



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CLÁUDIA JUNKO INOUE

**ANÁLISE DAS VARIANTES GENÉTICAS DO *FOXP3*
(rs2232365 e rs3761548) E DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DA
INTERLEUCINA 10 E DO FATOR DE CRESCIMENTO
TRANSFORMADOR BETA 1 NA SUSCETIBILIDADE E NA
ATIVIDADE DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

Londrina
2020

CLÁUDIA JUNKO INOUE

**ANÁLISE DAS VARIANTES GENÉTICAS DO *FOXP3*
(rs2232365 e rs3761548) E DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DA
INTERLEUCINA 10 E DO FATOR DE CRESCIMENTO
TRANSFORMADOR BETA 1 NA SUSCETIBILIDADE E NA
ATIVIDADE DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado Simão

Coorientadora: Profa. Dra. Lucilene Rosa e Silva Westmore

Londrina
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

158

Inoue, Cláudia Junko.

ANÁLISE DAS VARIANTES GENÉTICAS DO FOXP3 (rs2232365 e rs3761548) E DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DA INTERLEUCINA 10 E DO FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA 1 NA SUSCETIBILIDADE E NA ATIVIDADE DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS / Cláudia Junko Inoue. - Londrina, 2020.
107 f. : il.

Orientador: Andréa Name Colado Simão.

Coorientador: Lucilene Rosa e Silva Westmore.

Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, 2020.

Inclui bibliografia.

1. DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS - Tese. 2. VARIANTES GENÉTICAS FOXP3 - Tese. 3. FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA - Tese. 4. INTERLEUCINA 10 - Tese. I. Simão, Andréa Name Colado. II. Westmore, Lucilene Rosa e Silva. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. IV. Título.

CDU 61

CLÁUDIA JUNKO INOUE

ANÁLISE DAS VARIANTES GENÉTICAS DO *FOXP3* (rs2232365 e rs3761548) E DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DA INTERLEUCINA 10 E DO FATOR DE CRESCIMENTO TRANSFORMADOR BETA 1 NA SUSCETIBILIDADE E NA ATIVIDADE DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Name Colado
Simão
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Marla Karine Amarante
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Dra. Tamires Flauzino
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 13 de março de 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de realização deste grande projeto que muito engrandece a minha vida profissional.

À toda minha família, em especial minha mãe Miaka Inoue, meus irmãos Inácio Teruo Inoue, Helena Yurika Inoue e Lúcia Tiekko Inoue pelo constante incentivo, auxílio, carinho e paciência durante a toda trajetória deste mestrado.

À minha orientadora Prof. Dra. Andréa Name Colado Simão que com muita competência, dedicação, amizade e paciência muito me ensinou e orientou durante toda a trajetória deste mestrado.

Às queridas Prof. Dra. Lucilene Rosa e Silva Westmore e Dra Rose Meire Albuquerque Pontes que sempre me incentivaram e muito me ajudaram para tornar possível a realização deste meu mestrado.

À Dra. Tamires Flauzino pela dedicação, disponibilidade e preciosa ajuda na realização deste trabalho.

Aos meus companheiros e amigos de trabalho Tânia Hissa Anegawa, Evelin O. Muraguchi, Pedro Humberto Perin Leite, Miriam Zebiam El Kadre, Cybele Trevisan, Leandro Artur Diehl pela constante colaboração para que fosse possível a realização deste meu mestrado.

Às queridas Beatriz Piantoni Gonçalves e Talita Galvão, amigas na vida e durante toda a trajetória deste mestrado.

Às funcionárias Márcia Martins de Oliveira e Eliane Boletti do setor de Endoscopia do Hospital Universitário de Londrina que muito colaboraram para que fosse possível a realização deste projeto de mestrado

À toda a equipe do Laboratório de Pesquisa em Imunologia Aplicada pela grande colaboração para a realização deste trabalho.

INOUE, Cláudia Junko. **Análise das variantes genéticas do *FOXP3* (RS2232365 e RS3761548) e dos níveis plasmáticos da interleucina 10 e do fator de crescimento transformador BETA-1 na suscetibilidade e na atividade das doenças inflamatórias intestinais.** 2020. 107 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Introdução: As doenças inflamatórias intestinais (DII) são desordens inflamatórias crônicas, imunomediadas que acometem o trato gastrointestinal e cursam com fases de atividade e remissão. Os dois maiores exemplos de DII são a Retocolite Ulcerativa (RCU) e a Doença de Crohn (DC). Ambas são doenças de etiologia multifatorial com envolvimento de variantes genéticas e fatores ambientais. O fator de transcrição *forkhead box protein 3* (*FoxP3*) é um marcador molecular das células T reguladoras (Treg) que possuem importante atividade imunomoduladora na mucosa intestinal, inibindo a ação inflamatória das células T pela produção de citocinas pleiotrópicas como o fator de crescimento transformador (TGF)- β 1 e interleucina (IL)-10. Portanto, variações em genes responsáveis pela modulação da resposta imunológica, como o gene *FOXP3*, bem como a implicação do TGF- β 1 e IL-10 têm sido objetos de estudo em diversas doenças. **Objetivos:** Avaliar se as variantes genéticas -924 G>A (rs2232365) e -3279 C>A (rs3761548) do *FOXP3*, individualmente ou em haplótipo e os níveis de IL-10 e TGF- β 1 em mulheres com DII estão associados com a suscetibilidade e a atividade da doença. **Sujeitos e Métodos:** Este é um estudo caso-controle com 110 pacientes mulheres com DII, sendo 60 com RCU e 50 com DC, e 154 indivíduos controles. As variantes do gene *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) e -3279 C>A (rs3761548) foram genotipadas por reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida por polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP). Os níveis plasmáticos de IL-10 e TGF- β 1 foram determinados por imunofluorimetria. A atividade clínica em pacientes com RCU foi avaliada por meio do Escore de Índice Parcial de Mayo e classificados em: remissão (<2), atividade leve (2-4), moderada (5-7) e grave (>7). Nos pacientes com DC, a atividade clínica foi avaliada pelo emprego do Índice de Atividade da DC (IADC) e os resultados foram classificados de acordo com o estado de atividade: remissão (\leq 150), leve (151-219), moderado (220-450) e grave (>450). Colonoscopias foram realizadas por um gastroenterologista experiente e os achados foram graduados de acordo com Escore Endoscópico de Mayo para RCU e Índice Endoscópico de Gravidade para DC (CDEIS). A gravidade da inflamação intestinal determinada por Mayo foi classificada em remissão (0), atividade leve (1), moderada (2) e grave (3) e de acordo com os valores do CDEIS em remissão (<3), atividade leve (3-8), moderada (9-12) e grave (>12). Baseado nos valores de Mayo e CDEIS, os pacientes foram então divididos em dois grupos de atividade endoscópica: remissão/leve (Mayo \leq 1 ou CDEIS \leq 8) e moderada/grave (Mayo >1 e CDEIS >8) para análise estatística. **Resultados:** Nas variantes do *FOXP3*, o genótipo AA da variante -924 G>A (rs2232365) foi associado com a suscetibilidade à DC (OR 3,147, IC 95% 1,015 – 9,758, p= 0,047); enquanto o genótipo AA do *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) foi associado a suscetibilidade à RCU (OR 3,221, IC 95% 1,050 – 9,876, p= 0,041). Além disso, o haplótipo GAGA foi associado à maior chance de desenvolver DII e

