

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES  
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

RENAN GARCIA GOMES

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NAS SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS DOS  
GENES *HLA-G*, *IL-10* E *TNFE* A SUA RESPECTIVA EXPRESSÃO GÊNICA EM  
LESÕES DE MUCOSA EM PACIENTES PORTADORES DE  
DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

RECIFE

2014

**RENAN GARCIA GOMES**

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NAS SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS DOS  
GENES *HLA-G*, *IL-10* E *TNF* E A SUA RESPECTIVA EXPRESSÃO GÊNICA EM  
LESÕES DE MUCOSA EM PACIENTES PORTADORES DE  
DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE para obtenção de grau de Mestre 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**

Co-orientador:

**Prof<sup>º</sup>. Dr. Carlos Alexandre Antunes de Brito**

RECIFE

2014

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

---

G633a Gomes, Renan Garcia.  
Associação de polimorfismos nas sequências regulatórias dos genes HLA-G, IL-10 e TNF e a sua respectiva expressão gênica em lesões de mucosa em pacientes portadores de doença inflamatória intestinal / Renan Garcia Gomes. - Recife: [s.n.], 2014.  
84 p. : ilus.

Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Departamento de Saúde Coletiva, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.

Orientadora: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva.

Co-orientador: Carlos Alexandre Antunes de Brito.

1. Doenças Inflamatórias Intestinais - epidemiologia. 2. Doenças Inflamatórias Intestinais - genética. 3. Doenças Inflamatórias Intestinais - imunologia. 4. Colite Ulcerativa - genética. 5. Colite Ulcerativa - imunologia. 6. Doença de Crohn - genética. 7. Doença de Crohn - imunologia. 8. Antígenos HLA-G - genética. 9. Antígenos HLA-G - imunologia. 10. Interleucina-10 - genética. 11. Interleucina-10 - imunologia. 12. Fator de Necrose Tumoral alfa - genética. 13. Fator de Necrose Tumoral alfa - imunologia. I. Silva, Norma Lucena Cavalcanti Licínio da. II. Brito, Carlos Alexandre Antunes de. III. Título.

**RENAN GARCIA GOMES**

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS NAS SEQUÊNCIAS REGULATÓRIAS DOS  
GENES *HLA-G*, *IL-10* E *TNF* E A SUA RESPECTIVA EXPRESSÃO GÊNICA EM  
LESÕES DE MUCOSA EM PACIENTES PORTADORES DE  
DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

Aprovado em 20/02/2014

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE

---

Dr<sup>a</sup>. Clarice Neuenschwander Lins de Moraes Fonseca  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fiocruz-PE

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Sandrin Garcia  
Universidade Federal de Pernambuco

## AGRADECIMENTO

Agradeço aos meus pais, Saulo e Sheila, por terem sempre investido em meus estudos e apoiado a minha escolha de carreira profissional. Sem eles eu não teria chegado até aqui.

À Dra. Norma Lucena por ter acolhido em seu grupo de pesquisa um jovem cheio de anseios e compartilhado seus conhecimentos sem restrição. Obrigado por confiar no meu trabalho.

À a Dr. Carlos Brito pela oportunidade de trabalhar no projeto coordenado pelo mesmo e a Dra. Valéria Martinelli, médica no ambulatório do Hospital das Clínicas, que sempre esteve solícita durante as coletas de amostras e quaisquer dúvidas acerca da doença e dos procedimentos clínicos.

Ao Instituto de Hemoterapia do Nordeste (IHENE) por terem nos recebido e ajudado na coleta de sangue de doadores saudáveis para os testes de susceptibilidade genética.

À Dr. Eduardo Donadi e Dra. Janaina Crispim, nossos colaboradores nos estudos da molécula HLA-G pelas suas contribuições a este trabalho.

À Cássia, Viviane e Marlos do Núcleo de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz-PE, por todo o apoio técnico-científico.

À Lais, Sara, Jurandy e Albert que também participaram do projeto junto comigo. Especialmente Lais e Sara, que eu tive a oportunidade de co-orientar junto à Dra Norma e participar na formação delas durante a execução deste projeto.

À Rossana, a primeira aluna de iniciação científica que de fato eu ensinei, fico feliz em hoje poder vê-la no mestrado e aprender coisas novas com ela e contribuirmos para o avanço do grupo.

Aos demais membros do grupo de pesquisa: Alessandra, Ester, Juliana, Renata, André, Lívia e Lídia, e aos amigos companheiros da pós-graduação, pessoas que nos escutam e compartilham suas experiências.

E obrigado a Deus, por ter me permitido fazer a escolha correta.

GOMES, Renan Garcia. Associação de polimorfismos nas sequências regulatórias dos genes *HLA-G*, *IL-10* e *TNF* e a sua respectiva expressão gênica em lesões de mucosa em pacientes portadores de doença inflamatória intestinal. 2014. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

## RESUMO

Fatores genéticos e imunológicos foram associados à patogênese da doença inflamatória intestinal (DII), ela inclui Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI) e doença de Crohn (CD). A hiperresponsividade de células B e a autoreatividade de células T contribuem para a polarização da resposta imune Th1 em CD e Th2 em RCUI. Sítios polimórficos na região 3' não traduzida do gene *HLA-G* (completa) e região promotora dos genes *IL-10* (-1082A/G e -819C/T) e *TNF* (completa) foram associados a susceptibilidade a diversas doenças. Estudamos 217 portadores de DII e 249 doadores saudáveis, pareados por sexo e idade. A ascendência africana foi maior em RCUI e caucasiana em DC ( $p=0,005$ ). Comparados aos controles, o genótipo *HLA-G* 14bpINS-INS (associado com baixa expressão de *HLA-G*) ( $p=0,006$ ) e *IL-10* -1082G-G (associado com alta expressão de *IL-10*) ( $p=0,030$ ) foram menos frequentes em pacientes com DC, possivelmente contribuindo para a polarização Th1, mas não foram encontradas diferenças nas frequências de *TNF*. Em RCUI, as frequências do alelo *HLA-G* +3003C ( $p=0,015$ ) e genótipo +3003C-T ( $p=0,003$ ) estavam aumentadas. Apesar da alta frequência do alelo T em africanos, após estratificarmos por ascendência, o genótipo +3003C-T ainda estava mais frequente em pacientes com ascendência africana ( $p=0,012$ ). Também em RCUI, as frequências dos genótipos *HLA-G* +3010C-C ( $p=0,030$ ) e +3142G-G ( $p=0,030$ ) estavam baixas, sugerindo uma possível regulação de microRNA nesses sítios. As frequências dos sítios polimórficos de *IL-10* foram semelhantes às dos controles, enquanto as do alelo *TNF* -863A estavam aumentadas ( $p=0,033$ ) e as do genótipo -863C-C diminuídas ( $p=0,035$ ). A análise de biópsias intestinais revelou um aumento nos níveis de RNAm de *TNF* ( $p=0,033$ ) na lesão intensa e uma diminuição da *IL-10* ( $p=0,029$ ) em lesão leve, mas os níveis de *IL-10* voltam ao normal na lesão intensa ( $p=0,282$ ). O RNAm de *HLA-G5* tendeu a ser maior em biópsias de lesão intensa e pode estar contribuindo para a modulação imune local.

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

GOMES, Renan Garcia. Association of HLA-G, IL-10 and TNF regulatory sequence polymorphisms and respective gene expression in biopsies of Brazilian patients with Inflammatory Bowel Disease. 2014. Dissertation (Master's degree of Bioscience and Biotechnology for Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

## ABSTRACT

Genetic and immunological factors have been associated with inflammatory bowel disease (IBD) pathogenesis, encompassing ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). B cell hyperresponsiveness and T cell auto-reactivity have contributed to a Th1 polarization immune response in CD and a Th2 polarization in UC. Since polymorphic sites at the 3'untranslated region (3'UTR) of HLA-G (whole region) and 5'UTR of IL-10 (-1082A/G,-819C/T) and TNF (whole region) genes have been associated with susceptibility to several inflammatory disorders, we studied 217 IBD Brazilian patients and 249 healthy donors, matched for sex and age. African ancestry was higher in UC and Caucasian in CD ( $p=0.005$ ). Compared to controls, the 14bp INS/INS (associated with low HLA-G expression) ( $p=0.006$ ) and IL-10 -1082G-G genotypes (associated with high IL-10 expression) ( $p=0.030$ ) were underrepresented in CD patients, possibly contributing to the Th1 polarization, but no differences were found in TNF allele frequencies. In UC, the HLA-G +3003C allele ( $p=0.015$ ) and +3003C-T genotype ( $p=0.003$ ) frequencies were increased. Despite the high frequency of T allele in Africans, after stratification by ancestry, the +3003C-T genotype was still overrepresented in patients with African ancestry ( $p=0.012$ ). Also in UC, the HLA-G +3010C-C ( $p=0.030$ ) and +3142G-G ( $p=0.030$ ) genotypes were underrepresented, suggesting a possible microRNA regulation through these target sites. Moreover, frequencies of IL-10 polymorphic sites were closely similar to those observed in controls, while TNF -863A allele was overrepresented ( $p=0.033$ ) and the -863C-C genotype underrepresented ( $p=0.035$ ). Bowel biopsies analysis revealed an increase in TNF ( $p=0.033$ ) in severe lesion and a decrease in IL-10 ( $p=0.029$ ) mRNA levels in mild lesion, but the IL-10 levels went back to the normal in severe lesion ( $p=0.282$ ). HLA-G5 mRNA tended to be higher in biopsies of severe lesion and might be contributing to local immune modulation.

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



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Homeostasia imunológica da mucosa intestinal.	20
Figura 2 -	Localização cromossômica das regiões IBD de suscetibilidade a DII.	23
Figura 3 -	Estrutura gênica do gene <i>HLA-G</i> .	24
Figura 4 -	Sítios polimórficos da região 3' não traduzida do gene <i>HLA-G</i> .	26
Quadro 1 -	Lista de iniciadores utilizados na amplificação das sequências reguladoras dos genes <i>HLA-G</i> , <i>IL-10</i> e <i>TNF</i> e o antígeno precoce imediato do CMV.	34
Quadro 2 -	Condições da reação e ciclagem para amplificação das sequências reguladoras dos genes <i>HLA-G</i> , <i>IL-10</i> e <i>TNF</i> e o antígeno precoce imediato do CMV.	36
Figura 5 -	Estratégia para amplificação da isoforma <i>HLA-G5</i> a partir de RNAm.	37
Quadro 3 -	Curvas padrão para avaliação da especificidade da reação de PCR em tempo real de <i>HLA-G5</i> e <i>GAPDH</i> pelo intercalante SYBR Green.	38
Figura 6 -	Comparação da expressão de RNAm <i>HLA-G5</i> entre os diferentes graus de inflamação.	56
Figura 7 -	Comparação da expressão de RNAm <i>IL-10</i> entre os diferentes graus de inflamação.	57
Figura 8 -	Comparação da expressão de RNAm <i>TNF</i> entre os diferentes graus de inflamação.	59
Figura 9 -	Modelo de evolução da lesão na doença inflamatória intestinal.	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características demográficas e sociais dos pacientes com Doença Inflamatória Intestinal atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.	42
Tabela 2 -	Características clínicas dos pacientes com doença inflamatória intestinal atendidos no Hospital da Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.	43
Tabela 3 -	Frequência alélica e genotípica de sítios polimórficos na região 3'não traduzida do gene <i>HLA-G</i> em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e estratificado pela doença: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI).	45
Tabela 4 -	Frequência do sítio polimórfico +3003 C/T da região 3'não traduzida do gene <i>HLA-G</i> em pacientes portadores de Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI), estratificados pela cor da pele.	48
Tabela 5 -	Frequência haplotípica da região 3'não traduzida do gene <i>HLA-G</i> em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e estratificado pela doença: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI).	48
Tabela 6 -	Frequência alélica e genotípica de sítios polimórficos na região promotora do gene <i>IL-10</i> em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e estratificado pela doença: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI).	50
Tabela 7 -	Frequência haplotípica da região promotora do gene <i>IL-10</i> em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e estratificado pela doença: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI).	50

Tabela 8 -	Frequência alélica e genotípica de sítios polimórficos na região promotora do gene <i>TNF</i> em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e estratificado pela doença: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI).	52
Tabela 9 -	Frequência haplotípica da região promotora do gene <i>TNF</i> em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e estratificado pela doença: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI).	54
Tabela 10 -	Expressão relativa de RNAm de HLA-G5 em biópsia de mucosa intestinal de pacientes em fase aguda da doença inflamatória intestinal, classificados por grau de inflamação.	55
Tabela 11 -	Expressão relativa de RNAm de IL-10 em biópsia de mucosa intestinal de pacientes em fase aguda da doença inflamatória intestinal, classificados por grau de inflamação.	57
Tabela 12 -	Expressão relativa de RNAm de TNF em biópsia de mucosa intestinal de pacientes em fase aguda da doença inflamatória intestinal, classificados por grau de inflamação	58
Tabela 13 -	Comparação do perfil de citocinas plasmáticas de pacientes com doença inflamatória intestinal de acordo com o grau de inflamação da lesão tecidual e classificação da doença em Crohn ou RCUI	60

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APCs	Antigen Presenting Cells
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CD	Cluster Differentiation
CMV	Citomegalovírus
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CT	Cycle threshold
DC	Doença de Crohn
Del	Deleção
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
GAPDH	Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase
HC-UFPE	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
HLA	Human Leukocyte Antigen
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IgA	Imunoglobulina A
IHENE	Instituto de Hemoterapia do Nordeste
IL	Interleucina
ILT	Immunoglobulin-like Transcript
Ins	Inserção

KIR2DL4	Killer cell Immunoglobulin-like Receptor two Domains, Long cytoplasmic tail, 4
MHC	Major Histocompatibility Complex
miRNA	microRNA
NaOH	Hidróxido de sódio
NFκB	Nuclear Factor kappa B
NK	Natural Killer
NOD1	Nucleotide-binding Oligomerization Domain
OCT-1	Octamer binding Transcription Factor
OR	Odds Ratio
PAMP	Padrões moleculares associados à patógenos
pb	Pares de base
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RCUI	Retocolite Ulcerativa Idiopática
RNA	Ribonucleic Acid
RNAm	RNA mensageiro
sHLA-G	HLA-G solúvel
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TGF-β	Tumor Growth Fator beta
Th1	T helper 1
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumor Necrosis Fator
Treg	T regulatory
UTR	Untranslated Region

## SUMÁRIO

<b>1 REFERENCIAL TEÓRICO</b>	16
<b>1.1 A doença Inflamatória Intestinal</b>	16
<b>1.2 Etiopatogenia da doença Inflamatória Intestinal</b>	18
1.2.1 <u>Fatores ambientais</u>	18
1.2.2 <u>Fatores imunológicos</u>	19
1.2.3 <u>Fatores genéticos</u>	22
<b>1.3 A molécula de HLA-G</b>	23
1.3.1 <u>HLA-G em pacientes portadores de DII</u>	26
<b>1.4 A molécula de IL-10</b>	27
<b>1.5 A molécula TNF</b>	28
<b>1.6 Justificativa para a caracterização imunogenética de pacientes com DII</b>	29
<b>2 OBJETIVO</b>	31
<b>2.1 Objetivo geral</b>	31
<b>2.2 Objetivos específicos</b>	31
<b>3 METODOLOGIA</b>	32
<b>3.1 Definição de caso</b>	32
3.1.1 <u>Avaliação de polimorfismo genético</u>	32
3.1.2 <u>Avaliação da expressão de genes relacionados à resposta imune</u>	32
<b>3.2 Procedimentos laboratoriais</b>	33
3.2.1 <u>Fracionamento de células periféricas mononucleadas</u>	33
3.2.2 <u>Extração de DNA genômico humano</u>	33
3.2.3 <u>Análise de polimorfismo dos genes HLA-G, IL-10 e TNF</u>	34
3.2.4 <u>Extração de RNA e DNA combinada</u>	35

3.2.5 <u>Síntese de cDNA</u>	35
3.2.6 <u>Estudo de expressão gênica</u>	36
3.2.7 <u>Avaliação histológica</u>	37
3.2.8 <u>Avaliação da resposta imune sistêmica</u>	39
<b>3.3 Análise computacional</b>	40
<b>3.4 Análise estatística</b>	40
<b>4 RESULTADOS</b>	41
<b>4.1 Perfil demográfico e clínico dos pacientes com doença inflamatória intestinal</b>	41
<b>4.2 Polimorfismo da região 3' não traduzida no gene HLA-G em doença inflamatória intestinal</b>	44
<b>4.3 Polimorfismo da região promotora do gene IL-10 em doença inflamatória intestinal</b>	49
<b>4.4 Polimorfismo da região promotora do gene TNF em doença inflamatória intestinal</b>	51
<b>4.5 Ausência de associação entre polimorfismos e grau de inflamação intestinal</b>	51
<b>4.6 Expressão de HLA-G na lesão de mucosa intestinal</b>	55
<b>4.7 Expressão de RNAm IL-10 na lesão de mucosa intestinal</b>	56
<b>4.8 Expressão de RNAm de TNF na lesão de mucosa intestinal</b>	58
<b>4.9 Expressão da proteína HLA-G em lesão de mucosa intestinal</b>	59
<b>4.10 Perfil imunológico dos pacientes com doença inflamatória intestinal</b>	60
<b>5 DISCUSSÃO</b>	61
<b>6 CONCLUSÃO</b>	65
<b>REFERÊNCIAS</b>	66
<b>APÊNDICE A - Questionário clínico do paciente</b>	71
<b>APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido</b>	75

<b>APÊNDICE C - Questionário clínico do doador de sangue</b>	<b>76</b>
<b>APÊNDICE D - Artigo publicado</b>	<b>77</b>
<b>ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa CEP/CPqAM</b>	<b>84</b>



## 1 REFERENCIAL TEÓRICO

### 1.1 A doença Inflamatória Intestinal

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é caracterizada por distúrbios inflamatórios crônicos que afetam o trato gastrointestinal, incluindo a Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI) e a Doença de Crohn (DC). A DII parece ocorrer em maior frequência em mulheres (63%), com média de idade de 44 anos (CARDOSO et al., 2014). Na Europa e América do Norte a incidência de RCUI varia de 9 a 20 novos casos a cada 100.000 habitantes por ano, sendo as maiores taxas encontradas no mundo (ORDÁS et al, 2012). No Brasil, observa-se crescente aumento do número de casos e de unidades ambulatoriais para atendimento específico destas patologias (ZALTMAN, 2007). Na cidade de Botucatu, no estado de São Paulo, a taxa de RCUI (4,48/100.000) é maior do que a taxa da DC (3,5/100.000) (VICTORIA et al., 2009).

A DII está associada à importante morbidade, caracterizada pela sua cronicidade com frequentes recidivas, necessidade de uso prolongado de medicamentos, frequentemente associado a efeitos adversos, que vão desde sintomas gástricos até imunossupressão. Complicações graves como hemorragias, obstrução intestinal, perfuração e necessidade de múltiplas cirurgias, como ocorre na DC, ilustram o impacto da doença na vida do indivíduo e no sistema de saúde pública (BRITO et al., 2007).

Na RCUI, a inflamação está restrita ao intestino e seus achados clínicos geralmente são relacionados à extensão da doença, embora nem sempre exista proporcionalidade entre a extensão da doença e a gravidade dos sintomas. Quando a inflamação acomete apenas o reto é denominada de proctite ulcerativa correspondendo a 20% dos casos, onde geralmente apresentam diarreia sanguinolenta. Quando acomete o cólon e reto, denomina-se colite distal, ou proctossigmoidite, representando 30% dos casos, e corresponde ao acometimento dos 30 a 40 cm distais do cólon e reto. A denominação de colite esquerda é dada a doença quando atinge até a flexura esplênica, que representa 30 a 40%. O termo

pancolite ulcerativa é utilizado para os casos em que o processo inflamatório ultrapassa a flexura esplênica, correspondendo a 20% do total de casos, e tem pior prognóstico pelo maior risco de desenvolvimento de câncer (BRITO et al., 2012).

Na DC, o sítio da doença influencia a manifestação clínica, podendo acometer todo o trato gastrointestinal da boca ao ânus. No momento do diagnóstico, o íleo terminal é a região acometida em 47% dos pacientes, o cólon em 28%, a região do íleo-cólon em 21%, e em apenas 3% dos pacientes o trato gastrointestinal superior está acometido. DC em esôfago, estômago ou duodeno é rara e, geralmente, está associada ao acometimento do íleo e/ou cólon. Os achados podem ser caracterizados como lesões cutâneas, ou do canal anal, e fístulas perianais, com formação de fissuras, abscessos e estenose do canal anal. A manifestação perianal é mais comum quando há envolvimento colônico (BAUMGART; CARDING, 2007a).

O diagnóstico das DII baseia-se em um conjunto de achados clínicos, endoscópicos, radiológicos e histopatológicos, não havendo nenhuma característica patognomônica. Os exames endoscópicos são os métodos de escolha para o diagnóstico das DII, pois permitem acessar o local da doença, visualizá-lo diretamente e colher material para exame histopatológico. A histologia pode auxiliar na diferenciação entre DC e RCUI. Ocasionalmente, ocorre discordância entre os aspectos endoscópicos e histológicos, ou seja, aparência endoscópica de doença em remissão com achados histológicos de atividade. Alguns autores demonstraram que pacientes com essas características estão em maior risco de sofrer recidiva clínica (RUTTER et al., 2006; STANGE et al., 2006).

Marcadores imunológicos são utilizados como auxílio no diagnóstico diferencial de RCUI e DC, no entanto o resultado não é totalmente específico. Os anticorpos utilizados podem sofrer reação cruzada com antígenos de bactérias ou fungos ou ainda podem estar presentes em ambas as doenças, porém a existência desses marcadores já chama atenção para a disfunção da resposta imune local. Os primeiros anticorpos desenvolvidos foram: o anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos de padrão perinuclear (p-ANCA) e Anticorpo anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). O p-ANCA mede os neutrófilos para servindo de ferramenta diagnóstica ou para avaliação da resposta inflamatória, porém pode ser encontrado em diversas doenças imunológicas. Ele está presente em 20-85% dos casos de RCUI e 2-28% dos casos

de DC. O anticorpo ASCA liga-se a sequências de manose na parede celular da levedura *S. cerevisiae* e também em *Candida albicans* e pode ser encontrado em 39-76% dos pacientes com DC, até 15% dos pacientes com RCUI e ainda 5% em pessoas saudáveis. Apesar de outros anticorpos terem sido implementados para a formação de um painel diagnóstico, como anticorpos para porina de membrana externa ou para flagelinas de bactérias ou para células em forma de cálice, estes ainda são os marcadores que possuem melhor resultado (ISKANDAR; CIORBA, 2012; KUNA, 2012). Plevy e colaboradores (2013) demonstraram que a combinação de marcadores sorológicos, genéticos e imunológicos mostrou bons resultados no diagnóstico de DII e na diferenciação entre RCUI e DC.

As drogas mais frequentemente utilizadas incluem os corticosteróides, aminossalicilatos, azatioprina, metotrexate, ciclosporina e, mais recentemente, a terapia biológica com anti-TNF, todas com diferentes níveis de respostas e com efeitos adversos que requerem monitorização adequada (AKOBENG et al., 2006; CAPRILLI et al., 2006; MCGOVERN; JEWELL, 2005; RUTGEERTS et al., 2005; TARGAN et al., 1997; TRAVIS et al., 2006).

## **1.2 Etiopatogenia da doença Inflamatória Intestinal**

A etiopatogênese da DII ainda não está totalmente esclarecida. A complexa interação entre a presença de bactérias comensais/patogênicas no trato gastrointestinal, a competência do sistema imunológico, e a predisposição genética do hospedeiro estão envolvidos no desenvolvimento da DII (MATRICON et al., 2010; SANTANA et al., 2007; ZHANG et al., 2006).

