosis factor in macrophage activation and tumoricidal activity. **Cancer research**, Chicago, v. 48, n. 19, p. 5427–5432, 1988. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3416299>>. Acesso em: 6 jan. 2018.
- MANASTER, I. et al. MiRNA-mediated control of HLA-G expression and function. **PloS one**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e33395, 2012. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22438923>>. Acesso em: 27 mar. 2015.
- MAO, Y. Q.; DONG, S. Q.; GAO, M. Association between TNF- $\alpha$  rs1799724 and rs1800629 polymorphisms and the risk of Crohn's disease. **Genetics and molecular research: GMR**, Ribeirao Preto, v. 14, n. 4, p. 15811–15821, 2015. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26634549>>. Acesso em: 1 abr. 2018.
- MARQUES, E. A. L. V. et al. Molecular findings in childhood leukemia in Brazil: high frequency of MLL-ENL Fusion/t(11;19) in infant leukemia. **Journal of pediatric hematology/oncology**, Hagerstown, v. 33, n. 6, p. 470–474, 2011. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21436736>>. Acesso em: 18 mar. 2014.
- MARTELLI-PALOMINO, G. et al. Polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential hla-g soluble levels in the Brazilian and French population. **PloS one**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. e71742, 2013. Disponível em:  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24204558>>. Acesso em: 29 set. 2015.
- MARTINEZ-LASO, J. et al. Promoter sequences confirm the three different evolutionary lineages described for HLA-G. **Human immunology**, New York, v. 74, n. 3, p. 383–388, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23220497>>. Acesso em: 8 ago. 2015.
- MARTINI, E. et al. Mend Your Fences: The Epithelial Barrier and its Relationship With Mucosal Immunity in Inflammatory Bowel Disease. **Cellular and molecular gastroenterology and hepatology**, Philadelphia, v. 4, n. 1, p. 33–46, 2017. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28560287>>. Acesso em: 20 nov. 2017.
- MATRICON, J.; BARNICH, N.; ARDID, D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Self/nonself**, Austin, v. 1, n. 4, p. 299–309, 2010. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21487504>>. Acesso em: 9 jan. 2016.

MATSUDA, R. et al. Quantitative cytokine mRNA expression profiles in the colonic mucosa of patients with steroid naïve ulcerative colitis during active and quiescent disease.

**Inflammatory bowel diseases**, New York, v. 15, n. 3, p. 328–334, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18942752>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

MATTOS, B. R. R. et al. Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments. **Mediators of inflammation**, Sylvania, v. 2015, p. 493012, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26339135> >. Acesso em: 11 fev. 2016.

MENIER, C. et al. Erythroblasts secrete the nonclassical HLA-G molecule from primitive to definitive hematopoiesis. **Blood**, Washington, v. 104, n. 10, p. 3153–3160, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15284117>>. Acesso em: 10 mar. 2016.

MOLODECKY, N. A. et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 142, n. 1, p. 46-54.e42; quiz e30, 2012. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22001864>>. Acesso em: 27 abr. 2016.

MONSIVÁIS-URENDA, A. E. et al. Expression and functional role of HLA-G in immune cells from patients with systemic lupus erythematosus. **Journal of clinical immunology**, New York, v. 31, n. 3, p. 369–378, 2011. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21188486>>. Acesso em: 29 mar. 2016.

MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 19, n. 1, p. 683–765, 2001. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244051>>. Acesso em: 29 mar. 2016.

MOREAU, P.; FLAJOLLET, S.; CAROSELLA, E. D. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. **Journal of cellular and molecular medicine**, Oxford, v. 13, n. 9B, p. 2973–2989, 2009. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19508383>>. Acesso em: 17 fev. 2016.

MOUILLOT, G. et al. HLA-G gene activation in tumor cells involves cis-acting epigenetic changes. **International journal of cancer**, New York, v. 113, n. 6, p. 928–936, 2005.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15514928>>. Acesso em: 8 mai. 2016.