RCU (OR 4,003, IC 95% 1,100 – 14,56, $p= 0,035$), mas não com DC. A presença do haplótipo G/C no modelo dominante tem um efeito protetor de 60% na suscetibilidade à DC (OR 0,432, IC 95% 0,196 – 0,951, $p= 0,037$). As pacientes com DII (RCU e DC) apresentaram níveis plasmáticos elevados de TGF- β 1 ($p<0,001$) e IL-10 ($p=0,016$) em comparação aos controles, independentemente da idade, etnia, IMC e tabagismo. As pacientes com o haplótipo GAGA apresentaram níveis plasmáticos mais baixos de TGF- β 1 em comparação com aquelas que apresentam outras estruturas haplotípicas ($p=0.041$), porém as variantes do *FOXP3* analisadas individualmente ou em estruturas haplotípicas não foram associados aos níveis plasmáticos de IL-10. A presença do haplótipo G/C no modelo dominante foi associado a menor atividade endoscópica avaliada por CDEIS ($p=0.035$). No entanto, as variantes do *FOXP3* analisadas individualmente ou em estruturas haplotípicas não foram associados na atividade clínica entre mulheres com DII.

Conclusão: Nossos resultados demonstraram que as variantes do gene *FOXP3* - 924 G>A (rs2232365) e -3279 C>A (rs3761548) foram associadas com o diagnóstico de DC e RCU, respectivamente. A presença do haplótipo GAGA foi associado a maior chance de diagnóstico de DII e RCU, assim como, com menores níveis de TGF- β 1. Já o haplótipo G/C analisado no modelo dominante demonstrou um efeito protetor para DC e foi associado à menor atividade endoscópica. Estes resultados reforçam que as citocinas IL-10 e TGF- β 1 e as variantes do *FOXP3* analisadas individualmente ou em estruturas haplotípicas exercem um papel fundamental na suscetibilidade e patogênese da DII em mulheres.

Palavras-chave: Doença Inflamatória Intestinal. Retocolite Ulcerativa. Doença de Crohn. Fator de crescimento transformador beta. Interleucina 10. *FOXP3*. rs2232365. rs3761548.

INOUE, Cláudia Junko. **Analysis of the *FOXP3* genetic variants (RS2232365 and RS3761548) and the plasmatic levels of interleucin 10 and the transforming growth factor BETA-1 in suscetibility and activity of inflammatory bowel diseases.** 2020. 107 p. Dissertation (Master's in Clinical and Laboratory Physiopathology) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Background: Inflammatory bowel diseases (IBD) are chronic, immune-mediated inflammatory disorders that affect the gastrointestinal tract. The two most frequent IBD are Ulcerative colitis (UC) and Crohn's Disease (CD). Both of them have multifactorial etiology including genetic variants and environmental factors. The fork box protein 3 transcription factor (FoxP3) is a molecular marker of regulatory T cells (Treg) that has important immunomodulatory activities in the intestinal mucosa by inhibiting the inflammatory action of T cells by the production of pleiotropic cytokines as a transformation factor (TGF) β 1 and interleukin (IL) -10. Variations in genes responsible for modulating the immune response, such as *Forkhead box protein 3 gene (FOXP3)*, as well as the implication of TGF- β 1 and IL-10 have been studied in several disorders. **Objectives:** The aim of this study was to evaluate in women with IBD, the association between the genetic variants -924 G > A (rs2232365) and -3279 C > A (rs3761548) of *FOXP3* (individually or in haplotype) and the susceptibility, disease activity, as well as levels of IL-10 and TGF- β 1. **Subjects and Methods:** This is a case-control study with 110 female patients with IBD, 60 with UC and 50 with CD, and 154 controls. The *FOXP3* -924 G > A (rs2232365) and -3279 C > A (rs3761548) gene variants were genotyped by polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). Plasma levels of IL-10 and TGF- β 1 were determined by immunofluorimetry. Clinical activity in patients with UC was assessed by the Mayo Partial Index Score: remission (<2), mild activity (2-4), moderate (5-7) and severe (> 7). In patients with CD, clinical activity was assessed by the CD Activity Index (IADC): remission (\leq 150), mild (151-219), moderate (220 - 450) and severe (> 450). Patients underwent a colonoscopy, which findings were graded according to the Mayo Endoscopic Score for UC: remission (0), mild (1), moderate (2) and severe (3) and according to Endoscopic Severity Index for CD (CDEIS): remission (<3), mild activity (3 -8), moderate (9-12) and severe (> 12). Based on the values of Mayo and CDEIS scores, patients were divided in two groups according to endoscopic activity: remission/mild (Mayo \leq 1 or CDEIS \leq 8) and moderate/severe (Mayo > 1 and CDEIS > 8) for statistical analysis. **Results:** Regarding the *FOXP3* variants, the AA genotype of the -924 G > A variant (rs2232365) was associated with susceptibility to CD (OR 3.147, 95% CI 1.015 - 9.758, p = 0.047), while the AA genotype of *FOXP3* -3279 C > A (rs3761548) was associated with susceptibility to UC (OR 3,221, 95% CI 1,050 - 9,876, p = 0.041). In addition, the GAGA haplotype was associated with a higher chance of developing IBD and UC (OR 4.003, 95% CI 1.100 - 14.56, p = 0.035), but not CD. The presence of the G / C haplotype in the dominant model had a protective effect of 60% on susceptibility to CD (OR 0.432, 95% CI 0.196 - 0.951, p = 0.037). Patients with IBD (UC and CD) had high plasma levels of TGF- β 1 (p <0,001) and IL-10 (p = 0,016) compared to controls, regardless of age, ethnicity, BMI and smoking. Patients with the GAGA haplotype had lower plasma levels of TGF- β 1 compared to those with other haplotypic structures (p = 0.041). However, *FOXP3* variants analyzed