### **1.2.1 Fatores ambientais**

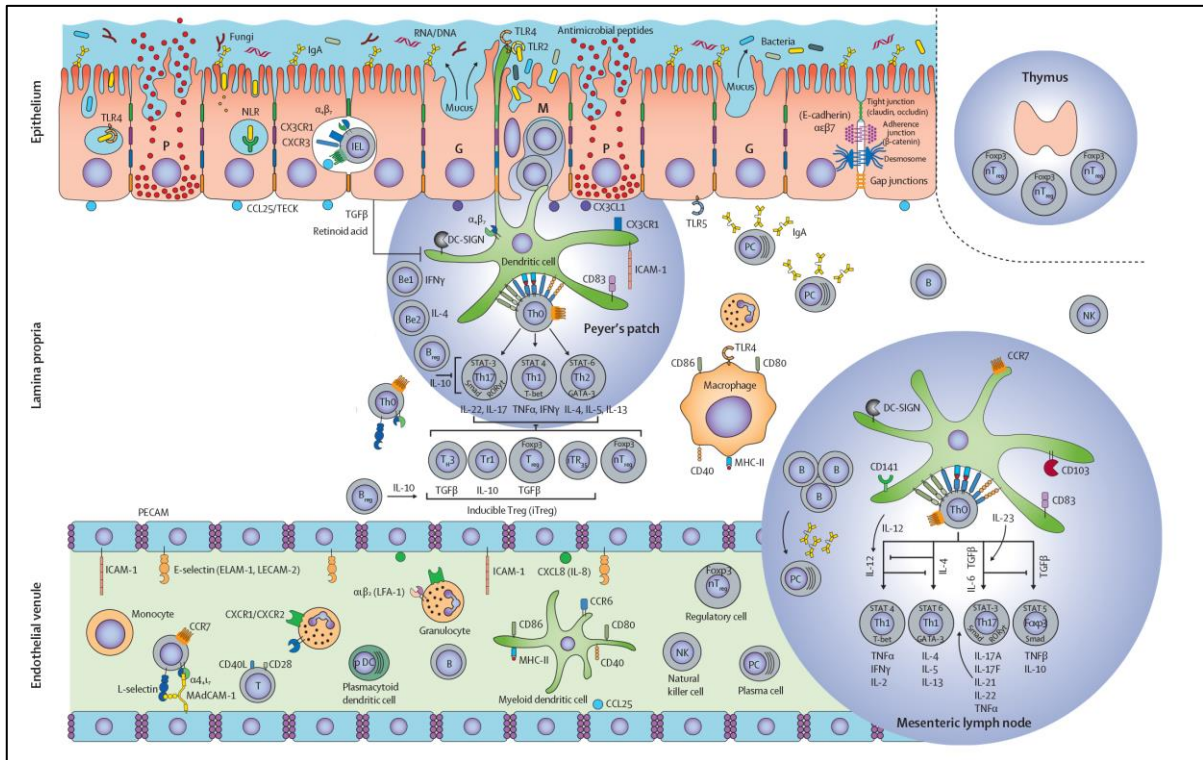
A baixa incidência de DII na Ásia (RCUI:6,3/100.000; DC:5,0/100.000) comparadas com Europa (RCUI:24,3/100.000; DC:12,7/100.000) e América do Norte (RCUI:19,2/100.000; DC:20,2/100.000), sugere que existam fatores ambientais relacionados ao desenvolvimento de DII (MOLODECKY et al, 2012). A hipótese da

higiene considera que a falta de exposição a determinado microrganismo ainda na idade jovem, devido à melhoria nas condições sanitárias, seja responsável pela alta incidência de condições inflamatórias intestinais e autoimunidade na DII. Alterações na dieta e na microbiota intestinal também podem estar envolvidas (BAUMGART; CARDING, 2007b; MATRICON et al., 2010). Desta forma, indivíduos sensibilizados com antígenos da microbiota intestinal podem gerar uma resposta imune celular exacerbada, com quadro inflamatório intestinal recorrente (ROGLER, 2004; ZHANG et al., 2006). Essa diferença entre populações mundiais, ou raças, sugere também que existe um componente genético envolvido na etiologia da DII (MATRICON et al., 2010).

### 1.2.2 Fatores imunológicos

A integridade da mucosa intestinal é mantida por diversos fatores incluindo as células epiteliais, células secretoras de muco, células de Paneth produtoras de peptídeos antimicrobianos, plasmócitos secretores de IgA e tecido linfóide associado à mucosa. As células dendríticas são as responsáveis por controlar a tolerância contra bactérias comensais e resposta imunológica contra patógenos, pois possuem receptores em sua superfície que permitem esta distinção além de ativar ou silenciar as células T. As células apresentadoras de antígenos (APCs) e células B de mucosa controlam a resposta imune adaptativa e o equilíbrio das células T *naive* (do inglês, virgens), seja na diferenciação em células T efetoras (Th1, Th2 ou Th17), necessárias para debelar um patógeno, ou células T reguladoras (Treg ou Th3) para estabelecer a homeostasia imunológica (Figura 1). As APCs são também responsáveis pelo controle da resposta inata com ativação das células *Natural Killer* (NK). Na presença da microbiota comensal e ausência de inflamação, o balanço entre células efetoras e células reguladoras do sistema imune é mantido por uma rede complexa de citocinas (ABBAS, 2012; BAUMGART; CARDING, 2007b; GLOCKER, 2012; MURPHY, 2012).

Figura 1 - Homeostasia imunológica da mucosa intestinal.



Fonte: Adaptado de BAUMGART; SANDBORN, 2012.

Legenda:  $\alpha\beta$  integrin = integrinas  $\alpha\beta$ . Adherence junction ( $\beta$ -catenin) = junção aderente ( $\beta$ -catenina). Antimicrobial peptides = peptídeos antimicrobianos. B = célula B. Bacteria = bactéria. Be = célula B efetora. Breg = célula B reguladora. CCL = motivo C-C ligante de quimiocinas. CCR = motivo C-C receptor de quimiocinas. CD = grupo de diferenciação. CXCL = motivo C-X-C ligante de quimiocinas. CXCR = motivo C-X-C receptor de quimiocinas. Cadherin = caderinas. DC-SIGN = molécula não integrina, captadora da molécula de adesão intercelular 3 específica das células dendríticas. DNA = ácido desoxirribonucleico. Dendritic cell = célula dendrítica. pDC = célula dendrítica plasmocitóide. Desmosome = desmossomo. ELAM = molécula de adesão endotelial de leucócitos. Endothelial venule = veia endotelial. Epithelium = epitélio. FoxP3 = forkhead box P3. Fungi = Fungo. G = célula em forma de cálice. GATA = Proteína de ligação GATA. Gap junction = junção comunicante. Granulocyte = granulócito. ICAM = molécula de adesão intercelular. IFN = interferon. Ig = imunoglobulina. IEL = linfócitos intraepiteliais. IL = interleucina. LECAM1 = molécula de adesão dos linfócitos endoteliais. LFA = antígeno associado à função linfocitária. Lamina propria = lâmina própria. M = célula de micropregas. MADCAM = molécula de adesão celular da adressina de mucosa. MHC = complexo principal de histocompatibilidade. Macrophage = macrófago. Mesenteric lymph node = linfonodo mesentérico. Monocyte = monócito. Mucus = Muco. Myeloid dendritic cell = célula dendrítica mielóide. NK = célula matadora natural. NLR = receptor semelhante ao domínio de ligação de nucleotídeo. P = célula de Paneth. PC = plasmócito. PECAM = molécula de adesão celular de plaqueta endotelial. Peyer's patch = placa de Peyer. RNA = ácido ribonucleico. ROR $\gamma$  = receptor órfão  $\gamma$  relacionado com o RAR. Retinoid acid = ácido retinóico. STAT = sinal transdutor e ativador de transcrição. Selectin = selectina. Smad = família relacionada ao Sma e Mad. T = célula T. T-bet = fator de transcrição específico de Th1. TECK = quimiocina expressa no timo. TGF $\beta$  = fator de crescimento tumoral  $\beta$ . Th = célula T auxiliar. Tr = célula T reguladora. Treg = célula T reguladora. iTreg = célula T reguladora induzida. nTreg = células T reguladora natural. iTR35 = célula T reguladora induzida dependente de interleucina-35. TLR = receptor semelhante ao Toll. TNF = fator de necrose tumoral. Thymus = Timo. Tight junction (claudin, occludin) = junção de oclusão (claudina, ocludina).

As citocinas são pequenas proteínas produzidas pelas células do sistema imune que facilitam a comunicação entre as células, estimulando a proliferação de células efetoras antígeno específicas e intermeiam inflamações locais ou sistêmicas. Tanto as células dendríticas quanto os macrófagos quando ativados secretam várias citocinas que regulam a resposta inflamatória na DII. Tais citocinas ativam e diferenciam células T levando a uma resposta imune adaptativa (SANCHEZ-MUNOZ et al., 2008).

Na DII, as alterações ocorridas nas diferentes etapas do processo de resposta imune acarretam na polarização da resposta celular, sendo na RCUI a resposta do tipo Th2 e na DC a resposta Th1. Alterações na produção de mucina permitem que antígenos luminiais acessem o tecido da mucosa intestinal, ativando o sistema imune da mucosa. Receptores de células epiteliais TLR (do inglês, *Toll-like receptor*), NOD1 e NOD2A (do inglês, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain 1 and 2A*) reconhecem padrões associados a patógenos (PAMP) e induzem, através da ativação do NFkB, a célula epitelial a expressar citocinas, quimiocinas, moléculas do MHC (do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) e outros mediadores com o objetivo de atraírem e ativarem neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (KAYAMA; TAKEDA, 2012; PASTORELLI et al, 2013).

Células dendríticas residentes da mucosa intestinal são deficientes em receptores TLR4 e TLR2 (primeiro sinal), na produção de moléculas coestimuladoras (segundo sinal), desta forma contribuindo com a manutenção do estado tolerogênico da mucosa intestinal na presença de antígenos da microbiota e/ou alimentar. Adicionalmente, a secreção de IL-1, IL-6 e TGF- $\beta$  pelas células epiteliais induzem a diferenciação de células T *naive* de mucosa em células efetoras Th17 com produção de IL-17A, IL-21 e IL-23, levando a diferenciação de células T<sub>reg</sub>, inibindo, via IL-10, a resposta imune inflamatória decorrente da presença de antígenos alimentares e a inibindo a resposta a antígenos de microrganismos comensais. A ausência de produção de células Treg contribui para a resposta à microbiota comensal, e para a persistência da inflamação (BAUMGART; CARDING, 2007b; MATRICON et al., 2010).

A reação cruzada dos peptídeos bacterianos da microbiota luminal com antígenos próprios presentes no intestino pode ser a causa da autoreatividade de

células T com aumento da liberação de citocinas inflamatórias relacionadas à resposta imune do tipo Th1, IL-12, INF- $\gamma$  e TNF, ou do tipo Th17, com produção de IL-17A, IL-21 e IL-23, na doença de Crohn; enquanto na RCUI o padrão de resposta é do tipo Th2, com aumento na produção de IL-10, IL-13, IL-25. O aumento de células B e células plasmáticas da mucosa sugere que a doença também seja mediada por anticorpos, e seja dependente de complemento (AHMAD et al., 2006; LIU et al., 2009; MATRICON et al., 2010; ROGLER, 2004; ZHENG et al., 2006).

### 1.2.3 Fatores genéticos

Análises no genoma de portadores de DII demonstraram regiões em diferentes cromossomos que podem estar envolvidos na susceptibilidade à doença, sugerindo que a RCUI e DC sejam doenças poligênicas (Figura 2). Estas regiões estão localizadas nos cromossomos 16, 12, 6, 14, 5, 19, 1, 16 e 3, e foram nomeadas respectivamente por IBD-1 a IBD-9 (do inglês, *Inflammatory Bowel Disease*). A região com maior evidência de ligação com a DII é a IBD-3, localizada no cromossomo 6p21, correspondendo ao *loci* de genes do MHC. Mutações neste *loci* podem estar associadas com fenótipos/forma clínica, gravidade e desfecho da doença (BAUMGART; CARDING, 2007b; GLASS et al., 2007).

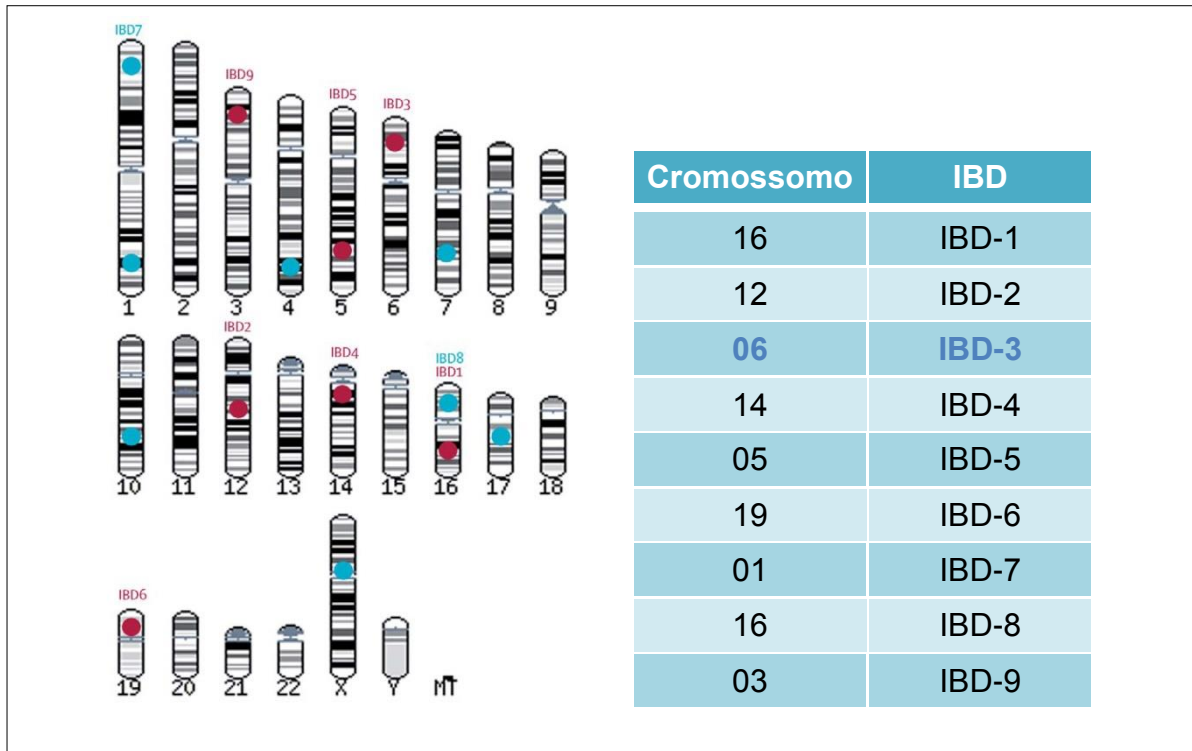
Os produtos gênicos do MHC foram agrupados em três classes de acordo com a sua função: as moléculas de classe I, cuja função é apresentar peptídeos aos linfócitos citolíticos CD8+; as moléculas de classe II, que apresentam peptídeos às células T auxiliares CD4+ e; as moléculas de classe III, que codificam moléculas também envolvidas na resposta imune, mas que não apresentam peptídeos às células efetoras da resposta imune. Os antígenos leucocitários humanos (HLA) são produtos de genes do complexo que foram identificados inicialmente devido a sua participação na rejeição de tecido e órgãos (PIRRI et al., 2005).

As moléculas de MHC classe I são encontradas em todas as células e são responsáveis pelo reconhecimento de antígenos, diferenciando o que é próprio do indivíduo do que é estranho. As principais moléculas ditas clássicas são os HLA-A, HLA-B e HLA-C da região Ia, e são altamente polimórficas; sendo determinantes de rejeição tecidual. As moléculas não clássicas são o HLA-E, HLA-F e HLA-G da

região Ib que são pouco polimórficas, e possuem distribuição limitada a certos tecidos (CIRULLI et al., 2006, HVIID et al., 2006-a, MARTINEZ-LASO et al., 2013).

As moléculas de classe III estão envolvidas na resposta imunológica, porém não apresentam antígenos às células efetoras.

Figura 2 - Localização cromossômica das regiões IBD de suscetibilidade a DII.



Fonte: BAUMGART; CARDING, 2007b.

Legenda: IBD = doença inflamatória intestinal

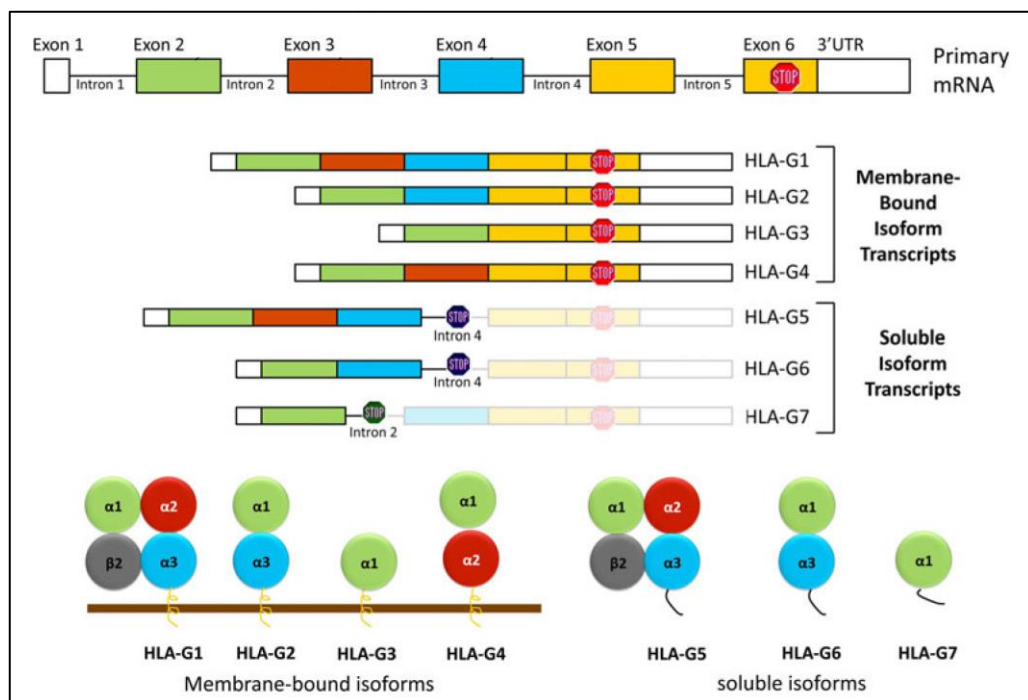
### 1.3 A molécula de HLA-G

A molécula HLA-G tem características tolerogênicas, e alteração no seu padrão de expressão tem sido associada com a predisposição a doenças autoimunes, câncer, resposta a transplantes e ao desenvolvimento e gravidade de doenças infecciosas (Donadi et al., 2011). HLA-G exerce sua função inibitória contra células NK, linfócitos T e células apresentadoras de antígenos por ligação direta aos receptores inibitórios ILT-2, ILT-4 (*immunoglobulin-like transcript* – ILT) e KIR2DL4 (*killer cell immunoglobulin-like receptor*). Nas células NK, o HLA-G inibe a citólise,



proliferação celular e migração transtecidual, 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. Por último, nas APCs 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 (CAROSELA et al., 2008).

Figura 3 - Estrutura gênica do gene HLA-G.



Fonte: Adaptado de DONADI et al., 2011

Legenda: HLA-G1-4 são isoformas ligada à membrana plasmática. HLA-G5-7 são isoformas solúveis.  $\alpha$  = domínios de cadeia pesada da proteína.  $\beta 2$  = molécula de  $\beta 2$ -microglobulina associada. 3'UTR = região 3' não traduzida. Primary mRNA = RNAm primário. STOP = códon de parada.

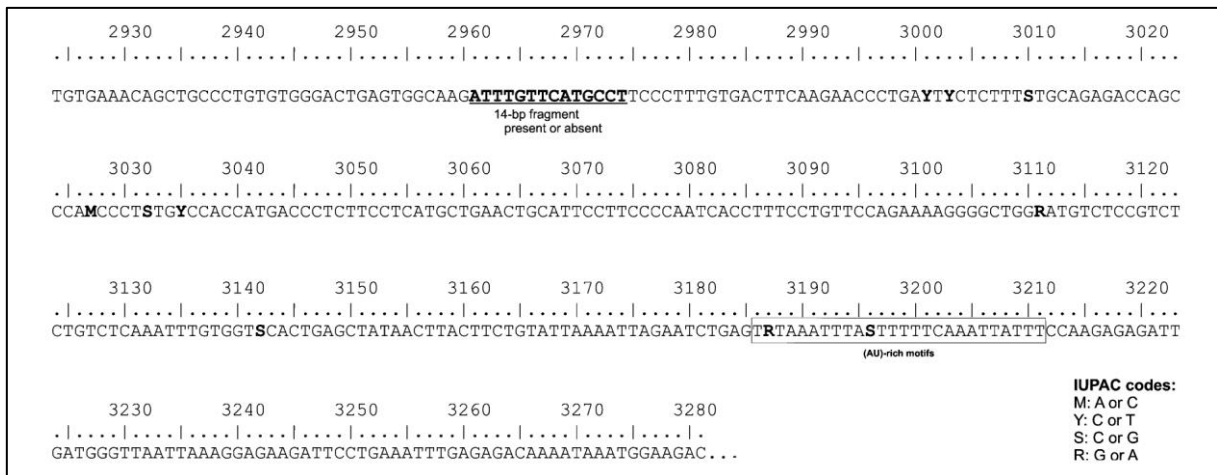
Diferentemente de outras moléculas HLA clássicas o HLA-G, em consequência de processamento de RNAm alternativo (MARTINEZ-LASO et al., 2013), apresenta 7 isoformas, sendo 4 delas de superfície celular (HLA-G1, G2, G3 e G4) e 3 solúveis (HLA-G 5, G6 e G7). Estas isoformas são originadas por exclusão de diferentes exons resultando na não formação de algum (s) domínio da proteína.

As isoformas a HLA-G1 e -G5 representam respectivamente a forma de superfície e solúvel fruto do processamento da sequência completa do RNAm do HLA-G, i.e., possuindo mesmo domínio extramembrana (Figura 3). Estas duas isoformas estão associadas à molécula de  $\beta$ -microglobulina (DONADI et al., 2011).

O gene *HLA-G* faz parte do MHC classe Ib do grupo não clássico, sendo homólogo àqueles do grupo clássico de classe Ia. É constituído por oito exons e sete introns, sendo assim dividido: exon 1 com 178pb que codifica o peptídeo sinal, exon 2 com 272pb, exon 3 com 281pb e exon 4 com 276pb que codificam os domínios  $\alpha^1$ ,  $\alpha^2$  e  $\alpha^3$ , respectivamente, exon 5 com 115pb que codifica a região transmembrana e exon 6 com 105pb que codifica o domínio citoplasmático da molécula HLA-G (Rousseau et al., 2003). O exon 7 é sempre excluído no processo de processamento de RNAm, e o exon 8 corresponde a região reguladora 3' não traduzida (3'UTR) do gene *HLA-G* (CASTELLI et al., 2011; DONADI et al., 2011).

O gene *HLA-G* possui sítios polimórficos nas regiões 3' e 5'- não traduzidas (UTR) que desempenham papel na regulação da expressão da molécula HLA-G. Na região 3'UTR, 8 polimorfismos já estão bem definidos: inserção/deleção de 14 pares de base (Ins/Del 14pb) e sete SNP's (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) +3003C/T, +3010C/G, +3027A/C, +3035C/T, +3142C/G, +3187A/G e +3196C/G (Figura 4). Alelos relativos ao sítio polimórfico 14pb Ins/Del estão associados com a estabilidade do RNAm. O alelo com a inserção induz processamento na região 3'UTR do RNAm, causando deleção de 92pb, incluindo os SNP's +3003 e +3010, que por sua vez dá uma maior estabilidade ao RNAm. Já a presença da adenina no SNP +3187 está associada a diminuição da estabilidade do RNAm, levando a diminuição da expressão do HLA-G. O SNP +3142 é um sítio de ligação de miRNA e, conseqüentemente, degradação do RNAm (CASTELLI et al., 2010, 2011; DONADI et al., 2011).

Nós recentemente demonstramos a relação entre o aumento da frequência dos alelos +3010C e +3142G, sítios alvos para miRNAs, em pacientes adultos com Lúpus Eritematoso Sistêmico em relação à indivíduos doadores de sangue saudáveis (LUCENA-SILVA et al., 2013), e dos alelos +3010G e +3142C em crianças com leucemia mielóide aguda (manuscrito em preparação), sugerindo possível influência de diferentes miRNA em tipos celulares diferentes.

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

Fonte: Adaptado de Castelli et al 2010; DONADI et al., 2011.

Legenda: 14-bp fragmente presente or absent = inserção ou deleção dos 14pb. (AU)-rich motifs = motivo rico em (AU). IUPAC codes = notação IUPAC.

Apesar das frequências de alelos e de genótipos da região 3'UTR do gene *HLA-G* serem pouco variáveis em indivíduos saudáveis, nós identificamos a presença de variabilidade de haplótipos entre as populações de doadores saudáveis provenientes dos estados de Pernambuco e São Paulo, ressaltando a importância da avaliação de indivíduos saudáveis da mesma área geográfica dos pacientes em estudo tipo caso-controle, e de estudos de expressão diferencial de isoformas de *HLA-G* a partir de indivíduos com diversos genótipos (LUCENA-SILVA et al., 2012).

### 1.3.1 HLA-G em pacientes portadores de DII

Pouco se sabe sobre a função imunomoduladora do *HLA-G* em DII. O polimorfismo 14pb Ins/Del da região 3'UTR do gene *HLA-G* está associado a diferentes concentrações de interleucina-10 (IL-10), sendo assim, no genótipo 14pb INS-INS é observado o aumento na concentração do IL-10 e baixos níveis de *HLA-G* solúvel (s*HLA-G*) (HVIID et al, 2006-b). Um estudo em DII na Itália verificou que pacientes com RCUI produzem baixos níveis de s*HLA-G* associado com baixa produção de IL-10, sendo responsáveis pela persistência da resposta inflamatória. Já em pacientes com DC foram detectados altos níveis de s*HLA-G* e IL-10, mas

diferente da RCUI, como a inflamação persiste, sugere que a atividade anti-inflamatória do HLA-G promovida pelo IL-10 não é suficiente para superar os fatores associados a inflamação (RIZZO et al., 2008).