NADERI, N. et al. Association of Tumor Necrosis Factor Alpha Gene Polymorphisms with Inflammatory Bowel Disease in Iran. **Iranian journal of public health**, Tihārān, v. 43, n. 5, p. 630–636, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26060764>>. Acesso em: 5 jan. 2018.

NAJI, A. et al. Binding of HLA-G to ITIM-Bearing Ig-like Transcript 2 Receptor Suppresses B Cell Responses. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 192, n. 4, p. 1536–1546, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24453251>>. Acesso em: 21 abr. 2016.

NAVA, P. et al. Interferon-gamma regulates intestinal epithelial homeostasis through converging beta-catenin signaling pathways. **Immunity**, Cambridge, v. 32, n. 3, p. 392–402, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20303298>>. Acesso em: 19 set.

2017.

NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. **Nature reviews. Immunology**, London, v. 14, n. 5, p. 329–342, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24751956>>. Acesso em: 11 set. 2017.

NEURATH, M. F.; TRAVIS, S. P. L. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. **Gut**, London, v. 61, n. 11, p. 1619–1635, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22842618>>. Acesso em: 11 set. 2017.

NIESSNER, M.; VOLK, B. A. Altered Th1/Th2 cytokine profiles in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease as assessed by quantitative reversed transcribed polymerase chain reaction (RT-PCR). **Clinical and experimental immunology**, Oxford, v. 101, n. 3, p. 428–435, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7664489>>. Acesso em: 15 set. 2017.

OKUMURA, R.; TAKEDA, K. Maintenance of gut homeostasis by the mucosal immune system. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences**, Tokyo, v. 92, n. 9, p. 423–435, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27840390>>. Acesso em: 29 mar. 2017.

ONNO, M. et al. Modulation of HLA-G Antigens Expression by Human Cytomegalovirus: Specific Induction in Activated Macrophages Harboring Human Cytomegalovirus Infection. **The Journal of Immunology**, Oxford, v. 164, n. 12, p. 6426–6434, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24882150>>. Acesso em: 2 jan. 2016.

PALADINO, N. et al. Gender susceptibility to chronic hepatitis C virus infection associated with interleukin 10 promoter polymorphism. **Journal of virology**, Baltimore, v. 80, n. 18, p. 9144–9150, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16940525>>. Acesso em: 29 mar. 2016.

PARENTE, J. M. L. et al. Inflammatory bowel disease in an underdeveloped region of Northeastern Brazil. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 21, n. 4, p. 1197–1206, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25632193>>. Acesso em: 16 mai. 2017.

PARK, G. M. et al. Soluble HLA-G generated by proteolytic shedding inhibits NK-mediated cell lysis. **Biochemical and biophysical research communications**, San Diego, v. 313, n. 3, p. 606–611, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14697234>>. Acesso em: 8 fev. 2016.

PASTORELLI, L. et al. Central role of the gut epithelial barrier in the pathogenesis of chronic intestinal inflammation: lessons learned from animal models and human genetics. **Frontiers in immunology**, Lausanne, v. 4, n. SEP, p. 280, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24062746>>. Acesso em: 29 mar. 2016.

PEARL, D. S. et al. Cytokine mucosal expression in ulcerative colitis, the relationship between cytokine release and disease activity. **Journal of Crohn's & colitis**, Amsterdam, v. 7, n. 6, p. 481–489, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22974822>>. Acesso em: 18 jul. 2017.

PEHLIVAN, M. et al. Investigation of TNF-alpha, TGF-beta 1, IL-10, IL-6, IFN-gamma,

MBL, GPIA, and IL1A gene polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. **Platelets**, Edinburgh, v. 22, n. 8, p. 588–95, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21591983>>. Acesso em: 29 jan. 2016.

PERREY, C. et al. ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-alpha, TNF-beta and TGF-beta 1 gene polymorphisms. **Transplant immunology**, Dunton Green, v. 7, n. 2, p. 127–128, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10544444>>. Acesso em: 20 nov. 2015.