individually or in haplotypic structures were not associated with plasma IL-10 levels. The presence of the G / C haplotype in the dominant model was associated with lower endoscopic activity assessed by CDEIS ($p = 0.035$). *FOXP3* variants analyzed individually or in haplotypic structures were not associated with clinical activity in women with IBD. **Conclusion:** Our results showed that the *FOXP3* -924 G> A (rs2232365) and -3279 C> A (rs3761548) gene variants were associated with the diagnosis of CD and UC, respectively. The presence of the GAGA haplotype was associated with a higher chance of diagnosing IBD and UC, as well as with lower levels of TGF- β 1. On the other hand, the G / C haplotype analyzed in the dominant model, had a protective effect for CD and was associated with lower endoscopic activity. These results reinforce that IL-10 and TGF- β 1 and the *FOXP3* variants analyzed individually or in haplotypic structures may play a role in the susceptibility and pathogenesis of IBD in women.

Keywords: Inflammatory bowel diseases. Ulcerative Colitis. Crohn's Disease. Transforming Growth Factor Beta. Interleukin 10. *FOXP3*. rs2232365. rs3761548.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Fatores ambientais que contribuem no desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais23
- Figura 2** - Imunopatogênese das doenças inflamatórias intestinais.30
- Figura 3** - Gene FOXP3 e principais variantes de um único nucleotídeo38
- Figura 4** - Abordagens terapêuticas step up e top down.43
- Figura 5** - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, para caracterização dos genótipos do rs2232365 FOXP3 -924 A>G.....50
- Figura 6** - Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, para caracterização dos genótipos do rs3761548 FOXP3 -3279 C>A...51

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Escore de Mayo completo para Retocolite Ulcerativa	20
Quadro 2 - Índice de Atividade da Doença de Crohn (CAI)	21
Quadro 3 - Pontuação do índice endoscópico de gravidade da doença de Crohn (CDEIS) para avaliação da cicatrização da mucosa.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
APC	Antigen Presenting Cell – Células apresentadoras de antígenos
ASCA	Anti- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ATG16L1	Autophagy related 16 like 1 (ATG16L1)
CBP	Cirrose biliar primária
CCL	Chemokine ligands – Ligantes de quimiocina
CCR 7	Chemokine receptor 7– Receptor de quimiocina 7
CCR 9	Chemokine receptor 9 – Receptor de quimiocina 9
CD	Célula dendrítica
CDAI	Crohn's disease activity index – Índice de atividade da doença de Crohn
CDEIS	Crohn's disease endoscopic index severity – Índice endoscópico de gravidade da doença de Crohn
CNS	Conserved non-coding sequences – Sequências não codificantes conservadas
CpG	5-C-phosphate G-3'
CTLA4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 – Antígeno linfocitário T citotóxico 4
DAMPs	Damage-associated molecular patterns – Padrões moleculares associados a danos
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças inflamatórias intestinais
FOXP3	Forkhead box protein P3
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein – Receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticoide
GWAS	Genome Wide Association Studies – Estudos de Associação Ampla do Genoma
IC	Intervalo de Confiança
Ig A	Imunoglobulina A
Ig G1	Imunoglobulina G 1
IL	Interleucina
ILC	Innate Lymphoid Cell – Célula linfoide inata