Outro estudo realizado por Torres e colaboradores (2004) avaliou a expressão de HLA-G em corte histológico de pacientes com DII, onde pacientes com RCUI apresentaram expressão de HLA-G e IL-10, porém não foram encontradas evidências em pacientes portadores de DC, sugerindo que a expressão diferencial de HLA-G pode distinguir essas doenças. Não ficando de todo claro qual seria o papel do HLA-G na modulação da resposta imunológica intestinal na DII.

#### 1.4 A molécula de IL-10

A Interleucina-10 (IL-10) é uma citocina reguladora responsável por manter o balanço da resposta imune, inibindo citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6, IL-12 e TNF (do inglês, *tumor necrosis factor*). A IL-10 age também controlando a proliferação e diferenciação de macrófagos, células B e células T (DE WAAL MALEFYT et al., 1991; GLOCKER et al., 2011, 2012).

O gene *IL-10* está localizado no cromossomo 1q31-q32, possui 11.892 pares de base e cinco exons (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2014a). O seu produto gênico é secretado por monócitos, macrófagos, células dendríticas, células T, células B, granulócitos, células epiteliais, queratinócitos e mastócitos (ABBAS, 2012).

Polimorfismos na região promotora do IL-10 foram relacionados ao nível de expressão da molécula, desta forma influenciando diretamente o balanço da resposta imunológica local uma vez que o IL-10 é antagonista do Interferon- $\gamma$  e, conseqüentemente, do TNF.

Foram identificados três polimorfismos de base única na região promotora do IL-10, -1082A/G, -819C/T e -592A/C. Supõe-se que a região -1082 seja um sítio de ligação de fatores de transcrição e a mudança de G para A neste sítio diminuiria a produção de IL-10. De forma similar, a região envolvendo a posição -819 é relacionada à regulação positiva da expressão do gene IL-10, de forma que a

mudança de C (selvagem) para T (mutado) na posição -819 pode interferir na expressão da citocina. Por outro lado, a posição -592 faz parte do sítio de ligação da STAT3 e está envolvida com a regulação negativa da expressão de IL-10 (CRAWLEY et al, 1999). Os sítios polimórficos -819 e -592 estão em desequilíbrio de ligação, de forma que o alelo -819 C está presente com o alelo -592 C, enquanto o alelo -819 T acompanha o alelo -592 A. (PERRY et al., 1999),

O haplótipo mais frequente é -1082G/-819C/-592C e está associado à alta produção de IL-10, principalmente quando em homozigose. Os fenótipos -1082A/-819C/-592C e -1082A/-819T/-592A são considerados baixos produtores de IL-10 (BIDWELL et al., 2001). Por fim, os níveis de transcrição da citocina são definidos pela mudança de base de G para A na posição -1082G.

## 1.5 A molécula TNF

O Fator de Necrose Tumoral é uma citocina que possui atividade pró-inflamatória e catabólica. TNF induz a produção de IL-1, prostaglandina E, colagenase, a ativação de neutrófilos, a expressão de moléculas HLA de classe I e II, a proliferação de linfócitos T e B e a síntese de imunoglobulinas. A principal fonte de TNF são os macrófagos ativados, mas também são produzidos nas células endoteliais, nas células NK e nos linfócitos T e B, dentre outras células (TSIANOS et al., 2009).

O gene *TNF* está localizado no cromossomo 6p21.3, possui 9.763 pares de base e quatro exons (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2014b). Os polimorfismos mais estudados na região promotora do TNF são os SNPs -1031C/T, -863A/C, -857C/T, -308AG e -238A/G. O papel de cada sítio na regulação do gene não está bem esclarecido, porém sabe-se que os sítios -863 e -857 são sítios de ligação dos fatores de transcrição NFκB e OCT-1 respectivamente (VAN HELL et al., 2002).

A presença de polimorfismo no gene *TNF* tem sido relacionada com alteração na sua expressão, por conseguinte, na intensidade de resposta imune frente ao estímulo antigênico, influenciando a susceptibilidade e gravidade de doenças

infecciosas. A presença dos alelos -238A ou alelo -863A diminuem a produção de TNF, já os alelos -857T e -308A aumentam a produção de TNF (SKOOG et al, 1999; XIE et al., 2012).

A região cromossomal IBD3 inclui também o gene *TNF*. Na DII, o macrófago ativado aumenta a expressão de TNF. Este age aumentando a permeabilidade celular facilitando o acesso de células de defesa ao foco infeccioso, contudo, a perda da homeostase tecidual prolonga a ação do TNF, que culmina com a exacerbação da lesão tecidual. Um estudo realizado por Santana e colaboradores sugere que o polimorfismo +308 esteja relacionado com a intensidade da DC. Portanto, estudos de alterações genéticas podem trazer um esclarecimento sobre a indicação da terapia biológica com anticorpo anti-TNF (KELSALL et al., 2008; TSIANOS et al., 2009).

### **1.6 Justificativa para a caracterização imunogenética de pacientes com DII**

No texto acima, foi pontuado a existência de lacunas e contradições do que diz respeito à ação do HLA-G na resposta imune na DII, como exemplificado pelos estudos de Torres (2004) e Rizzo (2008) avaliando corte histológico e soro respectivamente. Considerando que (1) as causas determinantes da DII são multifatoriais, com componente imunológico, genético e ambiental, mas esses aspectos não estão claramente definidos quanto ao seu papel no desenvolvimento da doença e no curso da doença; (2) foram identificados diversos agrupamentos de genes possivelmente relacionados ao desenvolvimento da doença, incluindo o complexo principal de histocompatibilidade; (3) sendo o gene *HLA-G* um dos componentes do MHC, com função moduladora da resposta imunológica, com potencial papel no processo inflamatório estabelecido na mucosa intestinal na DII, principalmente pela ação do TNF tecidual; (4) a atividade da molécula de HLA-G é de alguma forma influenciada pela citocina IL-10, contudo, o modelo de cooperação entre o HLA-G e IL-10 na modulação da resposta imune apresentado na literatura ainda é preliminar, e com várias lacunas de informação; (5) sabendo que a expressão de HLA-G, IL-10 e TNF estão relacionadas à presença de certos polimorfismos genéticos, nós nos propomos a estudar a imunoregulação da

molécula HLA-G na doença inflamatória intestinal. Inicialmente determinaremos a presença de polimorfismos na região 3' não traduzida do gene *HLA-G*, comparando as frequências de alelos encontradas no grupo de pacientes com DII e indivíduos saudáveis; avaliaremos a relação entre a expressão de RNAm correspondentes aos genes *HLA-G* (isoforma *HLA-G5*), *IL-10* e *TNF* na lesão de mucosa na DII. Adicionalmente, examinaremos a expressão da proteína solúvel de HLA-G (sHLA-G) em cortes histológicos e níveis de citocinas séricas comparando-as com grau de lesão histológica, visando formular modelo de resposta imunológica na lesão de mucosa na DII.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

Estudar a associação de polimorfismos nas sequências regulatórias dos genes *HLA-G*, *IL-10* e *TNF* e a respectiva expressão gênica em lesões de mucosa em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal do estado de Pernambuco.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a frequência de alelos, genótipos e haplótipos definidos por polimorfismos na região 3' não traduzida do gene *HLA-G* e da região promotora dos gene *IL-10* e *TNF* em portadores de Doença Inflamatória Intestinal e doadores de sangue saudáveis;
- b) Relacionar a presença dos polimorfismos da região 3' não traduzida do gene *HLA-G* e da região promotora dos gene *IL-10* e *TNF* com a suscetibilidade e a gravidade da Doença Inflamatória Intestinal;
- c) Caracterizar a resposta imune dos pacientes com doença inflamatória intestinal e correlacionar com o grau de lesão tecidual;
- d) Avaliar a expressão dos genes *HLA-G* e de *IL-10* e *TNF* em lesão de mucosa intestinal.



### **3 METODOLOGIA**

O desenho do estudo da variabilidade genética é do tipo caso-controle, com pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE) e doadores de sangue do Instituto de Hemoterapia do Nordeste (IHENE). A expressão genética é um estudo descritivo com grupos internos, avaliando as moléculas em diferentes graus de inflamação e forma de apresentação da doença.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM (CAAE: 0040.0.095.000-10) e os participantes que aceitaram livremente participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e doaram amostra de sangue periférico e/ou fragmento de biópsia intestinal. Este estudo foi realizado no Laboratório de Imunogenética e no Núcleo de Plataformas Tecnológicas, ambos nas dependências Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fiocruz-PE.

#### **3.1 Definição de caso**

##### **3.1.1 Avaliação de polimorfismo genético**

Os casos foram 217 pacientes atendidos no período de 2011 à 2012 no ambulatório de DII do HC-UFPE; os controles para o estudo do polimorfismo genético foram 249 indivíduos saudáveis doadores de sangue do IHENE, que negaram história familiar de câncer e doenças autoimunes, incluindo diabetes, artrite reumatoide, lúpus. Os testes entre os grupos foram realizados pareando sexo e idade.

##### **3.1.2 Avaliação da expressão de genes relacionados à resposta imune**

Foram utilizadas amostras de mucosa de diferentes áreas do intestino de 122 pacientes com DII submetidos a colonoscopia em fase aguda da doença para avaliação de atividade inflamatória ou durante seguimento da atividade da doença.

Os pacientes foram estratificados em portadores de Retocolite Ulcerativa Idiopática (88) e pacientes com Doença de Crohn (35). Em cada grupo, foram formados subgrupos de comparação com pacientes que apresentaram o mesmo grau de inflamação em todos os segmentos do intestino analisados, classificada como: inativa, leve, moderada ou intensa. Foram comparados o grau de inflamação com a expressão de RNAm de HLA-G5, IL-10 e TNF. Nos pacientes com lesão de mucosa apresentando diferentes graus de inflamação, a expressão de RNAm das amostras de diferentes graus de inflamação do mesmo paciente também foram comparadas. Pacientes, cuja doença não estava em atividade, não foram submetidos à biópsia intestinal para estudo histológico.

## **3.2 Procedimentos laboratoriais**

### **3.2.1 Fracionamento de células periféricas mononucleadas**

Foi coletada amostra de sangue periférico de pacientes portadores de doença inflamatória intestinal em tubo contendo o anticoagulante EDTA. A partir da amostra de sangue dos pacientes, as células sanguíneas foram fracionadas através do gradiente de Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare, Little Chalfont - UK), como indica o fabricante. Após serem lavadas com Tampão de Fosfato Salino (PBS) pH 7.2, centrifugadas a 12.000  $\times$  g e estocadas em precipitado a uma temperatura de -80°C até o uso. O plasma obtido também foi estocado para avaliação imunológica.

### **3.2.2 Extração de DNA genômico humano**

O DNA genômico foi isolado das células mononucleares com o reagente DNAzol (Invitrogen, California - USA), utilizando o protocolo do fabricante. As amostras foram homogeneizadas em DNAzol e o DNA precipitado com etanol 100%. Após a centrifugação a 12.000  $\times$  g, o precipitado de DNA foi lavado com etanol 75%

por duas vezes e diluído em 8 mM NaOH. Esse DNA foi utilizado nos estudos de variabilidade genética.

### 3.2.3 Análise de polimorfismo dos genes *HLA-G*, *IL-10* e *TNF*

Foram amplificadas as regiões 3'UTR do gene *HLA-G* e as regiões promotoras dos genes *IL-10* e *TNF*, a partir do DNA genômico extraído da amostra de cada paciente, utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) com a *Taq* DNA Polymerase recombinante (Invitrogen, California – USA). Após a amplificação das regiões de interesse, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% para confirmação da amplificação. Estas amostras foram então sequenciadas utilizando o protocolo Big Dye Terminator v 3.1 (Applied Biosystems, California - USA) no equipamento ABI Genetic Analyser 3100 (Applied Biosystems, California - USA).

Os iniciadores utilizados na amplificação e no sequenciamento do fragmento de interesse estão descritas no Quadro 1. As condições de amplificação da sequências estão descritas no Quadro 2.

Quadro 1 - Lista de iniciadores utilizados na amplificação das sequencias reguladoras dos genes *HLA-G*, *IL-10* e *TNF* e o antígeno precoce imediato do CMV.

Iniciadores	Sequência	Tamanho	Referência
HLA-G 3'UTR			
DonG8 F	5' TGTGAAACAGCTGCCCTGTGT 3'	358pb	CASTELLI et al., 2010.
DonG8 R	5' GTCTTCCATTTATTTTGTCTCT 3'		
IL-10 promotor			
1115-528 down	5' TAAATATCCTCAAAGTTCC 3'	491pb	PALADINO et al, 2006.
1115-528 up	5' ATCCAAGACAACACTACTAA 3'		
TNF promotor			
TNF promo F	5' CTCAGAGAGCTTCAGGGATAT 3'	979pb	O autor.
TNF promo R	5' TCTGTCTCGGTTTCTTCTCCA 3'		
CME IE			
CMV IE F	5' GGCCATGGCGGCATTGCAGAACTTG 3'	685pb	VAN DEN VEYVER et al., 1998
CMV IE R	5' CTCTATCTCAGACACTGGCTCAGAC 3'		

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.2.4 Extração de RNA e DNA combinada

As amostras de biópsias foram armazenadas em RNAholder (Bio Agency, São Paulo – Brasil) logo após sua coleta e congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A extração do RNA das amostras de biópsia intestinal foram realizadas, conforme sugerido pelo fabricante, utilizando 1mL de Trizol (Invitrogen, California - USA) para 10mg de tecido incubando por 5 minutos a temperatura ambiente. Depois de acrescentado 200 $\mu\text{L}$  de clorofórmio por 10 minutos, a amostra foi centrifugada a  $12.000 \times g$  por 15 minutos e a fase aquosa foi transferida para um microtubo estéril. O RNA foi obtido por precipitação com isopropanol e centrifugação a  $12.000 \times g$  por 10 minutos. O precipitado de RNA foi lavado com etanol 75% e diluído em água livre de RNase.

Visando a avaliação da infecção viral por Citomegalovírus (CMV) na amostra tecidual utilizada para avaliação da expressão de moléculas relacionadas a resposta imune, o precipitado tecidual e fase orgânica da solução de Trizol foi utilizado para extração de DNA tecidual, mediante a precipitação com etanol 100%, e centrifugação a  $2.000 \times g$ . O material precipitado foi submetido a duas incubações por 30 minutos em citrato de sódio com etanol 10%. Finalmente, o DNA foi precipitado com etanol 75% por 15 minutos, centrifugado e diluído em 8 mM NaOH. A avaliação da presença do CMV na lesão intestinal foi realizada pela técnica de PCR com a *Taq* DNA Polymerase recombinante (Invitrogen, California – USA), utilizando os iniciadores descritos no Quadro 1 e as condições de amplificação descritas no Quadro 2, para a identificação do principal antígeno precoce imediato do CMV (*immediate-early - IE*).

### 3.2.5 Síntese de cDNA

RNA total extraído foi utilizado na síntese de cDNA com iniciadores randômicos (0,2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), dNTP 10 mM, Tampão 10X, DTT e enzima Superscript II (Invitrogen, California - USA) conforme orientação do fabricante.

Quadro 2 - Condições da reação e ciclagem para amplificação das sequências reguladoras dos genes HLA-G, IL-10 e TNF e o antígeno precoce imediato do CMV.

	<b>Reação</b>	<b>Ciclagem</b>
<b>HLA-G 3'UTR e CMV IE</b>	Volume final 20µL:  1x Tampão de PCR 1,5 mM de MgCl <sub>2</sub> 0,2 mM de dNTP 0,5 µM de cada iniciador 0,05 U de <i>Taq</i> DNA Polymerase	1 ciclo: 94°C por 3 minutos  40 ciclos: 94°C por 1 minuto 60°C por 1 minuto 72°C por 1 minuto  1 ciclo: 72°C por 7 minutos
<b>IL-10 promotor</b>	Volume final 25µL:  1x Tampão de PCR; 2,5 mM de MgCl <sub>2</sub> ; 0,3 mM de dNTP; 1,6 % de DMSO; 0,5 µM de cada iniciador 0,05 U de <i>Taq</i> DNA Polymerase	1 ciclo: 95°C por 3 minutos  30 ciclos: 95°C por 45 segundos 56°C por 45 segundos 72°C por 1 minuto  1 ciclo: 72°C por 7 minutos
<b>TNF promotor</b>	Volume final 20µL:  1x Tampão de PCR 1,5 mM de MgCl <sub>2</sub> 0,3 mM de dNTP 0,5 µM de cada iniciador 0,05 U de <i>Taq</i> DNA Polymerase	1 ciclo: 94°C por 3 minutos  30 ciclos 94°C por 45 segundos 60°C por 30 segundos 72°C por 45 segundos  1 ciclo: 72°C por 7 minutos

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 3.2.6 Estudo de expressão gênica

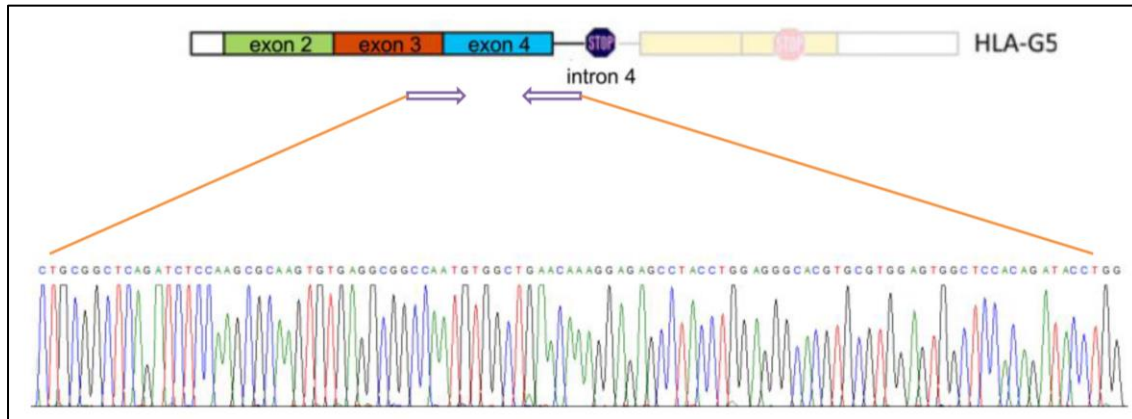
A expressão relativa dos genes *IL-10*, *TNF* e *HLA-G* foram quantificadas em relação à expressão do gene constitutivo *GAPDH* utilizando ensaios de PCR em tempo real.

Para a quantificação dos RNAm de IL-10 e TNF foi utilizado o sistema de detecção Taqman® (Applied Biosystems, California - USA) para todos os reagentes. O resultado das reações de amplificação com as sondas de hidrólise Taqman® para detecção da expressão de IL-10 (Hs00961622\_m1) e TNF (Hs01113624\_g1) foi normalizado com o resultado da expressão do gene constitutivo *GAPDH* (Hs02758991\_g1).

A expressão da isoforma G5 do gene *HLA-G* foi realizada utilizando o intercalante SYBR-Green (Applied Biosystems, California - USA), e expressa

também em relação à expressão do gene constitutivo *GAPDH*. Inicialmente, para amplificação específica do RNAm da isoforma G5, vários iniciadores foram selecionados a partir da literatura e outros desenhados, e os produtos amplificados sequenciados para confirmação da especificidade da reação (Figura 5).

Figura 5 - Estratégia para amplificação da isoforma HLA-G5 a partir de RNAm.



Fonte: Elaborado pelo autor

A eficiência da reação para HLA-G e *GAPDH* foram semelhantes. Todas as reações realizadas utilizando o sistema SYBR-Green de detecção foram submetidas à análise visual das curvas *melting*, visando excluir as curvas com amplificação inespecífica (Quadro 3). As curvas de amplificação foram analisadas para exclusão das reações cujo valor do CT (*Cycle Threshold*) ultrapassou 34.

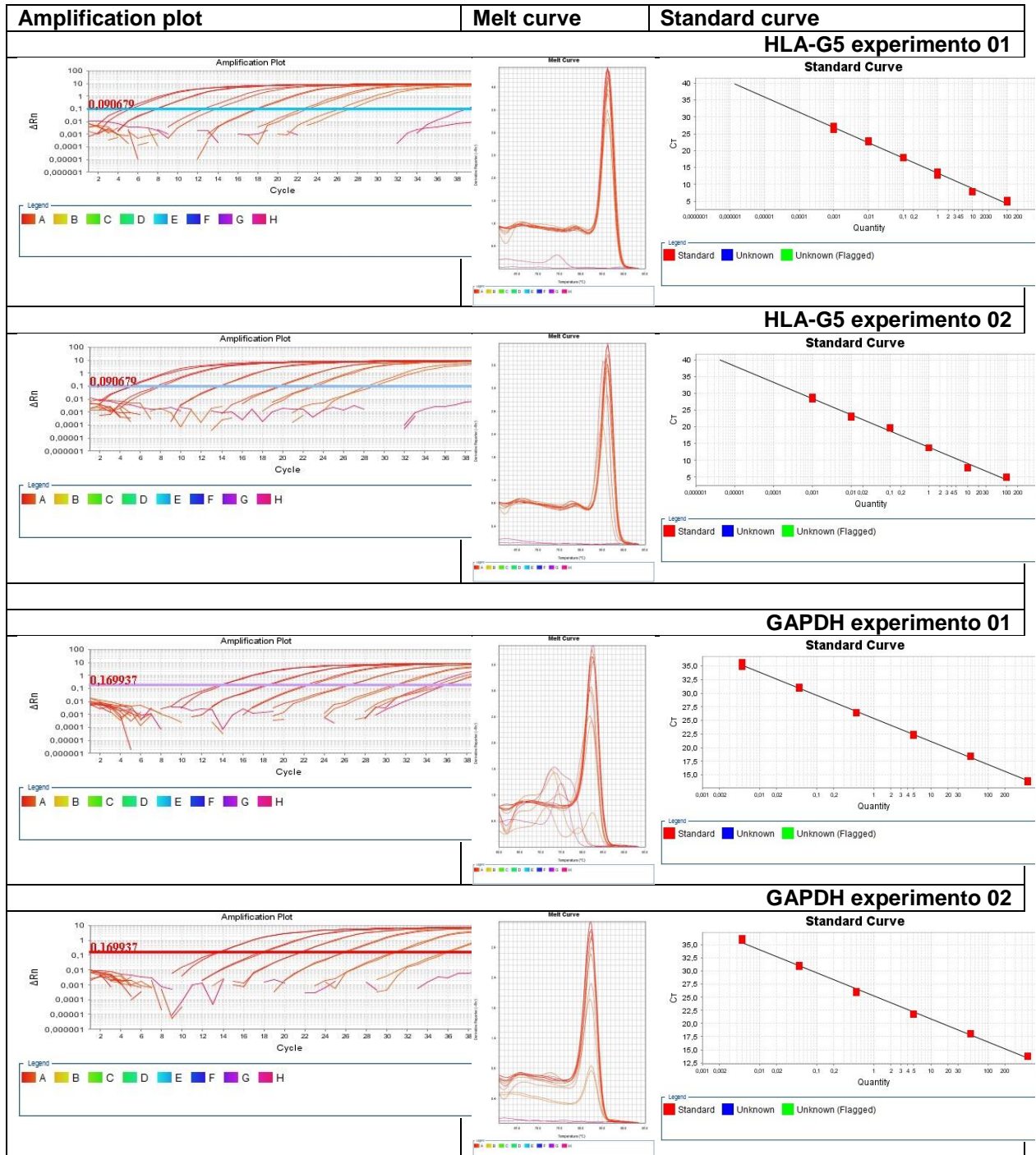
A expressão relativa ( $\Delta$ CT) foi determinada pela subtração do CT da curva de amplificação do RNAm dos alvos testados pelo CT obtido na curva de amplificação de RNAm do *GAPDH*. O estudo comparativo da expressão relativa de RNAm dos alvos, levando em consideração os graus de inflamação, foi realizado aplicando o teste de Mann-Whitney entre os grupos individualizados. O teste de Kruskal-Wallis foi realizado considerando todas as categorias.

### 3.2.7 Avaliação histológica

O fragmento de Biópsia fixado em paraformaldeído a 10% foi incluído em bloco de parafina, permitindo a obtenção de cortes de tecido. O tecido cortado foi

submetido à remoção da parafina, reidratação e coloração histológica para avaliação do grau de inflamação tecidual em leve, moderado ou intenso; este procedimento foi realizado pelo HC-UFPE em sua rotina.