PLEVY, S. et al. Combined serological, genetic, and inflammatory markers differentiate non-IBD, Crohn's disease, and ulcerative colitis patients. **Inflammatory bowel diseases**, New York, v. 19, n. 6, p. 1139–1148, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23518807>>. Acesso em: 24 mar. 2016.

PORTO, I. O. P. et al. MicroRNAs targeting the immunomodulatory HLA-G gene: a new survey searching for microRNAs with potential to regulate HLA-G. **Molecular immunology**, Oxford, v. 65, n. 2, p. 230–241, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25700346>>. Acesso em: 24 mar. 2016.

PRAVICA, V. et al. In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene. **European journal of immunogenetics: official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 1–3, 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10068907>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

PRAVICA, V. et al. A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-gamma gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-gamma production. **Human immunology**, New York, v. 61, n. 9, p. 863–866, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11053629>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

R Development Core Team (2016) R: A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna.

RAHBAR KAFSHBORAN, H. et al. Association of TNF- $\alpha$  -857 Polymorphism with Inflammatory Bowel Disease in a Group of Iranian Azeri Individuals. **Middle East journal of digestive diseases**, Tehran, v. 6, n. 1, p. 28–31, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24829702>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

RAVAL, A. et al. Cytokine regulation of expression of class I MHC antigens. **Experimental & molecular medicine**, Seoul, v. 30, n. 1, p. 1–13, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9873816>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

REIMERS, M. S. et al. Prognostic value of HLA class I, HLA-E, HLA-G and Tregs in rectal cancer: a retrospective cohort study. **BMC cancer**, London, v. 14, n. 1, p. 486, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24997850>>. Acesso em: 1 fev. 2016.

REIMUND, J. M. et al. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. **Journal of clinical immunology**, New York, v. 16, n. 3, p. 144–150, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8734357>>. Acesso em: 1 fev. 2016.

RIZZO, R. et al. HLA-G genotype and HLA-G expression in systemic lupus erythematosus:

HLA-G as a putative susceptibility gene in systemic lupus erythematosus. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v. 71, n. 6, p. 520–529, 2008. a. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18380776>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

RIZZO, R. et al. Different production of soluble HLA-G antigens by peripheral blood mononuclear cells in ulcerative colitis and Crohn's disease: a noninvasive diagnostic tool? **Inflammatory bowel diseases**, New York, v. 14, n. 1, p. 100–105, 2008. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17886287>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

RIZZO, R. et al. Role of HLA-G 14bp deletion/insertion and +3142C>G polymorphisms in the production of sHLA-G molecules in relapsing-remitting multiple sclerosis. **Human immunology**, New York, v. 73, n. 11, p. 1140–1146, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22922127>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

RIZZO, R. et al. HLA-G molecules in autoimmune diseases and infections. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 5, n. NOV, p. 1–11, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25477881>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

ROGLER, G. Update in inflammatory bowel disease pathogenesis. **Current opinion in gastroenterology**, Philadelphia, v. 20, n. 4, p. 311–317, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15703658>>. Acesso em: 22 jan. 2016.

ROSADO, S. et al. Expression of human leukocyte antigen-G in systemic lupus erythematosus. **Human immunology**, New York, v. 69, n. 1, p. 9–15, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18295670>>. Acesso em: 13 fev. 2016.

ROUAS-FREISS, N. et al. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. **Seminars in cancer biology**, Philadelphia, v. 17, n. 6, p. 413–421, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881247>>. Acesso em: 18 mar. 2016.

ROUSSEAU, P. et al. The 14 bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. **Human immunology**, New York, v. 64, n. 11, p. 1005–1010, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14602228>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular ecology resources**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 103–6, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21585727>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

RUEDA, B. et al. A functional variant of IFN $\gamma$  gene is associated with coeliac disease. **Genes and immunity**, Oxford, v. 5, n. 6, p. 517–519, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15215891>>. Acesso em: 12 dez. 2017.