IL-23R	Receptor de interleucina 23
IL-10	Interleucina 10
IL-10R	Receptor de interleucina 10
IMC	Índice de massa corpórea
IFN- γ	Interferon gamma
IPEX	Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked - Síndrome de imunodesregulação poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X
IRF4	Interferon Regulatory Factor 4 – Fator regulador de interferon 4
IRGM	Immunity related GTPase M
JAK	Janus Kinase
LAG3	Lymphocyte-activation gene 3 – Gene 3 de ativação de linfócitos
MAdCAM1	Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1
MHC	Major histocompatibility complex – Complexo Principal de Histocompatibilidade
mRNA	Messenger ribonucleic acid – RNA mensageiro
NF- κ B	Nuclear Factor Kappa B – Fator Nuclear Kappa B
NLR	NOD like receptors – Receptores tipo NOD
NOD2	Nucleotide-binding Oligomerization Domain 2
OR	Odds Ratio
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns – Padrões moleculares associados a patógenos
pANCA	Perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies – Anticorpos Anti- citoplasma de Neutrófilos Perinuclear
PCR	Polymerase chain reaction – Reação em cadeia da polimerase
PRR	Pattern recognition receptors – Receptor de reconhecimento padrão
pTreg	Peripheral T regulatory cells – Células T regulatórias periféricas
PU.1	PU-box binding 1
RCU	Retocolite ulcerativa
RFLP	Restriction fragment length polymorphisms – Polimorfismo de fragmento de restrição
ROR γ T	Related orphan receptor gamma T
SMAD	Small Mothers Against Decapentaplegic
SNV	Single nucleotide variant – Variante de um único nucleotídeo

STAT	Signal transducer and activator of transcription
T-bet	T-box expressed in T cells
TCR	Tcell receptor – Receptor de célula T
TGF- β	Transforming growth factor beta – Fator de crescimento transformador beta
Th	T helper – T auxiliadora
TLR	Toll-like receptors – Receptor tipo Toll
TNF	Tumoral necrosis factor – Fator de necrose tumoral
Treg	Célula T regulatória
tTreg	Thymic T regulatory cell – Célula T regulatória tímica
TSLP	Thymic stromal lymphopoietin – Linfopoetina estromal do timo
VEGF	Vascular endothelial growth factor – Fator de crescimento do endotélio vascular
XC	Xileno cianol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.2	DIAGNÓSTICO	18
1.3	PATOGÊNESE DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS	23
1.3.1	Imunopatogênese	25
1.3.2	Células T Regulatórias, o Fator de Transcrição FoxP3 e as Citocinas Imunossupressoras IL-10 E TGF- β 1	31
1.3.3	Fatores Genéticos	35
1.3.3.1	As variantes genéticas do FOXP3.....	37
1.4	TRATAMENTO DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS	40
2	JUSTIFICATIVA	44
3	OBJETIVOS	45
3.1	OBJETIVO GERAL.....	45
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
4	SUJEITOS E MÉTODOS	46
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	46
4.2	DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM	46
4.3	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO	47
4.4	DOSAGEM DE CITOCINAS	48
4.5	EXTRAÇÃO DO DNA	48
4.6	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA AS VARIANTES Rs3332365 E Rs3761548 DO GENE FOXP3.....	48
4.7	POLIMORFISMO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP) PARA A VARIANTE Rs2232365	49
4.8	POLIMORFISMO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP) PARA A VARIANTE Rs3761548	50
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
5	RESULTADOS	53

5.1	ARTIGO	54
6	CONCLUSÕES	79
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICES	104
	APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	104
	APÊNDICE B - Ficha de avaliação	106
	ANEXOS	107
	ANEXO A - Aprovação do comitê de ética em pesquisa envolvendo seres humanos	107

1 INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias intestinais (DII) compreendem dois tipos principais de desordens intestinais crônicas, a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), que cursam com fases de atividade e remissão da doença (MAASER *et al.*, 2019).

A DC pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal e está associada a lesões transmurais descontínuas da parede intestinal, enquanto que na RCU as lesões são contínuas e superficiais e a inflamação está confinada somente ao cólon e reto. Ambas podem manifestar sintomas intestinais, bem como extraintestinais, além de complicações importantes (MAASER *et al.*, 2019).

Na RCU os sintomas mais comuns são diarreia e sangue nas fezes, sendo que mais de 90% dos pacientes com RCU ativa relatam sangramento retal. Pacientes com doença ativa também apresentam urgência fecal, tenesmo, exsudato mucopurulento, diarreia noturna e dor abdominal do tipo cólica (FORD; MOAYYEDI; HANAUER, 2013). Os sintomas associados geralmente refletem a gravidade da inflamação da mucosa e podem diferir de acordo com a extensão da doença. Pacientes em atividade grave podem exibir febre, taquicardia, perda de peso, sensibilidade e distensão abdominal além de ruídos hidroaéreos reduzidos (TRAVIS; JEWELL, 2003). Estes pacientes apresentam risco aumentado de câncer colorretal sendo que a extensão da colite e a duração da doença são os dois fatores de risco mais importantes (LUTGENS *et al.*, 2013).

Na DC os sintomas são variáveis e se correlacionam com o fenótipo da doença de acordo com a Classificação de Montreal: idade no diagnóstico (A1: <16 anos, A2: 17 a 40 anos, A3: >40 anos), localização da doença (L1: doença ileal, L2: colônica, L3: ileocolônica e L4: doença gastrointestinal alta) e comportamento da doença (B1: não estenosante e não penetrante, B2: estenosante, B3: penetrante e P: doença perianal isolada (SEHGAL; KOLTUN, 2010).

A diarreia crônica é o sintoma mais comum e a dor abdominal e perda de peso são observados em cerca de 80% e 60% dos pacientes, respectivamente, antes do diagnóstico (TORRES *et al.*, 2017). Sangue e/ou muco nas fezes podem ser observados em 40% a 50% dos pacientes com colite de Crohn, mas com menor frequência do que na RCU (LENNARD-JONES; SHIVANANDA, 1997). Pacientes com doença estenosante podem desenvolver obstruções intestinais (mais

comumente no intestino delgado). Ainda podem ocorrer fístulas ou abscessos, com sintomas relacionados à localização da fístula (FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2017). Pacientes com colite por DC envolvendo pelo menos um terço do cólon também apresentam risco aumentado de câncer colorretal e requerem vigilância permanente (BAUMGART; SANDBORN, 2012).