Quadro 3 - Curvas padrão para avaliação da especificidade da reação de PCR em tempo real de HLA-G5 e GAPDH pelo intercalante SYBR Green.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A imunohistoquímica foi realizada utilizando um sistema biotina-estreptavidina. Os espécimes foram desparafinados em xilol, re-hidratados em álcool e lavados em água. Para recuperação antigênica, os cortes foram imersos em tampão 10 mM de citrato de sódio, pH 6,0 por 25 minutos em panela à vapor. Para o bloqueio da peroxidase endógena foi realizada uma incubação de 20 minutos em peróxido de hidrogênio e o bloqueio de ligações inespecíficas foi realizado com leite em pó com baixo teor de gordura diluído 1:100 em PBS por 20 minutos. As lâminas foram incubadas com o anticorpo monoclonal primário para o HLA-G 4H84 (EXBIO, Praga - República Checa), diluídos 1:50, em câmara úmida por 2 horas. Em seguida, foram incubadas em câmara úmida com o polímero MACH 4 Universal HRP Polymer Detection (Biocare Medical Concord, Califórnia - USA), conforme sugere o fabricante. Os cortes foram banhados numa solução contendo 3,3-diaminobenzidina (Dako Carpinteria, Califórnia) por até 5 minutos. Entre as incubações, os tecidos foram lavados com solução de PBS e Tween 20.

Depois de marcados, os cortes foram contracolorados com hematoxilina durante 30 segundos e lavados em água corrente. A montagem das lâminas se deu com bálsamo do Canadá.

A quantificação foi realizada por estimativa: ausência de marcação (negativo), ou gradação de cruces (+), sendo uma para amostras com até 25% do tecido marcado, duas cruces para amostras com até 50%, três cruces para amostras com 75% e quatro cruces para amostras com alta expressão de HLA-G. As amostras foram estratificadas por inflamação e por doença.

### 3.2.8 Avaliação da resposta imune sistêmica

Com o plasma obtido no fracionamento por Ficoll-Paque™ Plus, a quantificação de citocinas da resposta imune adaptativa Th1 e Th2 foi realizada utilizando a técnica de Cytometric Bead Array (CBA), com o BD™ CBA Human Th1/Th2 Cytokine Kit (Becton Dickinson, New Jersey - USA) e leitura no equipamento FACSCalibur (Becton Dickinson, New Jersey - USA). O resultado foi analisado utilizando o software FCAP Array 1.0 (Becton Dickinson, New Jersey - USA).



### **3.3 Análise computacional**

Os cromatogramas foram analisados com o software Lasergene SeqMan 7.0 (DNASTAR, Wisconsin - USA ). As frequências alélicas e genotípicas foram analisadas com o software Genepop 4.0.10. A construção de haplótipos foram usados os programas Arlekin 3.5.1(Laurent Excoffier, Bern - Switzerland) e Phase 2.1 (Washington - USA).

### **3.4 Análise estatística**

As informações clínicas, epidemiológicas e laboratoriais foram analisadas com o software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, California - USA). As variáveis categóricas foram expressas em valores absolutos e frequência relativa. As variáveis contínuas foram expressas em médias ou medianas. A análise de associação utilizou o teste exato bicaudal de Fisher, e razão de Odds quando indicado, sendo considerado significativo o valor de  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Perfil demográfico e clínico dos pacientes com doença inflamatória intestinal

Duzentos e dezessete indivíduos adultos com diagnóstico de doença inflamatória intestinal, dos quais 73 (33,6%) tinham o diagnóstico de doença de Crohn e 144 (66,4%) diagnóstico de RCUI, foram estudados (Tabela 1). Os pacientes com Crohn e RCUI possuem as mesmas características demográficas de gênero e idade, mas diferem na cor da pele ( $p < 0,005$ ). Indivíduos negros são mais prevalentes na RCUI ( $p = 0,002$ ); os morenos possuem a mesma distribuição entre os grupos ( $p = 1,000$ ), enquanto os brancos aparentemente são mais prevalentes 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 Crohn ou RCUI mencionaram história familiar da doença atual. A doença de Crohn apresentou uma distribuição mais ampla quanto a localização da doença atingindo do estômago ao reto com maior frequência para a doença localizada no cólon de forma individualizada ou com lesões em ambos íleo e ceco, enquanto na RCUI a pancolite é a forma mais comum, seguida da colite esquerda e distal (Tabela 2). A lesão tecidual foi considerada moderada e/ou intensa na análise histológica em cerca de 72% dos pacientes com RCUI e doença de Crohn. A presença de DNA genômico de CMV na lesão tecidual foi identificado em 41% dos casos de Crohn testados e de 23% dos casos de RCUI, mas sem diferença significativa ( $p = 0,303$ ). Considerando todas as amostras analisadas quanto ao grau de lesão, incluindo as amostras dos diferentes segmentos intestinais de um mesmo paciente, a presença de CMV não esteve associada com gravidade da lesão moderada/intensa em relação à inativa/leve em DII ( $p = 0,076$ ), na RCUI ( $p = 0,269$ ) ou DC ( $p = 0,267$ ).

Tabela 1 - Características demográficas e sociais dos pacientes com Doença Inflamatória Intestinal atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

	Crohn (n=73)	RCUI (n=144)	DII (n=217)	pvalor
<b>Sexo</b>				
Masculino	34	52	86	0.137
Feminino	39	92	131	
Total	73	144	217	
<b>Idade</b>				
Mediana	41	47	46	0.829
Máximo	82	85	85	
Mínimo	14	18	14	
<b>Cor da pele</b>				
Branco	36	51	87	<b>0.005</b>
Moreno	35	68	103	
Negro	2	25	27	
Total	73	144	217	
<b>Escolaridade</b>				
Não alfabetizado	4	10	14	0.121
Ensino fundamental completo	9	24	33	
Ensino fundamental incompleto	17	36	53	
Ensino médio	24	57	81	
Ensino superior	19	17	36	
Total	73	144	217	
<b>Residência</b>				
Zona Urbana	64	123	187	0.649
Zona Rural	9	21	30	
Total	73	144	217	
<b>Água encanada</b>				
Sim	69	138	207	0.663
Não	4	6	10	
Total	73	144	217	
<b>Renda familiar</b>				
Menor que 2 salários mínimos	35	89	124	0.149
De 2 a 6 salários mínimos	32	46	78	
Maior que 6 salários mínimos	6	9	15	
Total	73	144	217	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 - Características clínicas dos pacientes com doença inflamatória intestinal atendidos no Hospital da Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

	Crohn (n=73)	RCUI (n=144)	DII (n=217)
<b>História familiar</b>			
Sim	6	13	19
Não	44	104	148
Não sabe informar	23	27	50
Total	73	144	217
<b>Localização da doença</b>			
Pancolite	-	69	70
Distal	-	25	25
Colite esquerda	-	27	26
Retossigmóide	-	6	6
Reto	4	2	6
Íleo	8	2	10
Cólon	12	-	12
Cólon e íleo	6	1	7
Cólon, íleo e reto	1	-	1
Cólon e reto	7	-	7
Íleo e ceco	13	-	13
Íleo, ceco e cólon	2	-	2
Íleo, ceco e reto	1	-	1
Íleo e reto	2	-	2
Jejuno e íleo	3	-	3
Duodeno, jejuno e íleo	1	-	1
Envolvimento gástrico e intestinal	3	-	3
Não informado	10	12	22
Total	73	144	217
<b>Forma de apresentação</b>			
Inflamatória	16	-	16
Estenosante	20	-	20
Penetrante	21	-	21
Não informado	16	-	16
Total	73	-	73
<b>Grau de inflamação intestinal*</b>			
Inativa/Leve	7	28	35
Moderada/Intensa	28	60	88
Não informado	38	56	94
Total	73	144	217
<b>Detecção de DNA do CMV*</b>			
Sim	9	15	24
Não	22	66	88
Não realizado	42	63	105
Total	73	144	217
<b>Manifestações extraintestinais</b>			
Osteoarticular	24	71	95
Oftálmica	3	1	4
Dematológica	7	4	11
Vascular	2	9	11
Hepatobiliar	2	5	7
Nefrológicas	3	4	7
Sem alterações	32	50	82
Total	73	144	217

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: Análise realizada em pacientes submetidos à colonoscopia.

#### **4.2 Polimorfismo da região 3' não traduzida no gene *HLA-G* em doença inflamatória intestinal**

Os pacientes com doença de Crohn apresentaram uma menor frequência do genótipo 14bp INS-INS (OR=0,25;  $p=0,006$ ) em relação aos indivíduos saudáveis. O fenótipo INS-INS está relacionado à menor produção de HLA-G. Apesar de não apresentarem aumento na frequência de alelo 14pb DEL ou genótipo 14pb DEL-DEL, pacientes com Crohn apresentaram uma tendência a maior representação do genótipo 14pb INS-DEL (OR= 1,67;  $p=0,074$ ), no entanto é necessário comprovar a associação do genótipo com expressão protéica. Nenhum outro sítio polimórfico observado mostrou-se diferentemente expresso nos pacientes com Crohn (Tabela 3).

Os pacientes com RCUI apresentaram diferenças na distribuição dos genótipos +3003 C-T (OR=2,36;  $p=0,003$ ), +3003 T-T (OR=0,46;  $p=0,006$ ), +3010 C-C (OR=0,60;  $p=0,039$ ) e +3142 G-G (OR=0,60;  $p=0,030$ ) em relação aos indivíduos saudáveis. Os sítios polimórficos +3003 C/T, +3010 C/G e +3142 C/G foram identificados como possíveis sítios para microRNAs, mas ainda não está claro quais sequências são responsáveis pela expressão do HLA-G em diferentes tipos de tecidos.

Tabela 3 - Frequência alélica e genotípica de sítios polimórficos na região 3' não traduzida do gene *HLA-G* em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e estratificado pela doença: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI). (continua)

	CONTROLE			DC		RCUI				DII			
	Freq (n=249)	Freq (n=67)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=131)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=198)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança
<b>Alelo 14bp</b>													
DEL	0,572	0,649	0,114	1,38	0,93 - 2,06	0,603	0,439	1,14	0,83 - 1,54	0,619	0,171	1,21	0,93 - 1,59
INS	0,428	0,351		0,72	0,49 - 1,08	0,397		0,88	0,65 - 1,19	0,381		0,82	0,63 - 1,08
Genótipo													
DEL-DEL	0,345	0,358	0,886	1,06	0,60 - 1,86	0,374	0,575	1,13	0,73 - 1,76	0,369	0,620	1,11	0,75 - 1,63
INS-DEL	0,454	0,582	0,074	1,68	0,97 - 2,90	0,458	1,000	1,02	0,67 - 1,56	0,500	0,342	1,20	0,83 - 1,75
INS-INS	0,201	0,060	<b>0,006</b>	0,25	0,088 - 0,73	0,168	0,492	0,80	0,46 - 1,40	0,131	0,058	0,60	0,36 - 1,01
<b>Alelo +3003C/T</b>													
C	0,068	0,112	0,102	1,72	0,91 - 3,26	0,122	<b>0,015</b>	1,90	1,14 - 3,16	0,119	<b>0,010</b>	1,84	1,16 - 2,92
T	0,932	0,888		0,58	0,31 - 1,10	0,878		0,53	0,32 - 0,88	0,881		0,54	0,34 - 0,86
Genótipo													
C-C	0,008	0,030	0,199	3,80	0,53 - 27,51	0,000	0,547	0,38	0,02 - 7,91	0,010	1,000	1,26	0,18 - 9,03
C-T	0,120	0,164	0,412	1,43	0,68 - 3,04	0,244	<b>0,003</b>	2,36	1,36 - 4,10	0,217	<b>0,007</b>	2,03	1,22 - 3,37
T-T	0,871	0,806	0,173	0,61	0,30 - 1,25	0,756	<b>0,006</b>	0,46	0,27 - 0,79	0,773	<b>0,008</b>	0,50	0,31 - 0,83
<b>Alelo +3010C/G</b>													
C	0,588	0,567	0,693	0,92	0,62 - 1,35	0,519	0,077	0,76	0,56 - 1,02	0,535	0,119	0,81	0,62 - 1,05
G	0,412	0,433		1,09	0,74 - 1,60	0,481		1,32	0,98 - 1,79	0,465		1,24	0,95 - 1,62
Genótipo													
C-C	0,369	0,313	0,473	0,78	0,44 - 1,39	0,260	<b>0,039</b>	0,60	0,76 - 2,11	0,278	<b>0,043</b>	0,66	0,44 - 0,99
C-G	0,438	0,507	0,897	0,95	0,57 - 1,58	0,519	0,160	1,39	0,91 - 2,12	0,515	0,106	1,37	0,94 - 1,99
G-G	0,193	0,179	0,242	0,64	0,31 - 1,29	0,221	0,509	0,83	0,49 - 1,41	0,207	0,722	1,09	0,69 - 1,74
<b>Alelo +3027A/C</b>													
A	0,042	0,007	0,061	0,17	0,02 - 1,28	0,053	0,474	1,28	0,64 - 2,56	0,038	0,864	0,89	0,45 - 1,75
C	0,958	0,993		5,88	0,78 - 44,14	0,947		0,78	0,39 - 1,57	0,962		1,12	0,57 - 2,21
Genótipo													
A-A	0,004	0,000	1,000	1,22	0,05 - 30,37	0,000	1,000	0,63	0,03 - 15,52	0,000	1,000	0,41	0,02 - 10,22
A-C	0,077	0,015	0,088	0,18	0,02 - 1,39	0,107	0,341	1,44	0,70 - 2,98	0,076	1,000	0,99	0,49 - 2,00
C-C	0,919	0,985	0,057	5,79	0,76 - 43,97	0,893	0,451	0,73	0,36 - 1,50	0,924	1,000	1,07	0,53 - 2,15

Tabela 3 - Frequência alélica e genotípica de sítios polimórficos na região 3' não traduzida do gene *HLA-G* em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e estratificado pela doença: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI). (conclusão)

	CONTROLE			DC		RCUI				DII			
	Freq (n=249)	Freq (n=67)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=131)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=198)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança
<b>Alelo +3035C/T</b>													
C	0,849	0,881	0,408	1,31	0,73 - 2,33	0,859	0,748	1,08	0,70 - 1,65	0,866	0,502	1,15	0,79 - 1,68
T	0,151	0,119		0,76	0,43 - 1,36	0,141		0,93	0,61 - 1,42	0,134		0,87	0,60 - 1,27
Genótipo													
C-C	0,735	0,761	0,754	1,15	0,61 - 2,16	0,740	1,000	1,03	0,64 - 1,67	0,747	0,828	1,07	0,70 - 1,64
C-T	0,229	0,239	0,871	1,06	0,56 - 1,99	0,237	0,899	1,04	0,63 - 1,72	0,237	0,910	1,05	0,67 - 1,63
T-T	0,036	0,000	0,213	0,19	0,01 - 3,27	0,023	0,556	0,63	0,17 - 2,35	0,015	0,241	0,41	0,11 - 1,54
<b>Alelo +3142C/G<sup>1</sup></b>													
C	0,407	0,424	0,765	1,07	0,73 - 1,58	0,466	0,141	1,27	0,94 - 1,72	0,452	0,193	1,20	0,92 - 1,57
G	0,593	0,576		0,93	0,63 - 1,38	0,534		0,79	0,58 - 1,07	0,548		0,83	0,64 - 1,09
Genótipo													
C-C	0,193	0,182	1,000	0,93	0,46 - 1,87	0,198	0,892	1,03	0,61 - 1,76	0,193	1,000	1,00	0,62 - 1,60
C-G	0,428	0,485	0,485	1,26	0,73 - 2,17	0,534	0,051	1,53	1,00 - 2,35	0,518	0,068	1,44	0,98 - 2,09
G-G	0,379	0,333	0,566	0,82	0,46 - 1,46	0,267	<b>0,030</b>	0,60	0,38 - 0,95	0,289	0,055	0,67	0,45 - 1,00
<b>Alelo +3187A/G<sup>1</sup></b>													
A	0,713	0,754	0,379	1,23	0,79 - 1,93	0,691	0,552	0,90	0,65 - 1,27	0,712	1,000	1,00	0,74 - 1,34
G	0,287	0,246		0,81	0,52 - 1,27	0,309		1,11	0,80 - 1,55	0,288		1,00	0,75 - 1,35
Genótipo													
A-A	0,553	0,554	1,000	1,00	0,58 - 1,75	0,492	0,274	0,78	0,51 - 1,21	0,513	0,438	0,85	0,58 - 1,25
A-G	0,321	0,400	0,884	0,93	0,52 - 1,66	0,398	0,815	0,92	0,58 - 1,46	0,399	0,105	1,41	0,95 - 2,09
G-G	0,127	0,046	0,074	0,33	0,10 - 1,13	0,109	0,737	0,85	0,43 - 1,66	0,088	0,218	0,67	0,36 - 1,25
<b>Alelo +3196C/G<sup>1</sup></b>													
C	0,697	0,769	0,125	1,45	0,92 - 2,28	0,756	0,100	1,35	0,95 - 1,91	0,760	<b>0,045</b>	1,38	1,02 - 1,88
G	0,303	0,231		0,69	0,44 - 1,08	0,244		0,74	0,52 - 1,05	0,240		0,72	0,53 - 0,98
Genótipo													
C-C	0,487	0,585	0,207	1,48	0,85 - 2,58	0,591	0,062	1,52	0,98 - 2,35	0,589	<b>0,041</b>	1,51	1,02 - 2,21
C-G	0,419	0,369	0,569	0,81	0,46 - 1,43	0,331	0,692	0,89	0,53 - 1,49	0,344	0,133	0,73	0,50 - 1,08
G-G	0,094	0,046	0,312	0,47	0,14 - 1,61	0,079	0,701	0,82	0,38 - 1,80	0,068	0,378	0,70	0,34 - 1,43

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: <sup>1</sup>Não foi possível identificar um ou mais sítios polimórficos em algumas amostras.

Sabendo que indivíduos de ancestralidade Africana possui uma frequência alélica para o sítio polimórfico +3003 diferente de indivíduos com ancestralidade caucasiana e que a RCUI é mais frequente em indivíduos da raça negra, a distribuição da frequência dos genótipos para o sítio polimórfico +3003 C/T foi analisada após estratificação da população pela variável “cor da pele”, como expressão da herança genética dos indivíduos com RCUI, e não foi observada diferença significativa da distribuição de genótipo entre os indivíduos dos grupos Branco/não-Brancos ( $p=1,000$ ), ou entre os indivíduos dos grupos Moreno/não-Moreno ( $p=0,217$ ), permanecendo significativa a diferença na expressão dos genótipos para os indivíduos dos grupos Negro/não-Negro ( $p=0,047$ ; OR=2,97; 95%IC=1,11-7,93), sugerindo que Brasileiros descendentes de Africanos portadores do genótipo +3003 C-T sejam mais susceptíveis ao desenvolvimento da RCUI (Tabela 4).

Em relação aos haplótipos da região 3' não traduzida do *HLA-G* observamos que o haplótipo URT-1 possui distribuição semelhante entre o grupo saudável e portadores de DII. O haplótipo UTR-2 (INS14pb: +3003T: +3010C: +3027C: +3035C: +3142G: +3187A: +3196G) apresentou tendência a menor expressão em portadores de DII em relação a população saudável (OR=0,73;  $p=0,053$ ), essa tendência reflete a menor frequência dos alelos +3003T ( $p=0,010$ ) e +3196G ( $p=0,044$ ) e dos genótipos +3010C-C ( $p=0,043$ ) e +3142G-G ( $p=0,054$ ) encontrada nos pacientes com DII, sugerindo a possível associação dessa assinatura genética com proteção à doença. O interessante é que na população saudável os haplótipos UTR-1 e UTR-2 são os mais frequentes e apresentam distribuição semelhante e em torno de 28%.

O haplótipo UTR-4 (14pbDEL: +3003C/+3010G/+3027C/+3035C/+3142C/+3187A/+3196C) foi o único que mostrou-se envolvido na susceptibilidade ao desenvolvimento de DII em comparação ao grupo saudável (OR=1,79;  $p=0,020$ ). A sequência da UTR-4 difere em cinco dos oito sítios polimórficos definidos no haplótipo 3'UTR da sequência da UTR-2, dos quais os alelos +3003C e +3196C encontram-se com expressão aumentada no grupo de pacientes (Tabela 5).



Tabela 4 - Frequência do sítio polimórfico +3003 C/T da região 3' não traduzida do gene *HLA-G* em pacientes portadores de Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI), estratificados pela cor da pele.

HLA-G 3'UTR			
Cor da pele	+3003C-T	+3003T-T	pvalor
Branco	10	34	1,000
Moreno	12	53	0,217
Negro	09	12	0,047
total	31	99	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 5 - Frequência haplotípica da região 3' não traduzida do gene *HLA-G* em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e estratificado pela doença: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI).

	CONTROLE			DC		RCUI				DII			
	Freq (n=442)	Freq (n=128)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=242)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=370)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança
UTR-1 (DTGCCCCG)	0,274	0,242	0,498	0,85	0,54 - 1,34	0,289	0,722	1,08	0,76 - 1,53	0,273	1,000	1,00	0,73 - 1,36
UTR-2 (ITCCCGAG)	0,285	0,211	0,113	0,67	0,42 - 1,08	0,231	0,148	0,76	0,53 - 1,09	0,224	0,053	0,73	0,53 - 1,00
UTR-3 (DTCCCGAC)	0,167	0,203	0,357	1,27	0,77 - 2,09	0,136	0,322	0,79	0,50 - 1,22	0,159	0,776	0,94	0,65 - 1,37
UTR-4 (DCGCCCAC)	0,070	0,109	0,191	1,63	0,84 - 3,16	0,124	<b>0,024</b>	1,88	1,11 - 3,18	0,119	<b>0,020</b>	1,79	1,11 - 2,90
UTR-5 (ITCCTGAC)	0,086	0,117	0,301	1,41	0,75 - 2,66	0,095	0,677	1,12	0,65 - 1,92	0,103	0,468	1,22	0,76 - 1,95
UTR-6 (DTGCCCAC)	0,059	0,070	0,676	1,21	0,55 - 2,65	0,041	0,374	0,69	0,33 - 1,46	0,051	0,759	0,87	0,47 - 1,59
UTR-7 (ITCATGAC)	0,038	0,008	0,091	0,20	0,03 - 1,49	0,054	0,435	1,42	0,68 - 2,97	0,038	1,000	0,98	0,48 - 2,02
UTR-10 (DTCCCGAG)	0,000	0,016	0,050	17,49	0,83 - 366,9	0,000				0,005	0,207	6,00	0,29 - 125,5
UTR-11(DCCCGAC)	0,000	0,008	0,225	10,41	0,42 - 257,3	0,000				0,003	0,456	3,59	0,15 - 88,52
UTR-13(DTCCTGAC)	0,002	0,000	1,000	1,15	0,05 - 28,31	0,000	1,000	0,61	0,03 - 14,97	0,000	1,000	0,40	0,02 - 9,79
UTR-15 (ITCCCGAC)	0,007	0,016	0,314	2,32	0,38 - 14,06	0,017	0,251	2,46	0,55 - 11,08	0,016	0,314	2,41	0,60 - 9,72
UTR-16(ITCCTGAG)	0,009	0,000	0,580	0,38	0,02 - 7,09	0,000	0,303	0,20	0,01 - 3,75	0,000	0,130	0,13	0,01 - 2,45
UTR-17 (ITCCCGGG)	0,002	0,000	1,000	1,15	0,05 - 28,31	0,004	1,000	1,83	0,11 - 29,41	0,003	1,000	1,20	0,08 - 19,19
UTR-19 (DTGCCGAC)	0,000	0,000				0,008	0,125	9,20	0,44 - 192,5	0,005	0,207	6,00	0,29 - 125,5

Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.3 Polimorfismo da região promotora do gene *IL-10* em doença inflamatória intestinal

Os pacientes portadores de DII apresentaram uma distribuição de alelos C e T na posição -819 da região promotora do gene *IL-10* semelhante aos indivíduos saudáveis ( $p>0,05$ ), independente da estratificação dos casos pelo tipo de doença (Tabela 6). Em relação ao sítio polimórfico -1082A/G, o alelo A mostrou-se mais prevalente em pacientes com doença de Crohn em relação aos indivíduos saudáveis (OR=3,21;  $p=0,033$ ), fato não observado em pacientes com RCUI ( $p=0,602$ ). O alelo -1082 A tem sido relacionado à menor produção de IL-10. Apesar da ausência do genótipo -1082 A-A, foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa do genótipo heterozigoto -1082G-A em pacientes com Crohn (OR=3,35;  $p=0,030$ ), mas não nos pacientes com RCUI em relação aos indivíduos saudáveis, sugerindo a presença de um determinante genético na resposta Th1 típica na patogênese da Doença de Crohn. O polimorfismo na posição -592C/A foi determinado com base na regra do desequilíbrio de ligação com o sítio -819C/T, não apresentando diferença entre grupos de pacientes e indivíduos saudáveis.