RUTTER, M. D. et al. Thirty-Year Analysis of a Colonoscopic Surveillance Program for Neoplasia in Ulcerative Colitis. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 130, n. 4, p. 1030–1038, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618396>>. Acesso em: 20 out. 2015.

SADISSOU, I. et al. High plasma levels of HLA-G are associated with low birth weight and with an increased risk of malaria in infancy. **Malaria journal**, London, v. 13, p. 312, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25115633>>. Acesso em: 2 mar. 2016.



SANCHEZ-MUNOZ, F.; DOMINGUEZ-LOPEZ, A.; YAMAMOTO-FURUSHO, J.-K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 14, n. 27, p. 4280–4288, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18666314>>. Acesso em: 30 jan. 2016.

SANCHEZ, R. et al. IL-10 and TNF-alpha promoter haplotypes are associated with childhood Crohn's disease location. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 15, n. 30, p. 3776–3782, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19673019>>. Acesso em: 12 jul. 2017.

SANTANA, G. O. et al. Crohn's disease in one mixed-race population in Brazil. **World journal of gastroenterology**, Basel, v. 13, n. 33, p. 4489–4492, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17724806>>. Acesso em: 25 fev. 2016.

SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nature reviews. Immunology**, London, v. 10, n. 3, p. 170–181, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20154735>>. Acesso em: 19 mai. 2016.

SARGENT, I. L. Maternal and fetal immune responses during pregnancy. **Experimental and clinical immunogenetics**, Basel, v. 10, n. 2, p. 85–102, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8251183>>. Acesso em: 13 mar. 2016. . Acesso em: 4 fev. 2016.

SASHIO, H. et al. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. **Immunogenetics**, New York, v. 53, n. 12, p. 1020–1027, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11904678>>. Acesso em: 20 mar. 2016.

SAURABH, A. et al. Inhibiting HLA-G restores IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  producing T cell in pleural Tuberculosis. **Tuberculosis** (Edinburgh, Scotland), Edinburgh, v. 109, p. 69–79, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29559123>>. Acesso em: 26 mai. 2018.

SCHMIDT, C. M. et al. Extraembryonic expression of the human MHC class I gene HLA-G in transgenic mice. Evidence for a positive regulatory region located 1 kilobase 5' to the start site of transcription. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), Baltimore, v. 151, n. 5, p. 2633–2645, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8360483>>. Acesso em: 18 jan. 2016.

SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. **Advances in immunology**, New York, v. 96, n. 07, p. 41–101, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17981204>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

SEDGER, L. M.; MCDERMOTT, M. F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. **Cytokine & growth factor reviews**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 453–472, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25169849>>. Acesso em: 24 jul. 2017.

SHIH, D. Q.; TARGAN, S. R. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 14, n. 3, p. 390–400, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18200661>>. Acesso em: 21 mai. 2016.

SHUKLA, H. et al. The mRNA of a human class I gene HLA G/HLA 6.0 exhibits a restricted pattern of expression. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, n. 8, p. 2189, 1990.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2336406>>. Acesso em: 9 jan. 2016.

SILVA, G. A. V et al. IFN- $\gamma$  +875 microsatellite polymorphism as a potential protection marker for leprosy patients from Amazonas state, Brazil. **Cytokine**, Philadelphia, v. 60, n. 2, p. 493–497, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22683002>>.

Acesso em: 31 jan. 2018.

SILVA, H. P. V et al. The association between the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism and type 1 diabetes. **Genes and immunity**, Houndmills, v. 17, n. 1, p. 13–8, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26492519>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

SILVERBERG, M. S. et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. **Canadian journal of gastroenterology**, Oakville, v. 19 Suppl A, n. suppl a, p. 5A-36A, 2005. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16151544>>. Acesso em: 3 dez. 2015.

SKOOG, T. et al. A common functional polymorphism (C-->A substitution at position -863) in the promoter region of the tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene associated with reduced circulating levels of TNF-alpha. **Human molecular genetics**, Oxford, v. 8, n. 8, p. 1443–1449, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10400991>>. Acesso em: 16 mai. 2017.