As manifestações extraintestinais ocorrem em cerca de 31% dos pacientes com DC e 43% daqueles com RCU e são condições inflamatórias podem seguir um curso independente ou trajetória semelhante ao estado da doença gastrointestinal. As principais manifestações extraintestinais são as oftalmológicas (uveíte, episclerite), reumatológicas (espondilite anquilosante, artropatias pauciarticulares e axiais), orocutâneas (estomatite aftosa, síndrome de Sweet, pioderma gangrenoso, eritema nodoso, psoríase) e hepatobiliares (colangite esclerosante primária) (GARBER; REGUEIRO, 2019).

As DII afetam principalmente adultos jovens e tem curso crônico e recidivante, com impacto na qualidade de vida em aspectos relacionados com a saúde, educação, profissão, vida social e familiar. É considerada doença incapacitante, apesar dos avanços tecnológicos presenciados ao longo dos últimos anos (BECKER *et al.*, 2015).

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O diagnóstico de DII é feito em todos os continentes habitáveis, entre todas as etnias e classes socioeconômicas. Embora sejam mais prevalentes entre os indivíduos de descendência europeia que vivem em países ocidentais ricos, os países industrializados na Ásia, no Oriente Médio, África e América do Sul relataram aumentos rápidos na incidência (MAK *et al.*, 2019). As DII afetam cerca de 1,5 milhão de americanos, 2,2 milhões de pessoas na Europa (BURISCH *et al.*, 2013).

Na última década, a DII emergiu rapidamente na Ásia e na Europa Oriental para se tornar uma doença global. Simultaneamente, o aumento da incidência de DII parece ter se estabilizado no ocidente. A prevalência de DII permanece mais alta nos países ocidentais, no entanto, a diferença entre oriente e ocidente está diminuindo com o aumento da DII nos países do leste. Em geral, os países asiáticos com uma densidade populacional maior também têm um número total maior de

casos de DII. No entanto, o número de coortes de base populacionais originárias do Oriente ainda é baixo e a epidemiologia da DII no Oriente permanece em grande parte desconhecida (MAK *et al.*, 2019).

Na maioria dos estudos, o pico de incidência de DII está entre a segunda e a quarta década de vida. Algumas coortes sugeriram taxa de incidência bimodal com um modesto segundo pico entre a sexta e a sétima décadas de vida (MOLODECKY *et al.*, 2012). A incidência é semelhante entre homens e mulheres, mas é influenciada pela raça e etnia. O risco de DII é três vezes maior na população judaica do que nos não judeus (BERNSTEIN *et al.*, 2006). Embora as estimativas iniciais sugerissem prevalência significativamente menor de DII nos afro-americanos ou nos de etnia hispânica do que nas populações brancas, estudos sugerem que a diferença na incidência entre populações brancas e não brancas é mais estreita, com fenótipos comparáveis (AFZALI; CROSS, 2016).

No Brasil, dados confiáveis sobre a incidência e prevalência de DC e RCU são escassos porque as DII não são doenças de notificação obrigatória. Assim faltam registros adequados dos sistemas de saúde públicos e privados (QUARESMA *et al.*, 2019). Em uma revisão sistemática que incluiu todos os países da América Latina, foram analisados 61 artigos de vários países de três diferentes bases de dados (KOTZE *et al.*, 2019).

Entre os estudos brasileiros incluídos, quando analisados em conjunto, a incidência de DII aumentou constantemente ao longo das últimas gerações. Desde que a incidência de DII foi originalmente relatada em 0,08 por 100.000 habitantes no Brasil em 1988, a incidência de DC aumentou de 0,68 (1991-1995) para 3,5 (2001-2005) por 100.000 habitantes, atingindo um pico de 5,48 por 100.000 habitantes em 2015. De 1991-1995 e 2001-2005, a incidência de RCU também aumentou de 3,86 para 5,3 por 100.000 habitantes, com um pico de 8,00 por 100.000 em 2015. Ao analisar apenas os estudos brasileiros, a prevalência de DC no Brasil aumentou de 0,24 (1986-1990) para 24,1 por 100.000 habitantes (2014). Da mesma forma, a prevalência de RCU aumentou de 0,99 para 14,1 por 100.000 habitantes no mesmo período de tempo. A prevalência estimada de DII no Brasil foi de 38,2 por 100.000 em 2014 (KOTZE *et al.*, 2019).

Pacientes com DC têm uma mortalidade geral ligeiramente mais alta em comparação com a população em geral. Em uma meta-análise de 35 estudos, a taxa

de mortalidade padronizada (uma aproximação do risco de morte em comparação com a população em geral) foi de 1,38 (IC 95% 1,23-1,55) (BEWTRA *et al.*, 2013).

Pacientes com RCU têm uma mortalidade geral ligeiramente mais alta em comparação com a população em geral (BEWTRA *et al.*, 2013). Enquanto RCU grave pode ser uma condição com risco de vida, a morte é incomum (DONG *et al.*, 2020). Em uma meta-análise de 2019 de seis estudos (Europa e Estados Unidos), incluindo mais de 2000 pacientes com RCU grave aguda, as taxas de mortalidade combinadas em 3 e 12 meses foram de 0,8 e 1,0 por cento, respectivamente (DONG *et al.*, 2020).

1.2 DIAGNÓSTICO

Não existe um padrão único de referência para o diagnóstico da DC ou RCU, sendo este baseado em uma combinação de investigações clínicas, laboratoriais, endoscópicas, histológicas e radiológicas (MAASER *et al.*, 2019). Os exames endoscópicos com biópsias de tecido permanecem como métodos fundamentais para o diagnóstico e a diferenciação entre as DII (CHATHADI *et al.*, 2015). A ileocolonosopia representa ferramenta mais importante no diagnóstico na suspeita de DII e deve ser realizada possivelmente antes do início de qualquer tratamento médico (ANNESE *et al.*, 2013).