A predição de haplótipos para os três sítios polimórficos -1082A/G:-819C/T:-592A/C na região promotora do gene *IL-10* identificou três dos quatro possíveis combinações de alelos. A sequência de alelos selvagens (-1082G/-819C/-592C) constituiu o haplótipo mais frequente (65%), sendo os haplótipos -1082A/-819T/-592A e -1082G/-819T/-592A menos representados (Tabela 7).

O haplótipo representado pela mutação nos três sítios polimórficos (-1082A/-819T/-592A) apresentou associação à predisposição a doença de Crohn (OR=3,21;  $p=0,0326$ ). Este haplótipo está relacionado à menor produção da molécula de IL-10, explicando, em parte, a menor regulação negativa da inflamação na lesão intestinal na doença de Crohn. No entanto, não encontramos o haplótipo -1082A/-819T/-592A em homozigose (dado não apresentado) em nenhum dos pacientes com DC, uma vez que o genótipo -1082A-A também não foi encontrado.

Tabela 6 - Frequência alélica e genotípica de sítios polimórficos na região promotora do gene *IL-10* em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e estratificado pela doença: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI).

	CONTROLE			DC		RCUI				DII			
	Freq (n=239)	Freq (n=69)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=137)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=206)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança
<b>Alelo -819 (C/T)</b>													
C	0,632	0,623	0,920	0,96	0,65 - 1,43	0,675	0,235	1,21	0,89 - 1,66	0,658	0,440	1,12	0,85 - 1,48
T	0,368	0,377		1,04	0,70 - 1,53	0,325		0,83	0,60 - 1,13	0,342		0,89	0,68 - 1,18
Genótipo													
C-C	0,402	0,391	1,000	0,96	0,55 - 1,66	0,467	0,234	1,31	0,85 - 2,00	0,442	0,441	1,18	0,81 - 1,72
C-T	0,460	0,464	1,000	1,01	0,59 - 1,74	0,416	0,451	0,84	0,55 - 1,28	0,432	0,567	0,89	0,61 - 1,30
T-T	0,138	0,145	0,846	1,06	0,49 - 2,27	0,117	0,634	0,83	0,44 - 1,56	0,126	0,780	0,90	0,52 - 1,57
<b>Alelo -1082 (A/G)<sup>1</sup></b>													
A	0,066	0,058	<b>0,033</b>	3,21	1,21 - 8,48	0,026	0,602	1,38	0,51 - 3,74	0,037	0,145	1,98	0,86 - 4,57
G	0,934	0,942		0,31	0,12 - 0,82	0,974		0,73	0,27 - 1,98	0,963		0,51	0,22 - 1,17
Genótipo													
A-A	0,000	0,000				0,007	0,363	5,30	0,21 - 131,2	0,005	0,462	3,51	0,14 - 86,79
A-G	0,038	0,116	<b>0,030</b>	3,35	1,24 - 9,05	0,037	1,000	0,98	0,32 - 2,97	0,063	0,273	1,73	0,72 - 4,14
G-G	0,962	0,884	<b>0,030</b>	0,30	0,11 - 0,81	0,956	0,788	0,85	0,30 - 2,44	0,932	0,197	0,53	0,23 - 1,26

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: <sup>1</sup>Não foi possível identificar um sítio polimórfico em uma das amostras.

Tabela 7 - Frequência haplotípica da região promotora do gene *IL-10* em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e estratificado pela doença: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI).

	CONTROLE			DC		RCUI				DII			
	Freq (n=478)	Freq (n=138)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=272)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=410)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança
<b>ATA</b>	0,019	0,058	<b>0,033</b>	3,21	1,21 - 8,48	0,026	0,602	1,38	0,51 - 3,74	0,037	0,019	1,98	0,86 - 4,57
<b>GTA</b>	0,349	0,319	0,542	0,87	0,58 - 1,31	0,301	0,197	0,80	0,58 - 1,11	0,307	0,349	0,83	0,62 - 1,10
<b>GCC</b>	0,632	0,623	0,920	0,96	0,65 - 1,43	0,673	0,267	1,20	0,88 - 1,64	0,656	0,632	1,11	0,84 - 1,47

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### **4.4 Polimorfismo da região promotora do gene *TNF* em doença inflamatória intestinal**

Os pacientes portadores de DII apresentaram uma distribuição de alelos semelhante em relação aos indivíduos sadios para os sítios polimórficos -1031C/T, -857C/T, -308A/G e -238A/G do gene *TNF*, ( $p > 0,05$ ), independente da estratificação dos casos pelo tipo de doença (Tabela 8). Em relação ao sítio polimórfico -863 A/C, o alelo A mostrou-se com frequência mais elevada em pacientes com RCUI em relação aos indivíduos sadios (OR=1,55;  $p=0,033$ ), fato não observado em pacientes com Crohn ( $p=0,348$ ). O grupo de pacientes com RCUI apresentou diminuição do genótipo -863C-C em relação aos controles sadios, estando relacionado à proteção ao desenvolvimento da doença (OR=0,60;  $p=0,034$ ).

O haplótipo mais frequente na região promotora do *TNF* foi -1031T/-863C/-857C/-308G/-238G (57%), concordando com a literatura (Tabela 9). Apenas em pacientes com RCUI foi encontrada uma diferença estatística significativa em relação ao haplótipo -1031C/-863A/-857C/-308G/-238G (OR=1,56;  $p=0,044$ ). O alelo -863A está associado a uma diminuição na produção de *TNF*, desta forma podendo a resposta inflamatória tecidual no local da lesão ser mais branda.

#### **4.5 Ausência de associação entre polimorfismos e grau de inflamação intestinal**

Os sítios polimórficos HLA-G 14pb INS/DEL e IL-10 -1082A/G, associados à susceptibilidade a doença de Crohn, foram testados considerando o grau de inflamação tecidual inativa/leve e moderado/intenso. De forma similar, em RCUI também foram testados os sítios HLA-G +3003C/T, +3010C/G, +3142C/G E *TNF* -863A/C. Nenhum dos sítios esteve associado ao grau de lesão tecidual em nenhuma das doenças, tampouco considerando as duas juntas.

Tabela 8 - Frequência alélica e genotípica de sítios polimórficos na região promotora do gene *TNF* em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e estratificado pela doença: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI). (continua)

	CONTROLE		DC			RCUI				DII			
	Freq (n=233)	Freq (n=66)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=132)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=198)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança
<b>Alelo -1031C/T<sup>1</sup></b>													
C	0,224	0,220	1,000	0,98	0,60 - 1,6	0,267	0,220	1,26	0,87 - 1,81	0,251	0,399	1,16	0,84 - 1,62
T	0,776	0,780		1,02	0,63 - 1,67	0,733		0,79	0,55 - 1,15	0,749		0,86	0,62 - 1,20
Genótipo													
C-C	0,038	0,068	0,300	1,86	0,54 - 6,39	0,067	0,288	1,82	0,67 - 4,99	0,067	0,250	1,83	0,73 - 4,59
C-T	0,373	0,305	0,361	0,74	0,40 - 1,37	0,400	0,640	1,12	0,71 - 1,78	0,369	1,000	0,98	0,65 - 1,49
T-T	0,590	0,627	0,654	1,17	0,65 - 2,12	0,533	0,357	0,80	0,51 - 1,25	0,564	0,681	0,90	0,60 - 1,35
<b>Alelo -863A/C<sup>1</sup></b>													
A	0,156	0,192	0,348	1,29	0,78 - 2,13	0,223	<b>0,033</b>	1,55	1,05 - 2,29	0,212	<b>0,040</b>	1,46	1,03 - 2,07
C	0,844	0,808		0,78	0,47 - 1,28	0,777		0,64	0,44 - 0,95	0,788		0,68	0,48 - 0,97
Genótipo													
A-A	0,026	0,031	0,689	1,19	0,23 - 6,05	0,047	0,689	1,19	0,23 - 6,05	0,041	0,422	1,62	0,55 - 4,76
A-C	0,260	0,323	0,346	1,36	0,75 - 2,47	0,352	0,071	1,55	0,97 - 2,47	0,342	0,070	1,48	0,98 - 2,25
C-C	0,714	0,646	0,289	0,73	0,41 - 1,31	0,602	<b>0,034</b>	0,60	0,38 - 0,95	0,617	<b>0,038</b>	0,64	0,43 - 0,97
<b>Alelo -857C/T<sup>1</sup></b>													
C	0,915	0,931	0,717	1,25	0,59 - 2,64	0,946	0,140	1,62	0,86 - 3,03	0,941	0,186	1,47	0,86 - 2,51
T	0,085	0,069		0,80	0,38 - 1,70	0,054		0,62	0,33 - 1,16	0,059		0,68	0,40 - 1,16
Genótipo													
C-C	0,839	0,892	0,331	1,59	0,67 - 3,75	0,891	0,208	1,58	0,82 - 3,04	0,892	0,121	1,58	0,89 - 2,80
C-T	0,152	0,077	0,151	0,46	0,17 - 1,24	0,109	0,267	0,68	0,35 - 1,31	0,098	0,108	0,60	0,33 - 1,10
T-T	0,009	0,031	0,258	3,10	0,43 - 22,44	0,000	0,520	0,30	0,01 - 6,35	0,010	1,000	1,19	0,17 - 8,51

Tabela 8 - Frequência alélica e genotípica de sítios polimórficos na região promotora do gene *TNF* em pacientes portadores de doença inflamatória intestinal (DII) e estratificado pela doença: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI). (conclusão)

	CONTROLE		DC			RCUI				DII			
	Freq (n=233)	Freq (n=66)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=132)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=198)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança
<b>Alelo -308A/G</b>													
A	0,120	0,114	1,000	0,94	0,51 - 1,72	0,136	0,562	1,16	0,74 - 1,81	0,129	0,756	1,08	0,72 - 1,62
G	0,880	0,886		1,07	0,58 - 1,95	0,864		0,87	0,55 - 1,36	0,871		0,92	0,62 - 1,39
Genótipo													
A-A	0,013	0,000	1,000	0,50	0,03 - 9,71	0,015	1,000	1,18	0,20 - 7,15	0,010	1,000	0,78	0,13 - 4,73
A-G	0,215	0,227	0,866	1,08	0,56 - 2,07	0,242	0,602	1,17	0,71 - 1,94	0,237	0,644	1,14	0,72 - 1,79
G-G	0,773	0,773	1,000	1,00	0,52 - 1,92	0,742	0,525	0,85	0,52 - 1,39	0,753	0,650	0,90	0,57 - 1,40
<b>Alelo -238A/G<sup>1</sup></b>													
A	0,068	0,038	0,300	0,55	0,21 - 1,43	0,049	0,337	0,71	0,36 - 1,38	0,046	0,185	0,65	0,36 - 1,19
G	0,932	0,962		1,83	0,70 - 4,81	0,951		1,42	0,73 - 2,76	0,954		1,53	0,84 - 2,78
Genótipo													
A-A	0,004	0,000	1,000	1,15	0,05 - 28,65	0,000	1,000	0,57	0,02 - 14,10	0,000	1,000	0,38	0,02 - 9,45
A-G	0,128	0,077	0,380	0,57	0,21 - 1,54	0,098	0,497	0,75	0,37 - 1,49	0,091	0,278	0,69	0,37 - 1,28
G-G	0,868	0,923	0,283	1,83	0,68 - 4,92	0,902	0,401	1,39	0,70 - 2,78	0,909	0,220	1,51	0,82 - 2,81

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota: <sup>1</sup>Não foi possível identificar um ou mais sítios polimórficos em algumas amostras.

Tabela 9 - Frequência haplotípica da região promotora do gene *TNF* em pacientes portadores de Doença Inflamatória Intestinal (DII) e estratificado pela doença: Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI).

	CONTROLE			DC		RCUI				DII			
	Freq (n=386)	Freq (n=120)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=236)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança	Freq (n=356)	pvalor	Odds Ratio	95% intervalo de confiança
<b>CACGG</b>	0,137	0,175	0,304	1,33	0,77 - 2,32	0,199	<b>0,044</b>	1,56	1,02 - 2,41	0,191	0,059	1,48	1,00 - 2,20
<b>CCCGA</b>	0,044	0,033	0,614	0,68	0,22 - 2,05	0,055	0,708	1,14	0,54 - 2,40	0,048	1,000	0,98	0,49 - 1,96
<b>TCCGG</b>	0,614	0,592	0,670	0,91	0,60 - 1,38	0,564	0,239	0,81	0,58 - 1,13	0,573	0,263	0,84	0,63 - 1,13
<b>TACGG</b>	0,008	0,008	1,000	1,07	0,11 - 10,42	0,000	1,000	0,46	0,02 - 8,95	0,003	0,625	0,36	0,04 - 3,48
<b>TCCAG</b>	0,119	0,108	0,871	0,90	0,47 - 1,73	0,144	0,389	1,24	0,77 - 2,00	0,132	0,657	1,12	0,73 - 1,74
<b>TCTGG</b>	0,065	0,075	0,679	1,17	0,53 - 2,58	0,038	0,203	0,57	0,26 - 1,25	0,051	0,435	0,77	0,41 - 1,44
<b>CCCGG</b>	0,013	0,008	1,000	0,64	0,07 - 5,54	0,000	0,163	0,15	0,01 - 2,67	0,003	0,416	0,32	0,04 - 2,78

Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.6 Expressão de HLA-G na lesão de mucosa intestinal

A expressão de RNAm da isoforma solúvel G5 do HLA-G nas lesões de biópsias, foram avaliadas em 20 pacientes que possuíam duas regiões do intestino com graus de inflamação diferentes sendo um mais grave que o outro e 6 pacientes com apenas uma região e grau de inflamação. Dos 20 pacientes com análise em dois fragmentos, 4 pacientes apresentaram biópsia com inflamação inativa e intensa, 5 com inflamação inativa e moderada, 5 leve e intensa, 5 leve e moderada e um com inflamação inativa e leve. Dos 6 pacientes com apenas uma amostra de lesão de mucosa, 5 tinham inflamação intensa e 1 inflamação moderada.

Fragmentos de biópsia sem atividade inflamatória ou com atividade leve apresentaram expressão de RNAm para isoforma de HLA-G5 (Tabela 10) relativa a expressão constitutiva de RNAm do GAPDH inferior (maior  $\Delta$ CT) ao encontrado nas lesões com grau de inflamação moderada e intensa, contudo essa diferença não foi significativamente diferente ( $p=0,115$ ).

Tabela 10 - Expressão relativa de RNAm de HLA-G5 em biópsia de mucosa intestinal de pacientes em fase aguda da doença inflamatória intestinal, classificados por grau de inflamação.

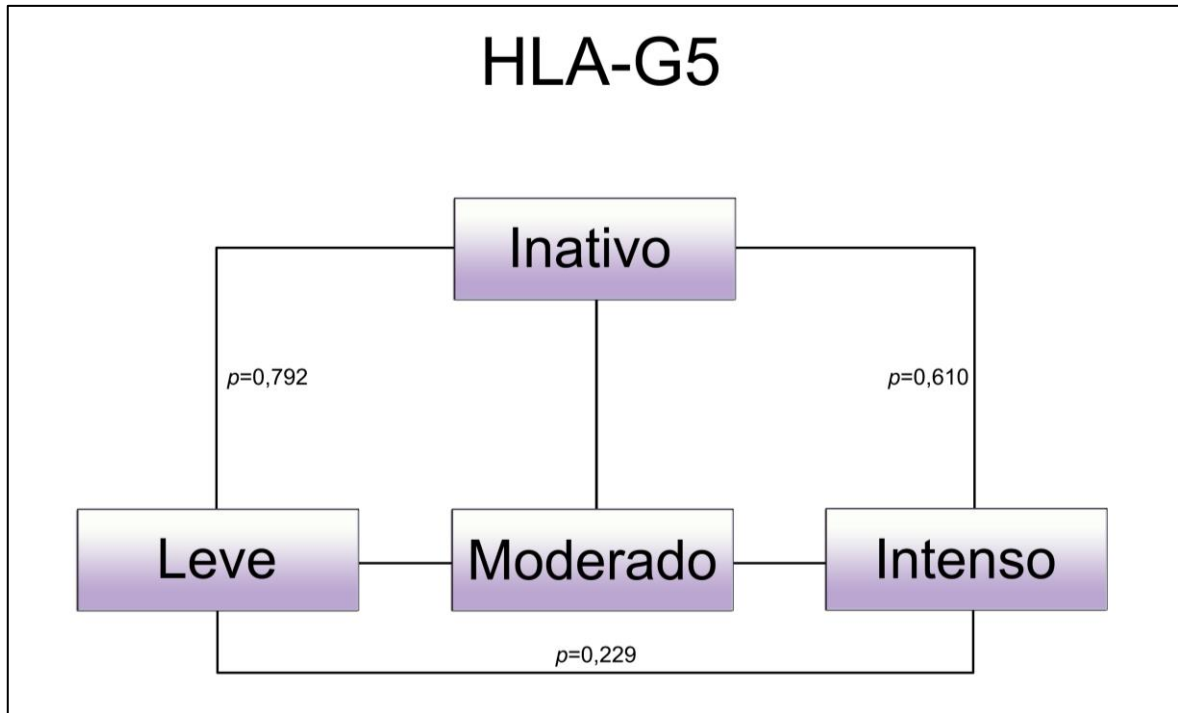
HLA-G5	Grau de inflamação			
	$\Delta$ CT Inativa	$\Delta$ CT Leve	$\Delta$ CT Moderada	$\Delta$ CT Intensa
Média	11,12	12,02	8,38	7,48
Desvio padrão	1,37	2,97	1,66	5,42
Mediana	10,91	11,75	8,38	7,60

Fonte: Elaborado pelo autor.

Não houve diferença estatística entre os grupos inativo e leve ( $p=0,792$ ), inativo e intenso ( $p=0,610$ ), e entre os grupos leve e intenso ( $p=0,229$ ) (Figura 6). A análise pareada da expressão relativa de HLA-G, considerando presença ou ausência de expressão de HLA-G5, em dois sítios intestinais de um mesmo paciente não mostrou diferença significativa ( $p=1,000$ ).



Figura 6 - Comparação da expressão de RNAm HLA-G5 entre os diferentes graus de inflamação.



Fonte: elaborado pelo autor

#### 4.7 Expressão de RNAm IL-10 na lesão de mucosa intestinal

A expressão de RNAm de IL-10 foi estudada nas mesmas amostras que o HLA-G5, e expressos em comparação com os níveis de expressão do RNAm do GAPDH.

Os dados de expressão relativa do RNAm IL-10 mostraram queda na produção de IL-10 no início do processo inflamatório (lesão LEVE) em relação a mucosa sem lesão (INATIVA), importante evento na formulação inicial da resposta imune (Tabela 11). Por outro lado, com o agravamento da inflamação (lesão INTENSA), há um aumento na produção de IL-10, possivelmente, como parte do mecanismo de retroalimentação negativa, visando a regulação da resposta imunológica no sítio da lesão e retorno tecidual à normalidade.

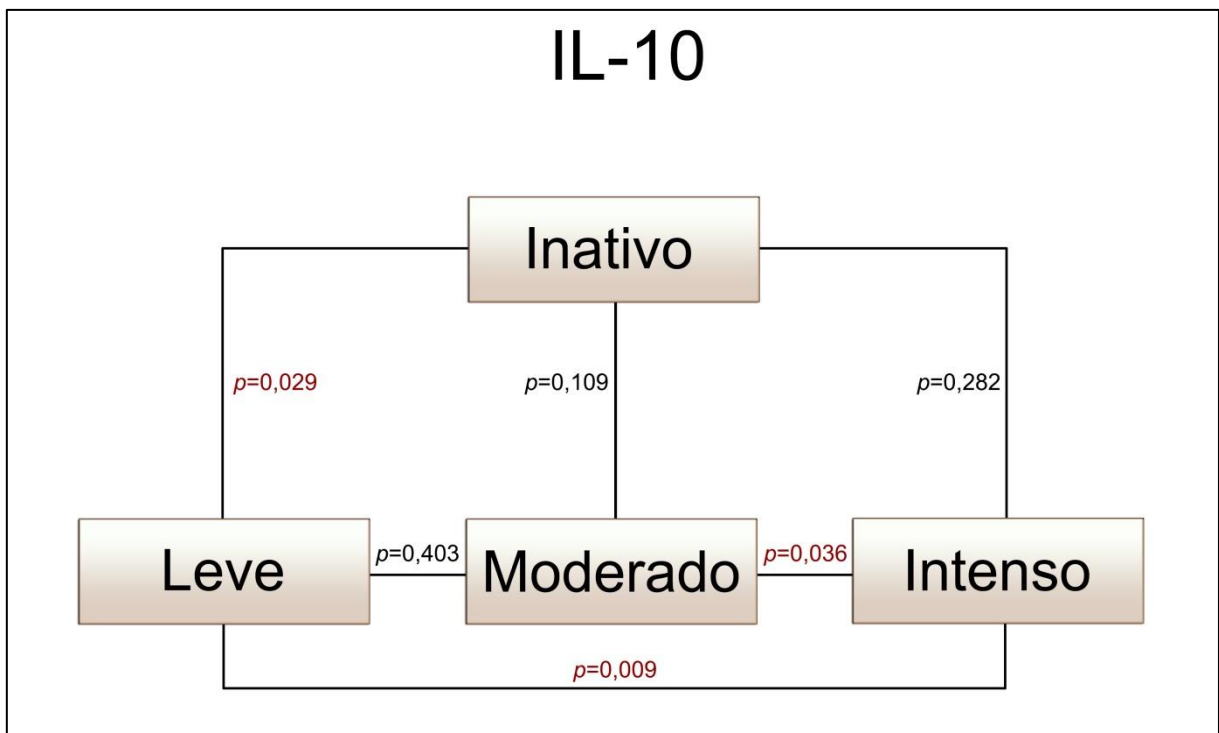
Tabela 11: Expressão relativa de RNAm de IL-10 em biópsia de mucosa intestinal de pacientes em fase aguda da doença inflamatória intestinal, classificados por grau de inflamação.

IL-10	Grau de inflamação			
	$\Delta$ CT Inativa	$\Delta$ CT Leve	$\Delta$ CT Moderada	$\Delta$ CT Intensa
Média	6,87	9,69	8,30	5,75
Desvio padrão	2,41	1,38	2,36	1,98
Mediana	7,12	10,12	8,96	5,44

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise estatística comparativa entre cada grupo histológico mostrou diferença significativa na produção de RNAm de IL-10 entre os grupos classificados histologicamente com inflamações inativas e leves ( $p=0,029$ ), entre os com lesão moderada e intensa ( $p=0,036$ ), e maior diferença estatística entre os grupos com lesões leve e intensa ( $p=0,009$ ), confirmando o papel do IL-10 na regulação da resposta imune na mucosa intestinal (Figura 7).

Figura 7. Comparação da expressão de RNAm IL-10 entre os diferentes graus de inflamação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.8 Expressão de RNAm de TNF na lesão de mucosa intestinal

A expressão relativa de RNAm de TNF foi estudada nas mesmas amostras que o HLA-G5 e IL-10, de forma similar. Aparentemente, a expressão de RNAm de TNF na mucosa intestinal é semelhante na forma inativa, leve e moderada de pacientes portadores de DII (Tabela 12), e superior na lesão grave. Por outro lado, não é possível dizer, se a linha de base na expressão em pacientes com lesão inativa corresponde ao esperado em pacientes saudáveis (não portadores de DII), ou representa o estado não reativo de pacientes com DII, sendo diferente do normal.

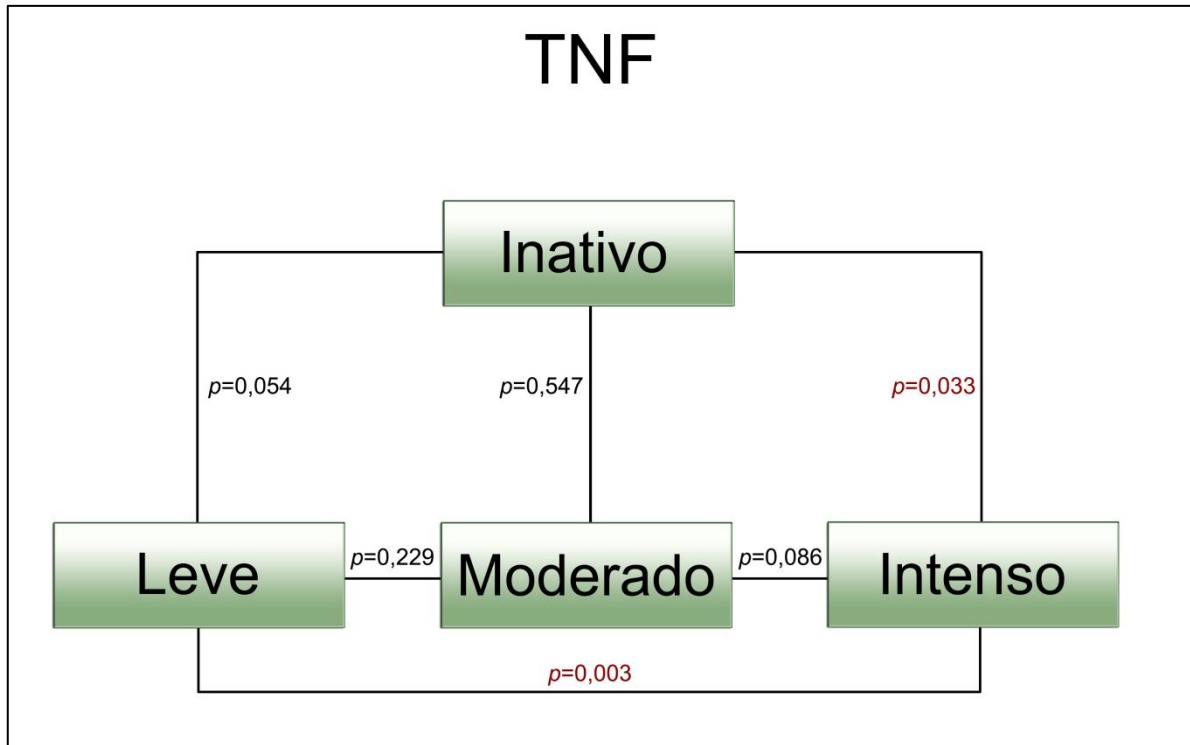
Tabela 12. Expressão relativa de RNAm de TNF em biópsia de mucosa intestinal de pacientes em fase aguda da doença inflamatória intestinal, classificados por grau de inflamação.