SOUZA, D. M. B. O. et al. Upregulation of Soluble HLA-G5 and HLA-G6 Isoforms in the Milder Histopathological Stages of Helicobacter pylori Infection: A Role for Subverting Immune Responses? **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, v. 83, n. 1, p. 38–43, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26346688>>. Acesso em: 1 ago. 2017.

SPRIGGS, D. R.; DEUTSCH, S.; KUFEL, D. W. Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. **Immunology series**, New York, v. 56, p. 3–34, 1992. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1550865>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

STANGE, E. F. et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: definitions and diagnosis. **Gut**, London, v. 55 Suppl 1, p. i1-15, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16481628>>. Acesso em: 2 mar. 2016.

STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **American journal of human genetics**, Baltimore, v. 68, n. 4, p. 978–989, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11254454>>.

Acesso em: 5 jun. 2018.

STROBER, W.; FUSS, I. J.; BLUMBERG, R. S. The immunology of mucosal models of inflammation. **Annual review of immunology**, Palo Alto, v. 20, n. 1, p. 495–549, 2002.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11861611>>. Acesso em: 8 abr. 2016.

SU, L. et al. TNFR2 activates MLCK-dependent tight junction dysregulation to cause apoptosis-mediated barrier loss and experimental colitis. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 145, n. 2, p. 407–415, 2013. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23619146>>. Acesso em: 30 mai. 2018.

SUÁREZ, M. B. et al. A new HLA-G allele (HLA-G\*0105N) and its distribution in the Spanish population. **Immunogenetics**, New York, v. 45, n. 6, p. 464–465, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9089111>>. Acesso em: 18 jan. 2016.

SZKARADKIEWICZ, A. et al. Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. **Archivum immunologiae et therapiae experimentalis**, Basel, v. 57, n. 4, p. 291–294, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19578817>>. Acesso em: 27 jul. 2017.

TAVARES, M. et al. Tumour necrosis factor-alpha (-308G/A) promoter polymorphism is associated with ulcerative colitis in Brazilian patients. **International journal of immunogenetics**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 376–382, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27528546>>. Acesso em: 1 mar. 2018.

TORRES, J.; CRAVO, M.; COLOMBEL, J.-F. Anti-TNF Withdrawal in Inflammatory Bowel Disease. **GE Portuguese journal of gastroenterology**, Basel, v. 23, n. 3, p. 153–161, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28868451>>. Acesso em: 1 nov. 2017.

TORRES, M. I. et al. Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. **International immunology**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 579–583, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039388>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

TORRES, M. I. et al. New advances in coeliac disease: serum and intestinal expression of HLA-G. **International immunology**, Oxford, v. 18, n. 5, p. 713–718, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569678>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

TRENT, J. M.; OLSON, S.; LAWN, R. M. Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 79, n. 24, p. 7809–7813, 1982. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6818550>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

TURNER, D. M. et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **European journal of immunogenetics : official journal of the British Society for Histocompatibility and Immunogenetics**, Oxford, v. 24, n. 1, p. 1–8, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9043871>>. Acesso em: 19 fev. 2018.

UDALOVA, I. a et al. Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promoter region. **Molecular and cellular biology**, Washington, v. 20, n. 24, p. 9113–9119, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11094063>>. Acesso em: 8 mai. 2018.

VAN DER MEER, A. et al. Soluble HLA-G promotes Th1-type cytokine production by cytokine-activated uterine and peripheral natural killer cells. **Molecular human reproduction**, Oxford, v. 13, n. 2, p. 123–133, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17121749>>. Acesso em: 21 mar. 2016.