A característica endoscópica da DC é a distribuição desigual da inflamação, com lesões salteadas (áreas de inflamação interposta entre a mucosa normal). As úlceras tendem a ser longitudinais e podem estar associadas a uma aparência em “paralelepípedo” do íleo ou cólon, orifícios fistulosos e estenose. A mucosa retal é frequentemente normal e as lesões circunferenciais e a inflamação contínua são raras (FEUERSTEIN; CHEIFETZ, 2017). Os critérios anatômicos de gravidade são definidos como ulcerações profundas que corroem a camada muscular ou descolamentos de mucosa ou ulcerações limitadas à submucosa, mas que se estendem a mais de um terço de um segmento colônico definido (cólon direito, transversal, esquerdo) (NAHON *et al.*, 2002).

Na RCU as características endoscópicas de colite leve são eritema, congestão vascular, e pelo menos perda parcial do padrão vascular visível (TRAVIS *et al.*, 2013). A colite moderada é caracterizada pela perda completa do padrão vascular, presença de sangue aderido à superfície da mucosa, erosões, geralmente

com aparência granular grosseira e friabilidade mucosa (sangramento ao toque), e a colite grave é caracterizada por sangramento espontâneo e ulcerações (KLINGER; KANN, 2019).

Testes sorológicos podem ser utilizados no auxílio ao diagnóstico, embora a acurácia dos melhores testes disponíveis, como o anticorpo anti-citoplasma de neutrófilos perinuclear (pANCA) e o anticorpo anti-Saccharomyces cerevisiae IgA e IgG (ASCA), seja bastante limitada e ineficaz na diferenciação entre DC colônica e RCU (BOSSUYT, 2006; REESE *et al*, 2006).

Existem vários sistemas de pontuação disponíveis para classificar a gravidade clínica e endoscópica da RCU e da DC, que auxiliam na avaliação objetiva da doença e guiam estratégias terapêuticas e de monitoramento (PEYRIN-BIROULET *et al.*, 2015).

O escore de Mayo completo, é composto pelo escore parcial (clínico) somado ao subescore endoscópico, e é uma combinação da avaliação dos sintomas clínicos (frequência das evacuações e sangramento retal) e da gravidade endoscópica para determinação da atividade e gravidade da RCU (Quadro 1). O escore parcial de Mayo (clínico) demonstrou correlacionar-se bem com o sistema de pontuação completo (TONTINI; BISSCHOPS; NEUMANN, 2014). O componente endoscópico avalia a inflamação com base em uma escala de 4 pontos [0–3] da seguinte maneira: (0) normal; (1) eritema; padrão vascular diminuído, friabilidade leve; (2) eritema acentuado, padrão vascular ausente, friabilidade, erosões; e (3) ulceração, sangramento espontâneo, sendo o escore mais comumente usado (SEHGAL; KOLTUN, 2010). A remissão clínica é considerada com escore menor ou igual a 2, a doença leve com escore de 3 a 5 e a doença moderada a grave um escore de 6 a 12 (Lewis *et al.*, 2008). A resposta clínica é definida como a redução da linha de base do escore de Mayo completo em ≥ 3 pontos e uma diminuição de 30% a partir da pontuação inicial com uma diminuição de pelo menos 1 ponto na subescala de sangramento retal ou pontuação absoluta de sangramento retal de 0 ou 1. A cicatrização da mucosa foi definida como uma pontuação de 0 a 1. Para o escore de Mayo, a parte mais inflamada determina a pontuação geral e este escore demonstra um alto grau de correlação para a atividade da RCU (COLOMBEL *et al.*, 2016).

Quadro 1 – Escore de Mayo Completo para Retocolite Ulcerativa.

ESCORE	NÚMERO DE EVACUAÇÕES	SANGRAMENTO RETAL	ACHADOS ENDOSCÓPICOS	AVALIAÇÃO GLOBAL
0	Número habitual	Ausência	Ausência de doença ou doença inativa (cicatriz)	Normal
1	1-2x mais do habitual	Raias de sangue -menos da metade das evacuações	Doença leve (eritema, ↓do padrão vascular, leve friabilidade)	Doença leve
2	3-4x a mais do habitual	Sangue vivo na maioria das evacuações	Doença moderada (eritema evidente, perda do padrão vascular, erosões)	Doença moderada
3	5 ou mais do habitual	Evacuação apenas com sangue	Doença grave (sangramento espontâneo, ulcerações)	Doença grave

Fonte: Adaptado de Lewis *et al.* (2008).

Um dos índices de atividade clínica mais utilizado na DC é o Índice de Atividade da Doença de Crohn (CDAI – *Crohn's Disease Activity Index*) (quadro 2). O CDAI foi desenvolvido por Best e colaboradores em 1976 e consiste de oito fatores, cada um somado após o ajuste com um fator de ponderação. A remissão é definida como CDAI menor ou igual a 150 pontos, atividade leve com 151 a 219 pontos, atividade moderada com 220 a 450 pontos e um valor maior que 450 pontos representa doença grave. A maioria dos principais estudos sobre medicamentos em DC define resposta como diminuição do CDAI > 70 pontos; no entanto, em alguns estudos é necessária uma queda de 100 pontos para a resposta (PAPAY, 2013). O CDAI é também um dos índices mais frequentemente utilizado para estudos clínicos (SOSTEGNI *et al.*, 2003).

Quadro 2 – Índice de Atividade da Doença de Crohn (CDAI).