TNF	Grau de inflamação			
	$\Delta$ CT Inativa	$\Delta$ CT Leve	$\Delta$ CT Moderada	$\Delta$ CT Intensa
Média	5,11	6,98	5,21	2,71
Desvio padrão	2,23	1,17	2,80	1,14
Mediana	4,93	6,78	5,55	2,89

Fonte: Elaborado pelo autor.

Análise comparativa da expressão relativa de RNAm de TNF, levando em consideração os graus de inflamação mostrou diferença significativa na expressão de TNF no grupo de biópsias classificadas com inflamações inativas ( $p=0,033$ ) e leves ( $p=0,003$ ) em relação ao grupo de inflamações intensas (Figura 8). Há também uma tendência de diferença entre as inflamações inativas e leves ( $p=0,054$ ).

Figura 8. Comparação da expressão de RNAm TNF entre os diferentes graus de inflamação.



Fonte: elaborado pelo autor.

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

A expressão da proteína HLA-G foi avaliada em um total de 79 lâminas, sendo 34 amostras pareadas de 17 pacientes e 45 amostras de diferentes pacientes que possuem apenas um grau de inflamação. Não foi encontrada associação significativa com o nível de RNAm e tão pouco com o grau da lesão, possivelmente devido ao número reduzido de amostras analisadas até o momento. Além disso, o clone anticorpo anti-HLA-G (clone 4H84) utilizado no experimento reconhece as 7 isoformas da molécula HLA-G, desta forma sugere-se o uso de anticorpos específicos para as isoformas ou estudar todas a isoformas que o anticorpo abrange.

#### 4.10 Perfil imunológico dos pacientes com doença inflamatória intestinal

Todos os 98 pacientes em fase aguda da doença, submetidos à biopsia, foram avaliados quanto ao perfil de citocinas séricas.

Pacientes com lesão inativa/leve apresentaram o mesmo perfil de expressão de citocinas em relação aqueles com lesões moderadas/graves independente de serem pacientes diagnosticados com doença de Crohn (n=27) ou RCUI (n=71) (Tabela 13). Por outro lado, comparando a expressão das citocinas Th1/Th2 entre os pacientes com RCUI e Crohn identificou-se uma expressão aumentada em mais de cinco vezes de IL-5 sérico em pacientes com RCUI do que em pacientes com doença de Crohn ( $p=0.018$ ).

Tabela 13. Comparação do perfil de citocinas plasmáticas de pacientes com doença inflamatória intestinal de acordo com o grau de inflamação da lesão tecidual e classificação da doença em Crohn ou RCUI.

Citocinas	RCUIxDC		RCUI x Inflamação		DC x Inflamação	
	Pearson Chi2	Pr	Pearson Chi2	Pr	Pearson Chi2	Pr
IL-2	2.319	0.128	0.0439	0.834	2.9042	0.088
IL-4	0.0933	0.760	0.3731	0.541	0.6217	0.430
IL-5	5.6162	<b>0.018</b>	0.0047	0.945	0.6217	0.430
IL-10	0.0014	0.970	0.3922	0.531	1.0597	0.303
TNF	1.5284	0.216	0.1044	0.747	0.5510	0.458
IFN-g	0.2944	0.587	0.5373	0.464	0.6782	0.410

Fonte: Elaborado pelo autor.

## 5 DISCUSSÃO

A doença de Crohn possui caráter familiar em cerca de 10% dos casos, acometem adultos jovens de ambos os sexos com frequência discretamente aumentada de mulheres (CARDOSO et al, 2014), e em indivíduos de ancestralidade caucasiana (cor da pele Branca). Pacientes portadores de Crohn apresentam menor prevalência do genótipo HLA-G 14pb INS-INS e maior expressão do alelo IL-10 -1082A e genótipo IL-10 -1082A-G, mas nenhuma diferença significativa na frequência de sítios polimórficos na região promotora do gene *TNF* foi encontrada. A maior frequência do alelo IL-10 -1082A da região promotora do gene *IL-10* sugere que esses pacientes sejam baixos produtores de IL-10. No modelo da patogênese da doença de Crohn, baixos níveis de IL-10 representam um aspecto importante na perda do equilíbrio imunológico e direcionamento para resposta tipo Th1 característico da doença (BAUMGART; CARDING, 2007b; MATRICON et al., 2010; SANCHEZ-MUNOZ et al., 2008).

A inserção do fragmento de 14pb na região 3' não traduzida do gene *HLA-G* acarreta a perda de um fragmento de 92pb incluindo os sítios polimórficos +3003 e +3010, fazendo com que o RNAm seja mais estável, apesar da menor expressão de *HLA-G* relacionado ao genótipo 14pb INS-INS (CASTELLI et al., 2010, 2011; CRISTOFARO et al., 2012), fator protetor à doença. HVIID e colaboradores (2006b) mostraram aumento significativo na produção de IL-10 sérica, em indivíduos portadores do genótipo HLA-G 14pb INS-INS após o estímulo de células mononucleares periféricas com lipopolisacarídeo, sugerindo a existência de mecanismo integrado de regulação da resposta imune envolvendo a expressão de IL-10 e *HLA-G*. Considerando estes polimorfismos, nosso estudo serve como complemento uma vez que encontramos uma diminuição do genótipo HLA-G 14pb INS-INS, levando a uma maior produção de *HLA-G*, e aumento do IL-10 -1082A/G, menor produção de IL-10. Porém, contrasta com o estudo de Rizzo e colaboradores (2005), onde encontraram associação entre o aumento de sHLA-G com o aumento de IL-10 em pacientes com Crohn. De acordo com os polimorfismos observados em pacientes com doença de Crohn, é esperado que ocorra menor expressão de IL-10, desta forma, menor efeito inibitório sobre o sistema imune.

Os sítios polimórficos da região promotora do gene *TNF* não mostraram diferença significativa, no entanto uma metanálise de 29 estudos mostrou resultados controversos. O alelo *TNF* -308G foi associado à susceptibilidade a doença, já o genótipo -308G-G e o alelo -857C foi associado à proteção a doença (XIE et al, 2012). Outro estudo mostrou que o sítio -308 não estava associado ao desenvolvimento, mas à gravidade da doença de Crohn (SANTANA et al, 2011).

A diminuição da expressão de RNAm de IL-10 observada no tecido inflamado com lesão leve/moderada é esperada para a formulação da resposta imune, mas o subsequente aumento da expressão de IL-10 na lesão grave não é de todo compreendido. É verdade que a IL-10 tem efeito inibitório sobre o sistema imune, agindo na retroalimentação negativa, visando a homeostasia tecidual (KAYAMA; TAKEDA, 2012); contudo, o nível de IL-10 na lesão grave foi semelhante ao da mucosa sem inflamação. A questão é por quê os níveis de IL-10 voltaram a faixa de normalidade e a lesão não foi resolvida?. Considerando que a associação de polimorfismo em região promotora de IL-10 foi presente apenas na doença de Crohn e não na RCUI, talvez, a análise de expressão de RNAm de IL-10 estratificada pelo tipo de doença do paciente associada ao grau de inflamação possa esclarecer sobre o papel da expressão de IL-10, no controle na resolução da lesão tecidual ou mecanismo de patogênese da doença.

A RCUI também possui um caráter familiar de forma semelhante a doença de Crohn, acometendo em 64% dos casos mulheres jovens (CARDOSO et al, 2014), estando a ancestralidade africana associada a ocorrência da doença. A patogênese da RCUI está associada há uma resposta Th2 (BAUMGART; CARDING, 2007b; MATRICON et al., 2010; SANCHEZ-MUNOZ et al., 2008). Alguns determinantes genéticos foram identificados na região 3' não traduzida do gene *HLA-G* relacionados a ocorrência da RCUI. A RCUI esteve associada à presença do genótipo +3003C-T apenas nos pacientes com ancestralidade africana (LUCENA et al, 2012). A RCUI também esteve associada à baixa frequência dos genótipos +3010C-C e +3142G-G, ambos sabidamente alvos para microRNAs (CASTELLI et al., 2010, 2011; DONADI, 2011). O alelo +3142G está relacionado ao aumento na degradação do RNAm do *HLA-G* via a ação dos microRNAs mi148 e mi152 (MANASTER et al, 2012). Esses dados sugerem que, na RCUI, pode haver uma diminuição na oferta de *HLA-G* devido ao aumento na degradação da molécula por determinação alélica. Nesses

pacientes não foi observado diferenças significativas em sítios polimórficos no gene *IL-10*, contrariando o estudo de Garza-González (2010) que encontrou associação do sítio *IL-10* -1082 com RCUI e DC. Por outro lado, foi observado aumento significativo do alelo -863A na região promotora do TNF. A presença do alelo -863A está relacionada à diminuição na produção do TNF, uma vez que este é um sítio de ligação do fator de transcrição NFκB (VAN HELL et al., 2002), de forma que os pacientes com RCUI podem cursar com uma menor expressão de TNF. Ahirwar e colaboradores (2012) encontrou, na Índia, associação do genótipo -863A-A com ambas as doenças RCUI e DC. Nosso estudo, entretanto, encontrou associação deste sítio polimórfico apenas com RCUI.

A menor expressão de TNF na lesão tecidual pode estar relacionada ao direcionamento para resposta imune Th2 característico da RCUI, confirmado pela presença de alta expressão de IL-5 nos pacientes com RCUI, contudo, não fica claro a influencia dos polimorfismos encontrados na região 3' não traduzida do gene *HLA-G* nos pacientes com RCUI.

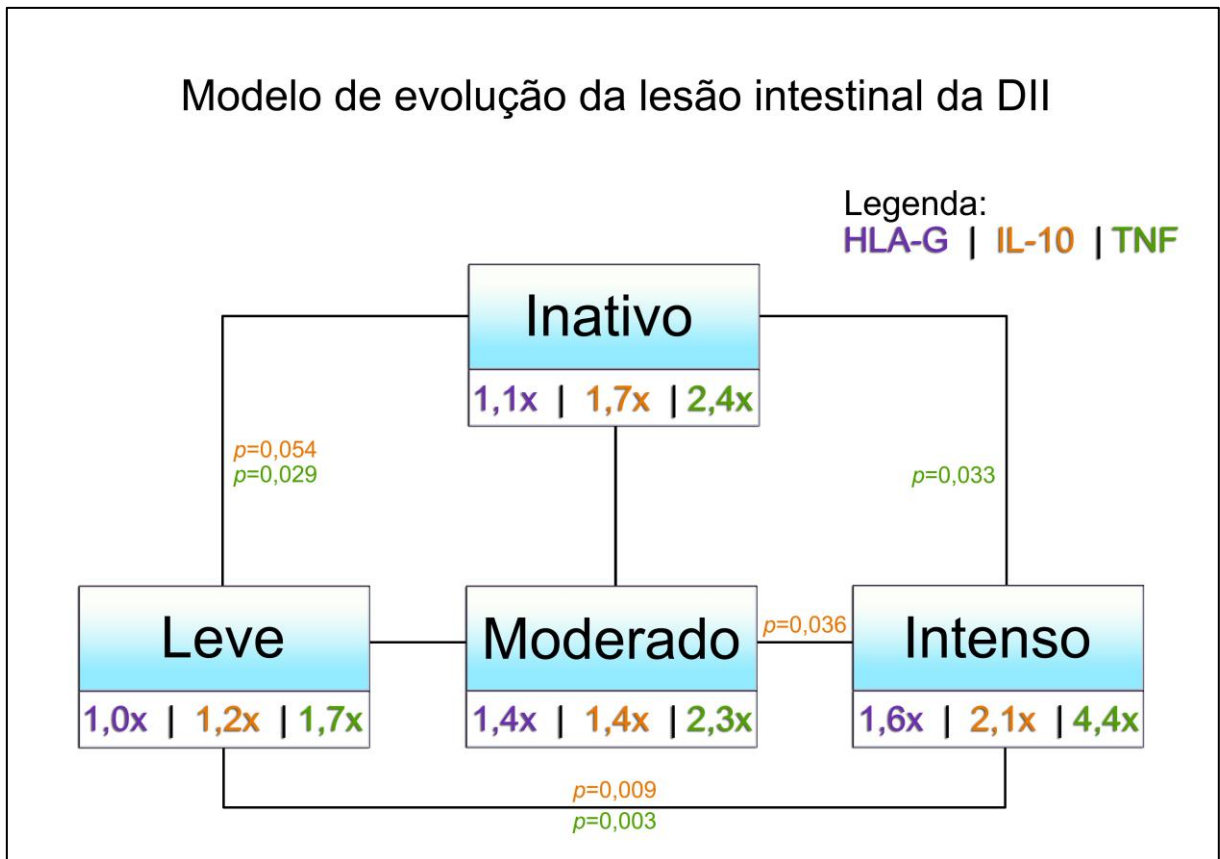
Considerando que encontramos diferenças significativas na frequência em sítios polimórficos de *IL-10* (DC) e TNF (RCUI), e que essas moléculas têm papéis opostos na lesão, favorecendo a permanência da inflamação, e ainda que os níveis dessas moléculas também apresentaram diferença significativa entre os graus de lesão, nós propusemos um modelo de evolução da lesão intestinal na DII (Figura 9).

Para fins comparativos entre os grupos com diferentes lesões, nós utilizamos a média de cada grupo de inflamação para *HLA-G*, *IL-10* e TNF e normalizamos com a média do maior  $\Delta$ CT, ou seja, menor expressão, e todas as outras medianas foram comparadas a esta. A mediana escolhida foi do grau de inflamação leve do *HLA-G* (11,75).

Observamos que os níveis de *HLA-G* estão levemente aumentados na inflamação intensa, porém sem diferença estatística. E ainda na inflamação intensa, o TNF mostrou-se duas vezes mais expresso que o *IL-10*, sugerindo o porquê a inflamação persiste mesmo que o *IL-10* volte aos níveis de expressão do estado tolerogênico (lesão inativa).



Figura 9. Modelo de evolução da lesão intestinal na doença inflamatória intestinal.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Futuros estudos para determinação da expressão de HLA-G em RNA e proteína em mais indivíduos se fazem necessários para o aperfeiçoamento do modelo imunológico e estratificação dos dados por tipo de doença (DC e RCUI) considerando que elas têm perfil de resposta imune diferentes.

## 5 CONCLUSÃO

Em doença de Crohn, o genótipo HLA-G 14pb INS-INS e IL-10 -1082A-G foram associados à susceptibilidade a doença. Já em Retocolite Ulcerativa Idiopática, os genótipos HLA-G +3003T-T, +3010C-C e +3142G-G e TNF -863C-C estão relacionados à proteção a doença. A avaliação destes sítios polimórficos, considerando o grau de lesão tecidual (inativa/leve e moderada/intensa), não se mostrou relevante.

A IL-5 encontrou-se aumentada no plasma de pacientes portadores de RCUI, mas não foi relacionada ao grau de lesão tecidual.

A expressão de RNAm de HLA-G5 em lesões de mucosa mostrou-se inconclusiva devido ao baixo número de amostras e limitação da técnica.

A citocina IL-10 mostrou uma expressão aumentada durante a fase de ausência de inflamação e no fim do processo inflamatório, porém no início da resposta imune os níveis de IL-10 caem dando espaço as citocinas pró-inflamatórias. Nos níveis de TNF tecidual identificamos um equilíbrio na sua expressão durante as fases inativa, leve e moderada da inflamação, e aumentando durante a fase de inflamação intensa.

No entanto, como a RCUI e DC têm perfil de resposta imune diferentes, faz-se necessário estratificar os pacientes de acordo com as doenças e achados clínicos, além do grau de lesão tecidual. Assim, poderemos entender melhor a ação do HLA-G e sua relação com as citocinas IL-10 e TNF na resposta imunológica na mucosa intestinal de pacientes com doença inflamatória intestinal.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7 ed. São Paulo: Elsevier, 2012.
- AHAMAD, T.; MARSHALL, S. E.; JEWELL, D. Genetics of Inflammatory bowel disease: the role of the HLA complex. *World J. Gastroenterol.*, Beijing, v. 12, p. 3628-3635, 2006.
- AHIRWAR, D. K. et al. Role of tumor necrosis factor-alpha (C-863A) polymorphism in pathogenesis of inflammatory bowel disease in Northern India. *J. Gastrointest. Cancer*, New York, v. 43, p. 196-204, 2012.
- BAUMGART, D. C.; CARDING, S. R. Inflammatory bowel disease: clinical aspects and established and evolving therapies. *Lancet*, London, v. 369, p. 1641-1657, may. 2007a.
- BAUMGART, D. C.; CARDING, S. R. Inflammatory bowel disease: cause and immunology. *Lancet*, London, v. 369, p. 1627-1640, may. 2007b.
- BAUMGART, D. C.; SANDBORN, W. J. Crohn's disease. *Lancet*, London, v. 380, p. 1590-1605, nov. 2012.
- BIDWELL, J. et al. Cytokine gene polymorphism in human disease on-line databases: Supplement 1. *Genes Immun.*, Houndmills, v. 2, p. 61-70, 2001.
- BRITO, C.; FILGUEIRA, L.; LIBERATO, I. Doença inflamatória intestinal. In: FILGUEIRA, N. A. et al. *Condutas em clínica médica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2007. p. 294-308.
- BRITO, C.; MARTINELLI, V. F.; LUCENA-SILVA, N. Como tratar: fase aguda da retocolite ulcerativa. In: *Terapêutica em Gastroenterologia*. Galvão-Alves, J. et al. São Paulo: Guanabara-Koogan, 2012. p. 87-108.
- CAPRILLI, R. et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: special situations. *Gut*, London, v. 55, p. 36-58, 2006.
- CARDOSO, I. P. et al. Tuberculin skin testing in inflammatory bowel disease patients from an endemic area of Brazil. *Braz. Infect. Dis.*, Salvador, v. 18, p. 60-64, 2014.
- CAROSELLA, E. D. et al. HLA-G: from biology to clinical benefits. *Trends in Immunology*, Oxford, v. 29, p. 125-132, 2008.
- CASTELLI, E. C. et al. The genetic structure of 3'untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun.*, Houndmills, v. 11, p. 134-141, 2010.
- CASTELLI, E. C. et al. A Comprehensive Study of Polymorphic Sites along the HLA-G Gene: Implication for Gene Regulation and Evolution. *Mol. Biol. Evol*, Chicago, v. 11, p. 3069-3086, 2011.
- CIRULLI, V. et al. The Class I HLA repertoire of pancreatic islets comprises the nonclassical Ib antigen HLA-G. *Diabetes*, New York, v. 55, p. 1214-1222, may. 2006.
- CRAWLEY, E. et al. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular

phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheum.*, Atlanta, v. 42, p. 1101-1108, 1999.

DE WALL MALEFYT, R. et al. Interleukin-10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via down regulation of class II major histocompatibility complexes expression. *J. Exp. Med.*, New York, v. 174, p. 915-924, oct. 1991.

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. *Hum. immunol.*, New York, v. 74, p. 203-206, 2013,

DONADI, E. A. et al. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell. mol. life sci.*, Basel, v. 68, p. 369-395, 2011.

GARZA-GONZÁLEZ, E. et al. Genetic risk factors for inflammatory bowel disease in a North-eastern Mexican population. *Int. J. Immunogenet.*, Oxford, v. 37, p. 355-359, 2010.

GLASS, J. et al. The 14-bp deletion polymorphism in the HLA-G gene displays significant differences between ulcerative colitis and Crohn's disease and associated with ileocecal resection in Crohn's disease. *Int. immunol.*, Oxford, v. 19, p. 621-626, 2007.

GLOCKER, E. O. et al. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Ann. N. Y. Acad. sci.*, New York, v. 1246, p. 102-107, 2011.

GLOCKER, E. O.; GRIMBACHER, B. Inflammatory bowel disease: is it a primary immunodeficiency?, *Cell. mol. life sci.*, Basel, v. 69, p. 41-48, 2012.

HVIID, T. V. F. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum. reprod. updat.*, Oxford, v. 12, p. 209-232, 2006a.

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. *Hum. immunol.*, New York, v.67, p. 53-62, 2006b.

ISKANDAR, H. N.; CIORBA, M. A. Biomarkers in Inflammatory Bowel Disease: Current Practices and Recent Advances. *Transl Res.*, New York, v. 159, p. 313-325, apr. 2012.

KELSALL, B. L. Innate and adaptive mechanisms to control of pathological intestinal inflammation. *J. Pathol.*, Edinburgh, v. 214, p. 242-259, 2008.

KAYAMA, H.; TAKEDA, K. Regulation of intestinal homeostasis by innate and adaptive immunity. *Int. Immunol.*, Oxford, v. 24, p. 673-680, 2012.

KUNA, A. T. Serological markers of inflammatory bowel disease. *Biochem. Med. (Zagreb)*, Zagreb, v. 23, p. 28-42, feb. 2013.

LIU, Z. J. et al. Potential role of Th17 cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World j. gastroenterol.*, Beijing, v. 46, p. 5784-5788, 2009.

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, v. 79, p. 272-278, 2012.

- LUCENA-SILVA, N. et al. HLA-G 3' Untranslated Region Polymorphisms Are Associated with Systemic Lupus Erythematosus in 2 Brazilian Populations. *J. Rheumatol.*, Toronto, v. 40, p. 1104-1113, 2013.
- MANASTER, I. et al. MiRNA-Mediated Control of HLA-G Expression and Function. *PLoS ONE*, San Francisco, v. 7, p. e33395, 2012.
- MARTINEZ-LASO, J. et al. Promoter sequences confirm the three different evolutionary lineages described for HLA-G. *Hum. immunol.*, New York, v. 74, p. 383-388, 2013.
- MATRICON, J.; BARNICH, N.; ARDID, D. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Self Nonself*, Austin, v. 1, p. 299-309, 2010.
- MCGOVERN, D. P. B.; JEWELL, D. P. Risks and benefits of azathioprine therapy. *Gut*, London, v. 54, p. 1055, 2005.
- MOLODECKY, N. A. et al. Increasing Incidence and Prevalence of the Inflammatory Bowel Diseases With Time, Based on Systematic Review. *Gastroenterology*, Philadelphia, n. 142, p.46-54, jan. 2012.
- MURPHY K. Janeway's Immunobiology , 8. ed. New York, Garland Science, 2012.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *Interleukine-10 RefSeqGene*. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_012088.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_012088.1)>. Acesso em: 10 fev. 2014a.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *Tumor Necrosis Factor RefSeqGene*. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_007462.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_007462.1)>. Acesso em: 10 fev. 2014b.
- ORDÁS, I. et al. Ulcerative colitis. *Lancet*, London, v. 380, p. 1606-1619, nov. 2012.
- PALADINO, N. et al. Gender Susceptibility to Chronic Hepatitis C Virus Infection Associated with Interleukin 10 Promoter Polymorphism. *J. virol.*, Washington, v. 80, p. 9144-9150, 2006.
- 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. *Front. Immunol.*, Lausanne, v. 4, n. 280, eCollection 2013, sep. 2013.
- PERRY, C. et al. ARMS\_PCR methodologies to determinate IL-10, TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  e TGF- $\beta$ 1 gene polymorphisms. *Transpl. Immunol.*, Dunto Grenn, v. 7, p. 127-128, 1999.
- PIRRI, A. et al. A study of HLA-G polymorphism and linkage disequilibrium in renal transplant patients and their donors. *Transpl. Immunol.*, Dunto Green, v. 20, p. 143-149, 2009.
- PLEVY, S. et al. Combined Serological, Genetic, and Inflammatory Markers Differentiate Non-IBD, Crohn's Disease, and Ulcerative Colitis Patients. *Inflamm. Bowel Dis.*, New York, v. 19, p. 1139-1148, may. 2013.
- 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?. *Inflamm. bowel dis.*, Hoboken, v. 14, p. 100-105, 2008.
- ROGLER, G. Update in Inflammatory bowel disease pathogenesis. *Curr. opin. gastroenterol.*, Philadelphia, v. 20, p. 311-317, 2004.