VAN HEEL, D. A. et al. Inflammatory bowel disease is associated with a TNF polymorphism

that affects an interaction between the OCT1 and NF(-kappa)B transcription factors. **Human molecular genetics**, Oxford, v. 11, n. 11, p. 1281–1289, 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12019209>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

VICTORIA, C. R.; SASSAK, L. Y.; NUNES, H. R. D. C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo State, Brazil. **Arquivos de gastroenterologia**, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 20–25, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19466305>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

WALLACE, K. L. et al. Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology**, Beijing, v. 20, n. 1, p. 6–21, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24415853>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

WAPENAAR, M. C. et al. The interferon gamma gene in celiac disease: augmented expression correlates with tissue damage but no evidence for genetic susceptibility. **Journal of autoimmunity**, London, v. 23, n. 2, p. 183–190, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15324937>>. Acesso em: 4 ago. 2017.

WASTOWSKI, I. J. et al. Association of Interferon-gamma gene polymorphism (+874 T/A) with systemic sclerosis. **Disease markers**, Chichester, v. 27, n. 2, p. 93–95, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19893204>>. Acesso em: 9 dez. 2017.

WENG, P.-J. et al. Elevation of plasma soluble human leukocyte antigen-G in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Human immunology**, New York, v. 72, n. 5, p. 406–411, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21377504>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

XIE, C.; LIU, X. F.; YANG, M. S. A meta-analysis on the association between three promoter variants of TNF- $\alpha$  and Crohn's disease. **Molecular biology reports**, Dordrecht, v. 39, n. 2, p. 1575–1583, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21633892>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

YAN, W.-H. et al. Induction of both membrane-bound and soluble HLA-G expression in active human cytomegalovirus infection. **The Journal of infectious diseases**, Chicago, v. 200, n. 5, p. 820–826, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19619059>>. Acesso em: 30 jan. 2016.

YANG, S.-K. et al. Association of TNF-alpha/LTA polymorphisms with Crohn's disease in Koreans. **Cytokine**, Oxford, v. 35, n. 1–2, p. 13–20, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16931032>>. Acesso em: 7 out. 2016.

YELAVARTHI, K. K. et al. Cellular distribution of HLA-G mRNA in transgenic mouse placentas. **Journal of immunology** (Baltimore, Md.: 1950), Baltimore, v. 151, n. 7, p. 3638–3645, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8376798>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

YIE, S.-M. et al. Expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) correlates with poor prognosis in gastric carcinoma. **Annals of surgical oncology**, New York, v. 14, n. 10, p. 2721–2729, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17564748>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

YIE, S. et al. Progesterone enhances HLA-G gene expression in JEG-3 choriocarcinoma cells

and human cytotrophoblasts in vitro. **Human reproduction** (Oxford, England), Oxford, v. 21, n. 1, p. 46–51, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16210391>>. Acesso em: 18 fev. 2016.

YIE, S. et al. Expression of human leucocyte antigen G (HLA-G) is associated with prognosis in non-small cell lung cancer. **Lung cancer** (Amsterdam, Netherlands), Amsterdam, v. 58, n. 2, p. 267–274, 2007. b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17673327>>. Acesso em: 13 fev. 2016.

YIE, S.; XIAO, R.; LIBRACH, C. L. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. **Human reproduction** (Oxford, England), Oxford, v. 21, n. 10, p. 2538–2544, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16684846>>. Acesso em: 12 fev. 2016.

ZELANTE, A. et al. Therapy modifies HLA-G secretion differently in Crohn's disease and ulcerative colitis patients. **Inflammatory bowel diseases**, New York, v. 17, n. 8, p. E94-5, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21604331>>. Acesso em: 17 abr. 2016.

ZHANG, S. Z.; ZHAO, X. H.; ZHANG, D. C. Cellular and molecular immunopathogenesis of ulcerative colitis. **Cellular & molecular immunology**, Beijing, v. 3, n. 1, p. 35–40, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16549047>>. Acesso em: 14 jan. 2016.

ZHU, C.-B. et al. Serum sHLA-G levels: a useful indicator in distinguishing colorectal cancer from benign colorectal diseases. **International journal of cancer**, New York, v. 128, n. 3, p. 617–622, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473865>>. Acesso em: 14 jan. 2016.