ITEM (ESCORE CUMULATIVO: 7 DIAS)	FATOR DE PONDERAÇÃO (Multiplicar itens)	TOTAL
Número de evacuações líquidas ou pastosas	2	
Dor abdominal	5	
Estado geral	7	
Número de Complicações Artrite ou artralgia Irite ou uveíte Fissura, fístula ou abscesso anal Eritema nodoso, pioderma gangrenoso ou estomatite aftosa	20	
Uso de loperamida ou difenoxilato para diarreia (0=não; 1=sim)	30	
Massa abdominal (nenhuma=0; questionável=1; definida=2)	10	
Hematócrito: Homens:47-Ht(%); Mulheres:42-Ht(%)	6	
Peso corporal (1-peso atual/peso habitual x 100)	1	

Fonte: Adaptado de Sehgal, Koltun. (2010).

O índice de gravidade endoscópica da doença de Crohn (CDEIS – *Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity*), é um dos sistemas de pontuação endoscópica o qual pontua a atividade (de 0 a 44) em cinco segmentos intestinais (íleo terminal, cólon direito, transverso, cólon esquerdo e sigmóide, reto) e considera lesões mucosas específicas (como úlceras, estenose) e a extensão da doença. As pontuações variam de <3: remissão, 3-8: atividade endoscópica leve, 9-12: atividade endoscópica moderada e >12: atividade endoscópica grave (MARY, MODIGLIANI, 1989; DE CRUZ *et al.*, 2013). O quadro 3 ilustra os parâmetros avaliados no CDEIS.

Quadro 3 – Pontuação do índice endoscópico de gravidade da doença de Crohn (CDEIS) para avaliação da cicatrização da mucosa.

Índice de gravidade endoscópica da doença de Crohn (CDEIS)						
	Íleo	Cólon direito	Transverso	Cólon esquerdo e sigmoide	Reto	Soma
Úlceras profundas (0 para nenhuma; 12 pontos se presente)						
Úlceras superficiais (0 para nenhuma; 6 pontos se presente)						
Superfície envolvida pela doença (cm)						
Superfície envolvida por ulceração (cm)						
						TOTAL A
Número de segmentos explorados (1 a 5)						N
Total B = A/n						TOTAL B
Se presença de estenose ulcerada em qualquer parte adicionar +3						C
Se presença de estenose não ulcerada em qualquer parte adicionar +3						D
Total B+C+D= escore CDEIS						

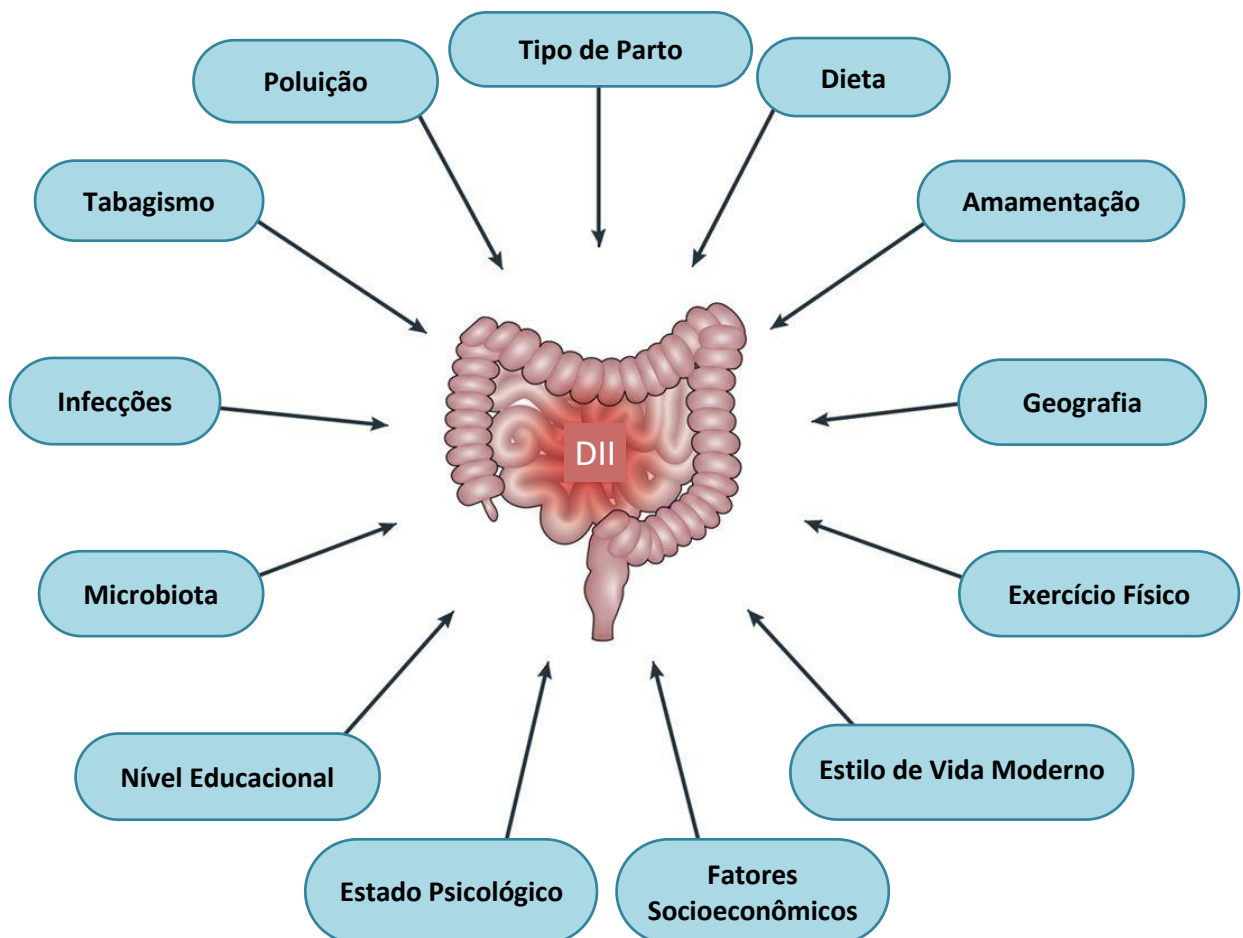
Fonte: Adaptado de Marteau (2013).