- ROUSSEAU, P. et al. The 14 pb deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum. Immunol.*, New York, v. 94, p. 11520-11525, 2003.
- RUTGEERTS, P. et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 353, p. 2462-2476, 2005.
- RUTTER, M. D. et al. Thirty-year Analysis of a Colonoscopic Surveillance Program for Neoplasia in Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, Baltimore, v.130, p. 1030-1038, 2006.
- SANCHEZ-MUNOZ, F.; DOMINGUEZ-LOPEZ, A.; YAMAMOTO-FURUSHO, J. K. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World j. gastroenterol.*, Beijing, v. 14, p. 4280-4288, 2008.
- SANTANA, G. O. et al. Crohn's disease in one mixed-race population in Brasil. *World j. gastroenterol.*, Beijing, v. 13, p. 4489-4492, 2007.
- SANTANA, G. et al. The TNF- $\alpha$  -308 polymorphism may affect the severity of Crohn's disease. *Clinics*, São Paulo, v. 66, p. 1373-1377, 2011.
- SKOOG, T. et al. A common functional polymorphism (C-A substitution at position -863) in promoter region of the tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) gene associated with reduced circulating levels of TNF- $\alpha$ . *Hum. Mol. Genet.*, Oxford, v. 8, p. 1443-1449, 1999.
- 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, p.1-15, 2006.
- TARGAN, S. R. et al. A short term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor  $\alpha$  for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.*, Boston, v. 337, p. 1029-1035, 1997.
- 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. *Int. Immunol.*, Oxford, v. 16, p. 579-583, 2004.
- TRAVIS, S. P. L. et al. European evidence based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: current management. *Gut*, London, v. 55, p. 16-35, 2006.
- TSIANOS, E. V.; KATSANOS, K. Do we really understand what the immunological disturbances in inflammatory bowel disease mean?. *World j. gastroenterol.*, Beijing, v. 15, p. 521-525, 2009.
- 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 factor. *Hum. Mol. Genet.*, Oxford, v. 11, p. 1281-1289, 2002.
- VAN DEN VEYVER, I. B. et al. Detection of intrauterine viral infection using the polymerase chain reaction. *Mol. Genet. Metab.*, Orlando, v.63, p. 85-95, feb. 1998.
- VICTORIA, C. R.; SASSAKI, L.Y.; NUNES, H.R.C. Incidence and prevalence rates of inflammatory bowel diseases, in midwestern of São Paulo state, Brazil. *Arq. Gastroenterol.*, São Paulo, v. 46, p. 20-25, 2009.

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. *Mol. Biol. Rep.*, Dordrecht, v. 39, p. 1575-1583, 2012.

ZALTMAN, C. Inflammatory bowel disease: how relevant for Brazil?. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro; v. 23, p. 992-993, 2007.

ZHANG, S. Z.; ZHAO, X. H.; ZHANG, D. C. Cellular and molecular immunopathogenesis of Ulcerative Colitis. *Cell. Mol. Immunol.*, Beijing, v. 3, p. 35-40, 2006.

## APÊNDICE A - Questionário clínico do paciente

<b>FICHA CLÍNICA: Associação de Polimorfismo Genético com a Susceptibilidade a Doença Inflamatória Intestinal</b> <b>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ</b>							
<b>1. Identificação do entrevistado:</b>							
( ) <sup>1.1</sup> Grupo Doença de Chron		( ) <sup>1.2</sup> Grupo Retrocolite ulcerativa		<sup>1.3</sup> ( ) Grupo sem definição			
2. Data (entrevista):		___ / ___ / ___		3. No Ficha:			
4. Prontuário:		5. Unidade Saúde:		5.:			
6. Qual o seu nome completo:							
7. Quantos anos o(a) senhor(a) tem.			8. Sexo.		1. Masc. 2. Fem.	8.:	
9. Nome da mãe:							
9. Endereço atual (rua, av.):							
10. Nº	11. Complemento:		12. Bairro:				
13. Cidade:		13.:		14. Estado:		14.:	
15. Referência:							
16. Telefone convencional para contato:			17. Celular:				
9. Qual a data no seu nascimento.			___ / ___ / ___		10. Qual a cidade o Sr(a) nasceu.		
10. Qual a estado o Sr(a) nasceu.			11. Qual a situação familiar melhor lhe define :			11.:	
			1. solteiro 2. casado 3. divorciado 4. viúvo				
12.1 Tipo de pele (Classificação de Fitzpatrick):						12.1.:	
1. Sempre queima, nunca bronzeia 2. Geralmente queima, às vezes bronzeia 3. Algumas vezes queima, sempre bronzeia 4. Nunca queima, sempre bronzeia 5. Moderada pigmentação constitucional 6. Marcada pigmentação constitucional							
12.2 Qual a cor da sua pele que melhor lhe define		1. Branca	2. Morena	3. Negra	4. Índio	5. Outro	12.2.:
12.3 Cor da pele observada		1. Branca	2. Morena	3. Negra	4. Índio	5. Outro	12.3.:
13.1 O Sr(a) fuma?	1. Sim, vá para 13.3	13.1	13.2 Já fumou?	1. Sim	13.2	13.3 Quanto tempo (anos)?	13.3
	2. Não			2. Não, vá para 14			
14. O(A) senhor(a) sabe ler e escrever.			1. Sim		2. Não		14.:
15. Qual o curso mais elevado que o(a) senhor(a) concluiu.						15.:	
1. alfabetização			5. Universidade concluída				
2. Primário menor (até 4º série concluída)			6. Pós-graduação concluída				
3. Primário maior (8º série concluída)			9. Não sabe informar				
4. Secundário (Científico) concluído							
16. Qual a categoria profissional que melhor lhe define.						16.:	
1. Desempregado sem renda nenhuma 2. Desempregado com atividade de renda variável - bico 3. Empregado com atividade de renda fixa – salário mensal 4. Aposentado 9. Não sabe informar							

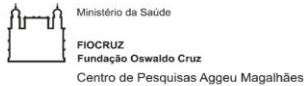


17 A renda da sua família é aproximadamente:		17.
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Menos que um salário mínimo</li> <li>2. De 1 à 2 salários (inclusive)</li> <li>3. De 2 à 4 salários (inclusive)</li> <li>4. De 4 à 6 salários (inclusive)</li> <li>5. Mais que 6 salários</li> <li>9. Não sabe informar</li> </ol>		
18 A sua residência tem água encanada.	1. Sim      2. Não      9. Não sabe informar	18.
19 O Sr(a) bebe que tipo de água?	1. mineral   2. Filtrada   3. Da torneira   4. De cacimba   5.outro	19.
20.1 O(A) senhor(a) tem algum parente com a mesma doença do senhor(a).		20.1.
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Sim      2. Não      9. Não sabe informar</li> </ol>		
..... <sup>20.2</sup> Se sim, qual o parentesco (listar todos, ver gráfico ao final):		20.2.
_____		
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Relacionado      2. Não-Relacionado      9. Não sabe informar</li> </ol>		
<b>Investigação clínica.</b>		
21. Quando iniciou sua doença (mês/ ano)?	____ / ____	22. Quantos anos o senhor tinha?
23. Quanto tempo (meses) levou para a sua doença ser diagnosticada (entre as primeiras queixas e o diagnóstico)?		
24. O Sr(a) já foi submetido a alguma cirurgia?	1. Sim      2. Não      9. Não sabe	24.
25. Qual? 25.1 _____ em que ano? _____		25.
25.2 _____		
25.3 _____		
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. pelo menos uma cirurgia do trato gastrointestinal</li> <li>2. cirurgias fora do trato gastrointestinal</li> <li>9. Não se aplica</li> </ol>		
26.1 O Sr(a) tem ou teve alguma outra doença diagnosticadas das listadas abaixo?		26.1.
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Doenças auto-imunes (lupus, vitiligo)</li> <li>2. Diabetes</li> <li>3. Asma</li> <li>4. Artrite reumatóide</li> <li>5. Hipertensão</li> <li>6. Pré-eclampsia (pressão alta na gestação)</li> <li>7. Alergia, se sim vá para 26.2</li> <li>8. Outra. Especifique _____</li> <li>9. Não se aplica</li> </ol>		
26.2 Se sim, poderia dizer qual a causa da sua alergia.		26.2.
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Poeira</li> <li>2. Comida, qual _____</li> <li>3. Medicação, qual _____</li> <li>4. Não sabe informar</li> <li>9. Não se aplica</li> </ol>		
27.1 O (A) senhor (a) tomou alguma medicação nos últimos 10 dias	1. Sim      2. Não      9. Não sabe	27.1.

27.2 Se sim, qual a medicação que o(a) senhor(a) tomou.				27.2.	
1. Corticóides orais _____ 2. Imunosupressores _____ 3. Hipoglicemiante oral ou insulina _____ 4. Anti-inflamatório não-hormonal _____ 5. Anti-depressivo (remédio controlado) _____ 6. Mesalasina 7. Azatioprina 8. Sulfasalazina 9. Outro _____ 10. Não se aplica					
<b>CARACTERISTICAS DA DOENÇA AO DIAGNOSTICO</b>					
<b>28. Localização da doença</b>					
28.1. Doença de Chron	28.1.	28.2. RCUI	28.2.	28.3. Colite indeterminada	28.3.
1. esofágica 2. gástrica 3. duodenal 4. jejunal 5. ileal 6. ileo-cecal 7. colons 8. perianal 9. Não informado		1. distal 2. colite esquerda 3. pancolite 4. ileite retrograda 9. Não informado		1. distal 2. colite esquerda 3. pancolite 9. Não informado	
<b>29. Manifestações extra-intestinais</b>			1. Sim	2. Não	29.
29.1. Osteoarticular	29.1.	29.2. Oftálmica	29.2.	29.3. Dermatológica	29.3.
1. artrite 2. artralgia 3. espondilite anquilosante 4. sacroiliite 9. Não informado 10. Não apresenta		1. uveíte 2. conjuntivite 3. episclerite 9. Não informado 10. Não apresenta		1. pioderma gangrenoso 2. eritema nodoso 3. piodermite 4. aftas 9. Não informado 10. Não apresenta	
29.4. Vasculares	29.4.	29.5. Hepatobiliares	29.5.	29.6. Nefrológicas	29.6.
1. Fenômenos trombóticos, onde _____ 2. outros _____ 9. Não informado 10. Não apresenta		1. Qual _____  9. Não informado 10. Não apresenta		1. Qual _____  9. Não informado 10. Não apresenta	

<b>30. Intensidade ou forma da apresentação clínica inicial (ao diagnóstico)</b>			
<b>30.1.</b> Doença de Chron	<b>30.1</b>	<b>30.2</b> RCUI	<b>30.2</b>
1. inflamatória 2. estenosante 3. penetrante – fistula perianal 4. penetrante fistula reto-vaginal 5. penetrante fistula entero-cutanea 6. penetrante fistula entero-entérica 7. penetrante fistula entero-vesical 8. penetrante fistula entero-escrotal		1. leve 2. moderada 3. grave 4. fulminante	
<b>31. Grau da atividade da doença</b>			
<b>31.1.</b> Doença de Chron – CDAI =	<b>31.1</b>	<b>31.2</b> RCUI – escore de atividade =	<b>31.2</b>
<b>EXAMES LABORATORIAIS AO DIAGNOSTICO</b>			
<b>32. Histopatológico</b>			
<b>32.1</b> data do laudo do exame _____			
<b>32.2</b> identificação do paciente na histopatologia _____			
<b>32.3</b> serviço do histopatológico _____			
<b>32.4</b> Achados histopatológicos			<b>61.4.</b>
1. Displasia 2. Mucosa plana com baixo grau 3. Mucosa plana com alto grau 4. Outro, qual? _____ 9. Não informado			

## APÊNDICE B – Termo de consentimento livre e esclarecido



### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Título da pesquisa:** Polimorfismo Genético em Associação com a Susceptibilidade a Doença Inflamatória Intestinal

Pesquisadores responsáveis: **Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva**, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz / Ministério da Saúde. Endereço: Av. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, Cidade Universitária, Recife, PE, 50670-420. Tel: 21012618, 99623975; **Carlos Alexandre Antunes de Brito**, Hospital das Clínicas / UFPE.

Eu, \_\_\_\_\_ aceito participar de forma voluntária desta pesquisa na qual procurarei contribuir respondendo a perguntas sobre a minha doença através de um questionário e doação de amostra de sangue equivalente a uma colher de sopa ou 10 ml que será utilizada nesse estudo e armazenadas para futuros estudos. Esse estudo tem por objetivo determinar fatores genéticos de risco para o desenvolvimento da doença ou que sejam indicadores de casos graves, sei que os testes realizados nesse estudo poderão não me beneficiar, e que eu não terei nenhuma despesa com os testes realizados. Os resultados desse estudo serão divulgados com a garantia de sigilo sobre a minha identidade. Autorizo também que o material de biópsia do intestino retirado durante o diagnóstico da minha doença possa ser utilizado no estudo.

Os riscos a que estarei exposto são aqueles relacionados com a coleta de sangue, ou seja, dor, infecção, sangramento e manchas arroxeadas no local da coleta, que serão minimizados com cuidados de higiene na coleta e a pressão local após a coleta do sangue. O acompanhamento da minha doença não será alterado, caso eu desista de participar deste estudo.

Este projeto foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Aggeu Magalhães e qualquer dúvida contactarei a pesquisadora responsável.

Sendo assim, concordo em participar como voluntário não remunerado dessa pesquisa, estando ciente dos riscos e benefícios desses procedimentos para minha pessoa, conforme exposto acima. Sei que tenho a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo sem que isso traga prejuízo para mim. Visto que nada tenho contra a pesquisa, concordo em assinar o presente termo de consentimento em duas vias (uma ficará comigo).

Endereço do participante para contato futuro.

Rua \_\_\_\_\_ No. \_\_\_\_\_

Bairro \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_

Telefone \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Voluntário**

\_\_\_\_\_  
**Assinatura**

\_\_\_\_\_  
**1º testemunha**

\_\_\_\_\_  
**Assinatura**

Recife, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Pesquisador responsável**

## APÊNDICE C – Questionário clínico ao doador de sangue

<b>FICHA CLÍNICA: Associação de Polimorfismo Genético com a Susceptibilidade a Doença Inflamatória Intestinal</b> <b>Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ</b>									
<b>1ª Identificação do entrevistado:</b>									
( ) <sup>1.1</sup> Grupo Doença de Chron			( ) <sup>1.2</sup> Grupo Retrocolite ulcerativa			<sup>1.3</sup> ( ) Grupo sem definição			
2. Data (entrevista):			3. No Ficha:						
4. Prontuário:			5. Unidade Saúde:			5.:			
6. Qual o seu nome completo:									
7. Quantos anos o(a) senhor(a) tem.			8. Sexo.			1. Masc. 2. Fem.		8.:	
9. Nome da mãe:									
9. Endereço atual (rua, av.):									
10. Nº		11. Complemento:		12. Bairro:					
13. Cidade:		13.:		14. Estado:		14.:			
15. Referência:									
16. Telefone convencional para contato:			17. Celular:						
9. Qual a data no seu nascimento.			10. Qual a cidade o Sr(a) nasceu.						
10. Qual a estado o Sr(a) nasceu.			11. Qual a situação familiar melhor lhe define :				11.:		
			1. solteiro 2. casado 3. separado/divorciado 4. viúvo						
12.1. Tipo de pele (Classificação de Fitzpatrick):									
1. Sempre queima, nunca bronzeia 2. Geralmente queima, às vezes bronzeia 3. Algumas vezes queima, sempre bronzeia 4. Nunca queima, sempre bronzeia 5. Moderada pigmentação constitucional 6. Marcada pigmentação constitucional									
12.2. Qual a cor da sua pele que melhor lhe define			1. Branca	2. Morena	3. Negra	4. Índio	5. Outro	12.2.:	
12.3. Cor da pele observada			1. Branca	2. Morena	3. Negra	4. Índio	5. Outro	12.3.:	
13.1. O Sr(a) fuma?	1. Sim, vá para 13.3		13.1	13.2. Já fumou?	1. Sim		13.2	13.3. Quanto tempo (anos)?	—
	2. Não				2. Não, vá para 14				
14. O(A) senhor(a) sabe ler e escrever.			1. Sim		2. Não			14.:	
15. Qual o curso mais elevado que o(a) senhor(a) concluiu.									
1. alfabetização					5. Universidade concluída				
2. Primário menor (até 4º série concluída)					6. Pós-graduação concluída				
3. Primário maior (8º série concluída)					9. Não sabe informar				
4. Secundário (Científico) concluído									
16. Qual a categoria profissional que melhor lhe define.									
1. Desempregado sem renda nenhuma									
2. Desempregado com atividade de renda variável - bico									
3. Empregado com atividade de renda fixa – salário mensal									
4. Aposentado									
9. Não sabe informar									
17. A renda da sua família é aproximadamente:									
1. Menos que um salário mínimo									
2. De 1 à 2 salários (inclusive)									
3. De 2 à 4 salários (inclusive)									
4. De 4 à 6 salários (inclusive)									
5. Mais que 6 salários									
9. Não sabe informar									
18. A sua residência tem água encanada.			1. Sim		2. Não		9. Não sabe informar		
19. O Sr(a) bebe que tipo de água?			1. mineral	2. Filtrada	3. Da torneira	4. De cacimba	5. outro		
<b>Investigação clínica.</b>									
26.1. O Sr(a) tem ou teve alguma outra doença diagnosticadas das listadas abaixo?			26.1.:		22. Quantos anos o senhor tinha?				
1. Doenças auto-imunes (lupus, vitiligo) 2. Diabetes 3. Asma 4. Artrite reumatóide 5. Hipertensão 6. Pré-eclampsia (pressão alta na gestação) 7. Alergia, se sim vá para 26.2 8. Outra. Especifique _____ 9. Não se aplica									
26.2. Se sim, poderia dizer qual a causa da sua alergia.			26.2.:				24.:		
1. Poeira 2. Comida, qual _____ 3. Medicação, qual _____ 4. Não sabe informar 9. Não se aplica									

## APÊNDICE D – Artigo publicado

## 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

N. Lucena-Silva<sup>1,2</sup>, A. R. Monteiro<sup>1,2</sup>, R. S. de Albuquerque<sup>1,3,4</sup>, R. G. Gomes<sup>1</sup>, C. T. Mendes-Junior<sup>5</sup>, E. C. Castelli<sup>6</sup> & E. A. Donadi<sup>3</sup>

1 Immunogenetics Laboratory, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, Pernambuco, Brazil

2 Molecular Biology Laboratory, Pediatric Oncology Department, IMIP Hospital, Recife, Pernambuco, Brazil

3 Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

4 Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

5 Departamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

6 Molecular Genetics and Cytogenetics Laboratory, Department of General Biology, Biological Science Institute, Federal University of Goiás - UFG, Goiânia, Goiás, Brazil

### Key words

Brazilian population; human leucocyte antigen-G; polymorphism; 3' untranslated region

### Correspondence

Norma Lucena-Silva, MD, PhD  
Department of Immunology  
Aggeu Magalhães Research Center,  
Oswaldo Cruz Foundation  
Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária,  
Recife CEP: 50720-640, Pernambuco, Brazil  
Tel: +55 (81) 21012618  
fax: +55 (81) 34531911  
e-mail: norma.lucena@hotmail.com

Received 12 September 2011; revised 23  
November 2011; accepted 10 January 2012

doi: 10.1111/j.1399-0039.2012.01842.x

### Abstract

The Brazilian population represents an admixture of native Amerindians, Portuguese settlers and Africans who were brought as slaves during the colonization period that began in the 16th century and was followed by waves of immigrations of Europeans and Asians in the 20th century. The contribution of these different ethnic groups to the constitution of Brazilian populations from different geographic regions is variable and, in addition to environmental factors, might act by determining different allele profiles among Brazilian populations from different regions. We studied polymorphic sites at the 3' untranslated region of the *HLA-G* gene in individuals from a Northeastern Brazilian region and compared them to our previously published data about a Southeastern Brazilian region, located at a distance of 2589 km. Our results showed that most polymorphic sites present a similar distribution in both populations, except for the lower frequency of the +3003C allele in the Northeastern population compared to the Southeastern population. Although differences in genotypic distribution were only significant for the +3003 locus ( $P = 0.0201$ ), the diversity of haplotypes was distinct for each population. These results are important for case-control studies on the association of human leucocyte antigen-G polymorphism with disease and also in terms of the genetic structure of two distinct Brazilian populations.

### Introduction

Human leucocyte antigen-G (HLA-G) is a major histocompatibility non-classical class I molecule, whose impaired expression was first associated with miscarriage and eclampsia (1). Its immunomodulatory and tolerogenic properties are exerted by inhibition of the lytic activity of natural killer (NK) cells and cytotoxic T-lymphocytes, induction of CD8+ T-cell apoptosis, inhibition of CD4+ T-cell proliferation and induction of regulatory T-cells (2–7).

Because genetic polymorphisms observed at the *HLA-G* 3' untranslated region (UTR) have been associated with post-transcriptional control of HLA-G expression, this gene segment has been studied in autoimmune, chronic inflammatory and chronic infectious diseases, in allografting and in several types of cancer (8–12). One of these polymorphisms

is the presence (insertion, INS) or absence (deletion, DEL) of a 14-bp fragment, in which the DEL/DEL genotype has been associated with high expression of *HLA-G* mRNA (13, 14). Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have also been detected at the 3'UTR apparently influencing mRNA stability and affinity for several microRNAs, including the +3142G/C and +3187A/G polymorphic sites that have been associated with mRNA degradation and mRNA stability, respectively (15–17).

Although the allelic frequencies for 14-bp INS or 14-bp DEL are reported to have similar distribution in Caucasians, Japanese and Americans, the 14-bp INS predominates among Africans from Guinea-Bissau and the 14-bp DEL is more frequent in South American Amerindians, suggesting ethnic differences (7, 18, 19).

The Brazilian population is characterized by an admixture of native Amerindians, Portuguese settlers and Africans who were brought as slaves during the colonization period that began in the 16th century. The contribution of these different ethnic groups to the gene pool of Brazilian populations from different geographic regions is variable. Moreover, in the 20th century, the World Wars led to waves of immigration to Brazil, mainly involving Portuguese, Italian, German and Japanese people, who preferentially settled in the Southeastern region (20). Therefore, it is possible that the genetic background of Northeastern and Southeastern Brazilian populations may present differences in terms of *HLA-G* variability. Taking advantage of a previous study reported by our group, regarding the evaluation of the structure of the *HLA-G* 3' UTR in a Southern Brazilian population (17), in this study, we investigated the *HLA-G* 3'UTR variability in healthy individuals from a Northeastern Brazilian population and compared it to the results obtained for a Southeastern population.

## Methods

### Subjects

*HLA-G* 3'UTR variability was assessed in 272 unrelated healthy individuals from two Brazilian populations, with 128 samples being selected from blood donors recruited by the Northeast Institute of Hematology in Recife (Capital of the Northern State of Pernambuco) and 155 samples being obtained from bone marrow donors recruited at the University of São Paulo in Ribeirão Preto (a city in the Southeastern part of Brazil), previously typed for the *HLA-G* 3'UTR (17).

### Assessment of *HLA-G* 3'UTR variability

Genomic DNA was obtained from peripheral blood mononuclear cells using the DNAzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions or using a salting-out procedure.

*HLA-G* 3'UTR variability was assessed by nucleotide sequence variations from the +2945 to the +3259 nucleotide, using a methodology described elsewhere (17). Briefly, amplification was performed in a final volume of 25  $\mu$ l containing 1 $\times$  polymerase chain reaction (PCR) buffer (20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0.3 mM of each dNTP, 25 pmol of each primer (HG08F and HG08R), 1.0 unit of Taq DNA polymerase (BioTools, Madrid, Spain) and 50 ng of DNA. The initial denaturation step was carried out at 94°C for 3 min, followed by 40 cycles at 94°C for 30 s, 60°C for 60 s, 72°C for 30 s and by a final extension step at 72°C for 7 min. The amplification product was evaluated by polyacrylamide or agarose gel electrophoresis. PCR products containing the amplified fragment of approximately 350 bp were directly sequenced using the reverse primer used in the amplification and the Big Dye Terminator kit in an ABI3100

Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Foster City, CA). Homozygote samples for the 14-bp polymorphism were also sequenced using the forward primer. All polymorphic sites found at 3'UTR were individually annotated.

### Statistical analysis

The allelic and genotypic frequencies were estimated with the aid of the GENEPOP software version 4.0.10 (21), using the exact test with Levene's correction to calculate the number of expected homozygotes or heterozygotes. The exact test of population differentiation based on allelic and genotypic frequencies between Northeastern and Southeastern Brazilian populations was also carried out using the GENEPOP programme. Adherences of genotypic proportions to expectations under Hardy-Weinberg equilibrium were tested by the exact test of Guo and Thompson (22) using GENEPOP 4.0.10 (21). Linkage disequilibrium (LD) between alleles from each pair of loci was evaluated for each group as well as for the entire population using the ARLEQUIN programme version 3.5.1.2 (23, 24).