ZUNDLER, S.; NEURATH, M. F. Pathogenic T cell subsets in allergic and chronic inflammatory bowel disorders. **Immunological reviews**, Oxford, v. 278, n. 1, p. 263–276, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28658546>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

## APÊNDICE A - MANUSCRITO PUBLICADO

Human Immunology 79 (2018) 477–484



Contents lists available at ScienceDirect

Human Immunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/humimm](http://www.elsevier.com/locate/humimm)

## HLA-G is expressed in intestinal samples of ulcerative colitis and Crohn's disease patients and HLA-G5 expression is differentially correlated with TNF and IL-10 cytokine expression



Renan Garcia Gomes<sup>a</sup>, Carlos Alexandre Antunes de Brito<sup>b</sup>, Valéria Ferreira Martinelli<sup>b</sup>,  
 Rossana Nascimento dos Santos<sup>a</sup>, Fabiana Oliveira dos Santos Gomes<sup>a</sup>, Christina Alves Peixoto<sup>a</sup>,  
 Janaína Oliveira Crispim<sup>c</sup>, George Tadeu Nunes Diniz<sup>a</sup>, Eduardo Antônio Donadi<sup>d</sup>,  
 Norma Lucena-Silva<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil

<sup>b</sup> Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, Brazil

<sup>c</sup> Department of Pharmacology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

<sup>d</sup> Department of Internal Medicine, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Crohn's disease  
 Ulcerative colitis  
 Inflammatory bowel disease  
 HLA-G  
 TNF  
 IL-10

## ABSTRACT

HLA-G is an immunomodulatory molecule that can be produced by epithelial cells. Considering that TNF and IL-10 participate in bowel inflammatory disorders and that both cytokines modulate HLA-G, we evaluated HLA-G, TNF and IL-10 mRNA expression by qPCR and HLA-G protein levels by immunohistochemistry in two intestinal samples exhibiting different degree of inflammation within a patient suffering from Crohn's disease (CD) or ulcerative colitis (UC). Tissue HLA-G5 ( $P < 0.0001$ ), TNF ( $P = 0.0004$ ) and IL-10 ( $P = 0.0169$ ) mRNA expression levels were higher in intestinal areas exhibiting intense inflammation compared to areas of low inflammation, and HLA-G protein levels were not associated with degree of mucosal inflammation. In CD, the expression of TNF was correlated with IL-10 in low inflamed areas, exhibiting a TNF:IL-10 ratio = 3, but in inflamed areas the ratio increased to 9-folds. In UC, the expression of TNF was correlated to IL-10, irrespective of the inflammation grade, with little variation of the TNF:IL-10 ratio in the various inflamed areas. TNF and IL-10 expression was correlated with HLA-G5 expression in mild inflamed areas. Both CD and UC samples exhibited gene and protein expression of HLA-G; and the HLA-G5 expression is differentially correlated with TNF and IL-10 levels depending on the type of the underlying inflammatory bowel disorder.

## 1. Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) encompasses a group of chronic inflammatory disorders of the gastrointestinal tract, primarily including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD) [1–3]. The morbidity of IBD is associated with frequent relapses and the need for prolonged use of medications that frequently produce adverse effects, ranging from gastric symptoms to immunosuppression [4,5]. In UC, inflammation progressively occurs from the rectum to the ascending colon, being classified as proctitis, when affects exclusively the rectum, and pancolitis when the entire large intestine is involved. On the other hand, in CD, inflammation can occur from the mouth to the anus in a non-continuous manner [6–8].

Cells and molecules of the intestinal epithelium maintain tissue

integrity, block the microbiota to reach the lamina propria, allow nutrients to be transported from the lumen into the tissue, and trigger mucosal immunity against pathogens that cross the epithelial barrier [9,10]. The equilibrium between regulatory T-cells and effector T-cells is critical to maintain the intestinal integrity, and the disruption of this balance entails the expansion and hyperactivity of T cell mediated immune responses that lead to chronic inflammation. In CD, pro-inflammatory mediators, such as IL-12, IFN- $\gamma$  and TNF induce a Th1-polarized immune response, whereas in UC, anti-inflammatory mediators, such as IL-10, IL-13 and IL-25 induce a Th2-polarized immune response [11–13]. Other molecules produced by activated immune and epithelial cells act modulating the bowel inflammation. HLA-G is a non-classical class I histocompatibility antigen that is considered to be an immune checkpoint molecule.

\* Corresponding author at: Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Brazil.  
 E-mail address: [norma.lucena@hotmail.com](mailto:norma.lucena@hotmail.com) (N. Lucena-Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2018.03.006>

Received 11 December 2017; Received in revised form 23 March 2018; Accepted 23 March 2018

Available online 26 March 2018

0198-8859/© 2018 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

**APÊNDICE B - MANUSCRITO SUBMETIDO**

Elsevier Editorial System(tm) for Cytokine  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Homozygous interferon- $\gamma$  IFNG +875(CA)<sub>n</sub> microsatellite genotype is differently associated with IFNG production in Chron's disease and Ulcerative colitis

Article Type: Full length article

Keywords: Crohn's disease; ulcerative colitis; inflammatory bowel disease; interferon- $\gamma$ ; polymorphism

Corresponding Author: Mr. Renan Garcia Garcia, M.Sc.

Corresponding Author's Institution: Aggeu Magalhães Institute

First Author: Renan Garcia Garcia, M.Sc.

Order of Authors: Renan Garcia Garcia, M.Sc.; Carlos A Brito, MD, MSc, PhD; Valéria F Martinelli, MD, MSc; George N Diniz, Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation; Eduardo A Donadi, MD, PhD; Norma Lucena-Silva, MD, PhD

Abstract: Interferon- $\gamma$  (IFNG) participates on the maintenance of mucosal homeostasis, antigen processing and phagocytosis. At least two intron 1 variation sites have been associated with IFNG protein expression and susceptibility to inflammatory disorders. Considering that the two most frequent inflammatory bowel diseases (IBD), Crohn's disease (CD) and Ulcerative colitis (UC), exhibit distinct immune responses, we evaluated IFNG intron 1 variability sites (+874T/A and +875(CA)<sub>n</sub> microsatellites) in association with IFNG plasma levels and mucosal gene expression in IBD patients. Peripheral blood samples were collected from 42 CD and 94 UC patients and 238 healthy controls. Bowel samples were obtained from 30 IBD patients. Although no association was observed between +874T/A alleles and IBD susceptibility, homozygosity for the +875(CA)<sub>n</sub> genotype: i) protected against CD and UC ( $P < 0.001$ ) development, and ii) was associated with higher IFNG plasma levels in CD patients when compared to UC patients ( $P = 0.028$ ). Plasma IFNG levels were correlated with mucosal IFNG expression only in CD patients. Heterozygosity for the +875(CA)<sub>n</sub> genotype showed no differences regarding IFNG plasma levels in both diseases. Chromosomal imbalance at +875(CA)<sub>n</sub> microsatellite tandem repeats may interfere with the regulation of IFNG levels in CD and UC.

Suggested Reviewers:

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



**Título do Projeto:** "Associação de Polimorfismo Genético com a Susceptibilidade a Doença Inflamatória Intestinal".

**Pesquisador responsável:** Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva.

**Instituição onde será realizado o projeto:** CPqAM/Fiocruz

**Data de apresentação ao CEP:** 14/06/10

**Registro no CEP/CPqAM/FIOCRUZ:** 39/10

**Registro no CAAE:** 0040.0.095.000-10

### PARECER Nº 47/2010

O Comitê avaliou as modificações introduzidas e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 04 de agosto de 2013. Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 04 de agosto de 2010.

  
 Giselle Campozana Gouveia  
 Farmacêutica  
 Coordenadora  
 Mat. SIAPE 0463378  
 CPqAm / FIOCRUZ

Observação:

Anexos:

- Orientações ao pesquisador para projetos aprovados;
- Modelo de relatório anual com 1º prazo de entrega para 04/08/2011.