Given the positive LD between the SNPs, but unknown gametic phase, the most likely haplotypes for each sample were determined by two independent computational methods, without taking into account any prior information: (i) the expectation-maximization (EM) algorithm (25) implemented with the PL-EM software (26) and (ii) a coalescence-based method implemented with the PHASE v2 software (27). Concordant haplotypes according to both methods were submitted to the exact test of population differentiation based on haplotype frequencies between Northeastern and Southeastern Brazilian populations using the ARLEQUIN programme.

Two independent tools were used to evaluate the extent of differentiation between Pernambuco and São Paulo:  $F_{ST}$  (28) and the exact test of population differentiation (29), based on either genotype or haplotype frequencies. Although these analysis have the same purpose and may possibly result in a similar outcome, both of them were performed in order to reach more reliable and robust conclusions, given that one of the methods may be more or less sensitive (or conservative) than the other. Both analyses were performed with the ARLEQUIN software.

### Results

In this study, all previously described polymorphic sites for the *HLA-G* 3'UTR, namely, the 14-bp INS/DEL (rs1704), +3003C/T (rs1707), +3010C/G (rs1710), +3027A/C (rs1717 9101), +3035C/T (rs17179108), +3142C/G (rs1063320), +3187A/G (rs9380142) and +3196C/G (rs1610696), were observed. Each of the uncommon +3001 C-T or +3033 C-G genotype was found only once in the Northeastern population and these genotypes were not considered for analysis. The majority of polymorphic sites showed similar distribution in both populations (Table 1).

**Table 1** Allele, genotype and haplotype (14-bp INS/DEL-3003C/T-3010C/G-3027A/C-3035C/T-3142C/G-3187A/G-3196C/G) frequencies observed at the *HLA-G* 3'UTR polymorphic sites in Northeastern and Southeastern Brazilian populations

	Northeastern population		Southeastern population		<i>P</i> *
	<i>n</i>	Frequency	<i>n</i>	Frequency	
14-bp DEL/INS					
Alleles	256		310		
14-bp INS	96	0.3750	127	0.4097	0.4369
14-bp DEL	160	0.6250	183	0.5903	
Genotypes	128		155		
14-bp INS/INS	20	0.1563	30	0.1935	0.4377
14-bp INS/DEL	56	0.4375	67	0.4323	1.0000
14-bp DEL/DEL	52	0.4063	58	0.3742	0.6248
+3003C/T					
Alleles	256		310		
C	17	0.0664	42	0.1355	0.0084
T	239	0.9336	268	0.8645	
Genotypes	128		155		
CC	0	0.0000	1	0.0065	1.0000
CT	17	0.1328	40	0.2581	0.0111
TT	111	0.8672	114	0.7355	0.0075
+3010C/G					
Alleles	256		310		
C	138	0.5391	162	0.5226	0.7352
G	118	0.4609	148	0.4774	
Genotypes	128		155		
CC	37	0.2891	44	0.2839	1.0000
CG	64	0.5000	74	0.4774	0.7214
GG	27	0.2109	37	0.2387	0.6688
+3027A/C					
Alleles	256		310		
A	9	0.0352	17	0.0548	0.3161
C	247	0.9648	293	0.9452	
Genotypes	128		155		
AA	1	0.0078	1	0.0065	1.0000
AC	7	0.0547	15	0.0968	0.2647
CC	120	0.9375	139	0.8968	0.2849
+3035C/T					
Alleles	256		310		
C	223	0.8711	262	0.8452	0.4008
T	33	0.1289	48	0.1548	
Genotypes	128		155		
CC	98	0.7656	111	0.7161	0.4150
CT	27	0.2109	40	0.2581	0.4003
TT	3	0.0234	4	0.0258	1.0000
+3142C/G					
Alleles	256		310		
C	115	0.4492	142	0.4581	0.8655
G	141	0.5508	168	0.5419	
Genotype	128		155		
CC	26	0.2031	31	0.2000	1.0000
CG	63	0.4922	80	0.5161	0.7210
GG	39	0.3047	44	0.2839	0.7932
+3187A/G					
Alleles	254		310		
A	178	0.7008	230	0.7419	0.2985
G	76	0.2992	80	0.2581	

**Table 1** Continued

	Northeastern population		Southeastern population		<i>P</i> *
	<i>n</i>	Frequency	<i>n</i>	Frequency	
Genotype	127		155		
AA	63	0.4961	82	0.5290	0.6324
AG	52	0.4094	66	0.4258	0.8091
GG	12	0.0945	7	0.0452	0.1504
+3196C/G					
Alleles	254		310		
C	194	0.7638	230	0.7419	0.5585
G	60	0.2362	80	0.2581	
Genotype	127		155		
CC	77	0.6063	86	0.5548	0.3987
CG	40	0.3150	58	0.3742	0.3168
GG	10	0.0787	11	0.0710	0.8233
Haplotypes	254		310		
UTR-1 (DelTGCCCGC)	75	0.2953	80	0.2581	0.3439
UTR-2 (InsTCCCGAG)	58	0.2283	75	0.2419	0.7651
UTR-3 (DelTCCCGAC)	40	0.1575	39	0.1258	0.3294
UTR-4 (DelCGCCAC)	17	0.0669	41	0.1323	0.0120
UTR-5 (InsTCCTGAC)	22	0.0866	29	0.0935	0.8829
UTR-6 (DelTGCCAC)	22	0.0866	21	0.0677	0.4281
UTR-7 (InsTCATGAC)	9	0.0354	17	0.0548	0.3170
UTR-8 (InsTGCCGAG)	0	0.0000	4	0.0129	0.1311
UTR-9 (InsTGCTGAC)	0	0.0000	2	0.0065	0.5040
UTR-10 (DelTCCCGAG)	0	0.0000	1	0.0032	1.0000
UTR-11 (DelCCCCGAC)	0	0.0000	1	0.0032	1.0000
UTR-13 (DelTCCTGAC)	1	0.0039	0	0.0000	0.4504
UTR-14 (DelTGCCCGC)	3	0.0118	0	0.0000	0.0907
UTR-15 (InsTCCCGAC)	6	0.0236	0	0.0000	0.0081
UTR-16 (InsTCCTGAG)	1	0.0039	0	0.0000	0.4504

UTR, untranslated region.

\*Fisher's exact test two-sided *P* value.

The 14-bp INS in healthy unrelated Northeastern and Southeastern Brazilian individuals was found in 40% of the individuals in both populations, a value similar to that reported for Porto Alegre (South of Brazil) and for Italy, Germany and Portugal, which represents the major contribution of European ancestry to the admixed Brazilian population (Table 2).

Comparing the allele frequencies of all SNPs identified at the *HLA-G* 3'UTR between the two Brazilian populations, we found a significant decrease of the +3003C allele frequency in the Northeastern population and we investigated whether it could be explained by differences in the genetic ancestry of the two populations. Compared to *HLA-G* 3' UTR data from Portuguese and Guinean populations (Table 3), the frequency of the +3003C allele in Guineans (0.058) was similar to that observed for our Northeastern Brazilian population (0.066;  $P = 0.826$ ) but different when compared with the Southeastern Brazilian population (0.135;  $P = 0.027$ ). Regarding the Portuguese population, the frequency of the +3003C allele (0.017) differed from that found in Northeastern ( $P = 0.044$ ) and Southeastern ( $P = 0.000$ ) Brazilian populations (Table 3). Moreover, differences in genotypic distribution were only



**Table 2** The 14-bp INS/DEL polymorphism observed in the 3'UTR region of the *HLA-G* gene in different populations

Population (reference)	14-bp INS	14-bp DEL	<i>P</i> *	14-bp I/I	14-bp D/I	14-bp D/D
Brazilian/Northeastern, this study*	96 (0.375)	160 (0.625)		20 (0.156)	56 (0.438)	52 (0.406)
Brazilian/Southeastern (17)	127 (0.410)	183 (0.590)	0.437	30 (0.201)	67 (0.410)	58 (0.389)
Brazilian/Southern (30)	363 (0.395)	557 (0.605)	0.612	70 (0.152)	223 (0.485)	167 (0.363)
Brazilian/Northeastern (31)	141 (0.400)	209 (0.600)	0.501	26 (0.150)	89 (0.510)	60 (0.340)
Brazilian Amerindians (18)	148 (0.385)	236 (0.615)	0.804			
Portuguese (19)	57 (0.475)	63 (0.525)	0.072			
Guinean (19)	73 (0.608)	47 (0.392)	0.000			
Indian (32)	318 (0.530)	282 (0.470)	0.000	65 (0.217)	158 (0.620)	77 (0.302)
Italian (12)	351 (0.389)	551 (0.611)	0.716	65 (0.144)	221 (0.490)	165 (0.366)
German (33)	573 (0.388)	905 (0.618)	0.728	100 (0.135)	373 (0.505)	266 (0.360)
Polish (34)	339 (0.589)	237 (0.411)	0.000	45 (0.156)	147 (0.511)	96 (0.330)
Danish (35)	157 (0.401)	235 (0.599)	0.564	31 (0.158)	95 (0.485)	70 (0.357)
Norwegian (36)	26 (0.380)	42 (0.620)	1.000	6 (0.180)	14 (0.410)	14 (0.410)
Northern American (9)	82 (0.336)	162 (0.664)	0.401	12 (0.098)	58 (0.446)	52 (0.400)
Iranian (37)	76 (0.380)	124 (0.620)	0.923	6 (0.060)	64 (0.640)	30 (0.300)

UTR, untranslated region.

\*The *P* value was calculated by Fisher's exact test and concerns the comparison of allelic frequencies in the Northeastern Brazilian population.

significant ( $P = 0.0201$ ) for the +3003 locus between the studied populations.

The exact test showed significant LD for all pair-wise compared loci ( $P < 0.05$ ). Haplotype inferences using the EM and PHASE methods agreed in 127 (99.2%) samples from Pernambuco, with probabilities of at least 0.99 in 125 (98.4%) of them and average probabilities of 0.9974 (EM) and 0.9948 (PHASE). Only these 127 samples from Pernambuco, together with 155 previously reported samples from São Paulo (17), were used for further analysis. The haplotypes did also fit the Hardy–Weinberg equilibrium expectations for Northeastern ( $P = 0.7874 \pm 0.0059$ ), Southeastern ( $P = 0.5241 \pm 0.0081$ ) and total ( $P = 0.4801 \pm 0.0109$ ) populations. Haplotype frequencies differed significantly between the two populations ( $P = 0.0031 \pm 0.0012$ ).

Twelve different *HLA-G* 3' UTR haplotypes were observed in the total sample, which were named as described elsewhere (Table 1). The comparison of the haplotypes defined for the two populations described here and those described by Alvarez et al. (19) showed that Guineans had the highest haplotype diversity (13 haplotypes), followed by Northeastern and Southeastern Brazilians (11 haplotypes) and Portuguese subjects (10 haplotypes). These Brazilian populations shared seven haplotypes and diverged in eight. The UTR-13, UTR-14, UTR-15 and UTR-16 haplotypes were identified only in the Northeastern population, whereas the UTR-8, UTR-9, UTR-10 and UTR-11 haplotypes were only found in the Southeastern Brazilian population. None of the UTR reported exclusively for the Southeastern Brazilian population was reported in Portuguese or Guinean subjects. Three of the haplotypes found in Northeastern Brazilians (UTR-13, UTR-14 and UTR-16), but not in Southeastern Brazilians, were also found in both Portuguese and Guinean populations (GeneBank accession numbers: AY626573 for

UTR-13, AY626572 for UTR-14 and reported O long haplotype for UTR-16). Furthermore, UTR-15 was only reported for Guineans (AY626569), reflecting the ancestry divergence between Northeastern and Southeastern Brazilian populations.

$F_{ST}$  estimates considering both genotype ( $F_{ST} = 0.0001$ ;  $P = 0.3507 \pm 0.0049$ ) and haplotype ( $F_{ST} = 0.0008$ ;  $P = 0.3434 \pm 0.0047$ ) frequencies suggest that in spite of the considerably different peopling history and admixture levels that characterize São Paulo and Pernambuco, there are no statistically significant differences between them. The exact test of population differentiation based on genotype frequencies ( $P = 0.4489 \pm 0.0173$ ) showed a closely similar result. However, the exact test of population differentiation based on haplotype frequencies ( $P = 0.0031 \pm 0.0012$ ) indicates significantly different haplotype distributions in São Paulo and Pernambuco. Given the significant LD between the considered genetic markers, it is expected that haplotype data would provide more reliable results than genotype data. Such results imply that the exact test of population differentiation based on haplotype frequencies presents higher sensitivity in disclosing slight genetic differences between populations.

## Discussion

Susceptibility to diseases may vary in populations from different geographical region as a consequence of genetic polymorphisms at important immune response-related loci that have emerged by selection and adaptation to environmental stresses (38).

Recife is the capital of Pernambuco State, located at latitude 8°04' 03" S and longitude 34°55' 00" W, on the extreme east coast of Brazil. Ribeirão Preto is a city in São Paulo State, located at latitude 1°12' 42" S and longitude 47°48' 24" W, 2589 km South from Recife.

**Table 3** Comparison of the polymorphisms of the 3'UTR region of HLA-G among Brazilian, Portuguese and African populations

Polymorphisms	Brazilians				Portuguese*	Guineans**	P*	P**	
	Northeastern		Southeastern						
14-bp D/I	256		310		120	120			
I	96	0.375	127	0.406	57	0.475	73	0.608	0.072
D	160	0.625	183	0.594	63	0.525	47	0.392	
+3003C/T	256		310		120	120			
C	17	0.066	42	0.135	2	0.017	7	0.058	0.044
T	239	0.934	268	0.865	118	0.983	113	0.942	0.826
+3010C/G	256		310		120	120			
C	138	0.539	162	0.525	75	0.625	72	0.600	0.120
G	118	0.461	148	0.475	45	0.375	44	0.367	0.145
T	0	0.000	0	0.000	0	0.000	4	0.033	
+3027A/C	256		310		120	120			
A	9	0.035	17	0.056	0	0.000	0	0.000	0.063
C	247	0.965	293	0.944	120	1.000	120	1.000	0.063
+3035C/T	256		310		120	120			
C	223	0.871	262	0.854	101	0.842	99	0.825	0.429
T	33	0.129	48	0.146	19	0.158	21	0.175	0.270
+3142C/G	256		310		120	120			
C	115	0.449	142	0.465	45	0.375	39	0.325	0.181
G	141	0.551	168	0.535	75	0.625	81	0.675	0.025
+3187A/G	254		310		120	120			
A	178	0.701	230	0.747	74	0.617	87	0.725	0.124
G	76	0.299	80	0.253	46	0.383	33	0.275	0.715
+3196C/G	254		310		120	120			
C	194	0.764	230	0.743	75	0.625	61	0.508	0.007
G	60	0.236	80	0.257	45	0.375	59	0.492	0.000

HLA-G, human leucocyte antigen-G; UTR, untranslated region.

P value calculated using two-tailed Fisher's exact test, \* for Portuguese and \*\* for Guinean populations compared to the Northeastern Brazilian population.

The admixed Brazilian population originated in part by marriage between Portuguese men who arrived in Brazil in the 16th century and indigenous women and later African women brought to Brazil through the Trans-Atlantic slavery trade from 1650 for more than two centuries. The slaves came from the African West Coast, including Upper Guinea, and were primarily brought to the States of Pernambuco and Bahia in the Northeastern region and to Rio de Janeiro in the Southeastern part of Brazil. European immigration occurred along Brazilian history to different regions, but in the 19th and 20th centuries, expressive European immigration waves took place predominantly in Southern and Southeastern Brazil. This was observed in Brazilian ancestry studies that confirmed the important contribution of Africans and Amerindians to the Brazilian mitochondrial DNA heritage and of Europeans to inherited Y-chromosome markers (39, 40).

Using a panel of 40 ancestry informative markers, Pena *et al.* (20) showed that independent of skin colour, the proportion of European, African and Amerindian ancestry was 0.601, 0.293 and 0.089 in the Northeastern region and 0.742, 0.173 and 0.073 in the Southeastern region, respectively, suggesting

a lesser heterogeneity than expected between the two regions. The contribution of the African component was higher in the Northeastern than in the Southeastern Brazilian population (20). It should be emphasized that Pena *et al.* (20) did not include populations from the State of Pernambuco or São Paulo. Nevertheless, the reported HLA-A, -B and -C allelic distributions in Pernambuco support the following points: (i) the discrete contribution of the Amerindian component, (ii) an important contribution of African ancestry and (iii) a striking contribution of the European component (41). In São Paulo State, the estimated interethnic admixture based on several microsatellites (TH01, TPOx, CSF1PO, vWA, FES/FPS, F13A1 and CD4) showed 79% European, 14% African and 7% Amerindian components for White Brazilians; a 62% European, 26% African and 12% Amerindian contribution for Brazilian Mulattoes; and a 37% European and 63% African contribution for Afro-Brazilians (42, 43). The lack of information about the polymorphic sites present in the complete 3'UTR of the *HLA-G* gene in geographically and ethnically different populations impairs further discussion. In conclusion, the results presented here corroborate the anthropological

evidence of the origins of both Brazilian populations and include informative data for case-control studies in these regional populations.

### Acknowledgments

We thank Viviane Carvalho for invaluable technical assistance and the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTISFIOCRUZ for financial support. We also acknowledge the support of Instituto de Hematologia do Nordeste - IHENE. RGG is supported by a FACEPE - APQ-0184-4.01/10 grant. N. L. S. has a postdoctoral fellowship (150572/2011-5) from CNPq.

### Conflict of interest

The authors have declared no conflicting interests.

### References

- Hviid THF. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. *Hum Reprod Update* 2006; **12**: 209–32.
- Bainbridge DRJ, Ellis SA, Sargent IL. HLA-G suppresses proliferation of CD4+ T lymphocytes. *J Reprod Immunol* 2000; **48**: 17–26.
- Dorling A, Monk NJ, Lechler RI. HLA-G inhibits the transendothelial migration of human NK cells. *Eur J Immunol* 2000; **30**: 586–93.
- Kanai T, Fujii T, Unno N et al. Human leukocyte antigen-G-expressing cells differently modulate the release of cytokines from mononuclear cells present in the decidua versus peripheral blood. *Am J Reprod Immunol* 2001; **45**: 94–9.
- Riteau B, Rouas-Freiss N, Menier C, Paul P, Dausset J, Carosella ED. HLA-G2, -G3 and -G4 isoforms expressed as nonmature cell-surface glycoproteins inhibit NK and antigen specific CTL cytotoxicity. *J Immunol* 2001; **166**: 5018–26.
- LeMaout J, Le Discorde M, Rouas-Freiss N et al. Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness. *Tissue Antigens* 2003; **62**: 273–84.
- Donadi EA, Castelli EC, Arnaiz-Villena A, Roger M, Rey D, Moreau P. Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. *Cell Mol Life Sci* 2011; **68**: 369–95.
- Onno M, Pangault C, Le Fric G, Guilloux V, Andre P, Fauchet R. Modulation of HLA-G antigens expression by human cytomegalovirus: specific induction in activated macrophages harboring human cytomegalovirus infection. *J Immunol* 2000; **164**: 6426–34.
- Tan Z, Randall G, Fan J et al. Allele-specific targeting of microRNAs to HLA-G and risk of asthma. *Am J Hum Genet* 2007; **81**: 829–34.
- Lin A, Yan WH, Xu HH et al. HLA-G expression in human ovarian carcinoma counteracts NK cell function. *Ann Oncol* 2007; **18**: 1804–9.
- Ristich V, Zhang W, Liang S, Horuzsko A. Mechanisms of prolongation of allograft survival by HLA-G/ILT4-modified dendritic cells. *Hum Immunol* 2007; **68**: 264–71.
- Rizzo R, Hviid TVF, Govoni M 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* 2008; **71**: 520–29.
- Hviid TV, Hylenius S, Rorbye C, Nielsen LG. HLA-G allelic variants are associated with differences in the HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 2003; **55**: 63–79.
- Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, Marcou C, Carosella ED, Moreau P. The 14bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 2003; **64**: 1005–10.
- Yie SM, Li LH, Xiao R, Librach CL. A single base-pair mutation in the 3'-untranslated region of HLA-G mRNA is associated with pre-eclampsia. *Mol Hum Reprod* 2008; **14**: 649–53.
- Castelli EC, Moreau P, Chiromatzo AO et al. *In silico* analysis of microRNAs targeting the HLA-G 3' untranslated region alleles and haplotypes. *Hum Immunol* 2009; **70**: 1020–5.
- Castelli EC, Mendes-Junior CT, Deghaide NHS et al. The genetic structure of 3'-untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. *Genes Immun* 2010; **11**: 134–41.
- Mendes-Junior CT, Castelli EC, Simões RT, Simões AL, Donadi EA. HLA-G 14-bp polymorphism at exon 8 in Amerindian populations from the Brazilian Amazon. *Tissue Antigens* 2007; **69**: 255–60.
- Alvarez M, Piedade J, Balseiro S, Ribas G, Regateiro F. HLA-G 3'-UTR SNP and 14-bp deletion polymorphisms in Portuguese and Guinea-Bissau populations. *Int J Immunogenet* 2009; **36**: 361–6.
- Pena SDJ, Pietro GD, Fuchshuber-Moraes M et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS ONE* 2010; **5**: e117063. doi:10.1371/journal.pone.00117063
- Rousset F. GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 2008; **8**: 103–6.
- Guo SW, Thompson EA. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 1992; **48**: 361–72.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online* 2005; **1**: 47–50.
- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 2010; **10**: 564–7.
- Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 1995; **12**: 921–7.
- Qin ZS, Niu T, Liu JS. Partition-ligation-expectation-maximization algorithm for haplotype inference with single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet* 2002; **71**: 1242–7.
- Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 978–89.

28. Weir B, Cockerham CC. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 1984; **38**: 1358–70.
29. Raymond M, Rousset F. An exact test for population differentiation. *Evolution* 1995; **49**: 1280–3.
30. Consiglio CR, Veit TD, Monticeli OA *et al.* Association of the HLA-G gene +3142C>G polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* 2011; **77**: 540–5. doi: 10.1111/j.1399-0039.2011.01635.x)
31. Fabris A, Catamo E, Segat L *et al.* Association between HLA-G 3'UTR 14-bp polymorphism and HIV vertical transmission in Brazilian children. *AIDS* 2009; **23**: 177–82.
32. Aruna M, Sirisha PVS, Bhaskar SA, Tarakeswari S, Thangaraj K, Reddy BM. Role of 14-bp insertion/deletion polymorphism in HLA-G among Indian women with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 2010; **77**: 131–5.
33. Glas J, Török HP, Tonenchi L *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. *Int Immunol* 2007; **19**: 621–6.
34. Wisniewski A, Bilinska M, Klimczak A *et al.* Association of the HLA-G gene polymorphism with multiple sclerosis in a Polish population. *Int J Immunogenet* 2010; **37**: 307–11.
35. Hylenius S, Andersen AM, Melbye M, Hviid TV. Association between HLA-G genotype and risk of pre-eclampsia: a case-control study using family triads. *Mol Hum Reprod* 2004; **10**: 237–46.
36. Iversen AC, Nguyena OTD, Tømmerdala LF *et al.* The HLA-G 14bp gene polymorphism and decidual HLA-G 14bp gene expression in pre-eclamptic and normal pregnancies. *J Reprod Immunol* 2008; **78**: 158–65.
37. Aghdaie MH, Azarpira N, Kazemi K, Geramizadeh B, Darai M, Malekhoseini SA. Frequency of HLA-G exon 8 polymorphisms and kidney allograft outcome in Iranian population. *Mol Biol Rep* 2011; **38**: 3593–7.
38. Campbell MC, Tishkoff SA. The evolution of human genetic and phenotypic variation in Africa. *Curr Biol* 2010; **20**: R166–73.
39. Alves-Silva J, Santos MS, Guimarães PEM *et al.* The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet* 2000; **67**: 444–61.
40. Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J, Pena SDJ. The phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 281–6.
41. Nigam P, Dellalibera E, Maurício-da-Silva L, Donadi EA, Silva RS. Polymorphism of HLA class I genes in the Brazilian population from the Northeastern State of Pernambuco corroborates anthropological evidence of its origin. *Tissue Antigens* 2004; **64**: 204–9.
42. Ferreira LB, Mendes-Junior CT, Wiezel CEV, Luizson MR, Simões AL. Genomic ancestry of a sample population from the state of São Paulo, Brazil. *Am J Hum Biol* 2006; **18**: 702–5.
43. Muniz YCN, Ferreira LB, Mendes-Junior CT, Wiezel CEV, Simões AL. Genomic ancestry in urban Afro-Brazilians. *Ann Hum Biol* 2008; **35**: 104–11.

## ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa CEP/CPqAM



**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.