1.3 PATOGÊNESE DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

A etiologia da DII não está totalmente elucidada, no entanto acredita-se que a interação da suscetibilidade genética e o impacto ambiental no microbioma intestinal resultam em ativação imune inadequada (RAMOS; PAPADAKIS, 2019).

Considera-se que vários fatores ambientais, tais como, tabagismo, infecções, dieta, poluição, estilo de vida moderno, amamentação, nível socioeconômico e educacional, atividade física, fator geográfico, microbiota, medicamentos, fatores emocionais entre outros, desempenham um papel importante no desenvolvimento, evolução e prognóstico das DII (ANANTHAKRISHNAN *et al.*, 2018). A figura 1 ilustra os principais fatores ambientais que contribuem na patogênese das DII.

Figura 1 – Fatores ambientais que contribuem no desenvolvimento das doenças inflamatórias intestinais



Fonte: Adaptado de Ananthkrishnan *et al.*, 2018.

Novas tendências epidemiológicas da DII nos países em desenvolvimento após a industrialização sugerem que o envolvimento dos fatores ambientais na promoção da inflamação em indivíduos geneticamente suscetíveis (NG *et al.*, 2018). A maioria dos estudos sobre fatores demográficos e estilo de vida, investigou a prevalência de DII nos países desenvolvidos, Estados Unidos e países da Europa Ocidental e Central e sugeriu uma associação de fatores ambientais com um estilo de vida ocidental e um melhoramento do estado socioeconômico geral. Isso também poderia explicar a variação norte-sul e frequência de DII mais elevada encontrada nas comunidades urbanas quando comparada às áreas rurais (LOFTUS; SANDBORN, 2002).

O tabagismo é o fator ambiental mais fortemente associado às DII, com notáveis efeitos opostos em DC e RCU (TIMMER, 2003). Foi demonstrado que o tabagismo é protetor para a RCU e que, paradoxalmente, os ex-fumantes são mais propensos a desenvolver RCU do que pessoas que nunca fumaram em sua vida (SANDLER; LOFTUS, 2004; KHASAWNEH M. *et al.*, 2017). Diferentemente, o tabagismo representa um fator de risco para o desenvolvimento de DC. Fumantes com DC têm maior recorrência da doença e são submetidos com maior frequência à cirurgia (KRISHNAN; KORZENIK, 2002; PARKES; WHELAN; LINDSAY, 2014). Hipóteses diferentes têm sido sugeridas para explicar esses achados, incluindo prejuízos na autofagia, toxicidade direta sobre as células imunes e produtoras de muco e indução de alterações no microbioma (THOMAS *et al.*, 2000; CHEN; WANG; SHEN, 2019).

Eventos precoces de vida, como modo de parto, amamentação, exposição a animais de estimação e infecções (“hipótese da higiene”) também são fatores associados ao risco considerável de desenvolvimento das DII, principalmente devido às influências na composição da microbiota intestinal (CHOLAPRANEE; ANANTHAKRISHNAN, 2016). O microbioma intestinal estabelece a conexão entre o ambiente externo e a mucosa intestinal. A disbiose microbiana, resultante da diminuição da diversidade do microbioma, foi descrito em pacientes com DII, mas não se sabe se é a causa ou consequência da inflamação intestinal observada (SARTOR; WU, 2017). Em pacientes com DII, há uma diminuição de bactérias com atividade anti-inflamatória e um aumento de bactérias pró-inflamatórias em comparação com indivíduos saudáveis e esta disbiose observada pode afetar o sistema imunológico do hospedeiro e a integridade da barreira intestinal, resultando

na inflamação crônica e respostas imunes aberrantes. As alterações mais frequentemente observadas incluem diminuição de *Firmicutes* e um aumento em *Proteobactérias* e *Bacteroidetes* (NISHIDA *et al.*, 2018).

O uso de medicamentos, principalmente os antibióticos, também foi associado com aumento do risco de DII (SHAW, BLANCHARD, BERNSTEIN, 2011). Esta associação geralmente resulta de alterações no microbioma intestinal após o uso de antibióticos durante fases iniciais da vida, quando a microbiota desempenha um papel crítico no desenvolvimento das células imunes (OLSZAK *et al.*, 2012).

A dieta é outro fator ambiental que também é capaz de alterar a suscetibilidade à DII. A exposição a dietas ricas em ácidos graxos saturados e carnes processadas foi relatada aumentar o risco de DII (ANANTHAKRISHNAN *et al.*, 2014). Por outro lado, uma dieta rica em fibras demonstrou reduzir o risco de DC em 40% (ANANTHAKRISHNAN *et al.*, 2013), e o metabolismo da fibra alimentar, por bactérias do cólon, em ácidos graxos de cadeia curta que possuem propriedades anti-inflamatórias poderia explicar esse efeito protetor (VINOLO *et al.*, 2011).

1.3.1 Imunopatogênese

Disfunções na resposta imune inata e adaptativa contribuem para a resposta inflamatória intestinal exacerbada presente em pacientes com DII (AHLUWALIA *et al.*, 2018). A camada de muco e epitélio intestinal que mantêm a segregação entre o lúmen intestinal e o sistema imunológico da mucosa representa a primeira barreira física e química encontradas pelas bactérias intestinais, patógenos e antígenos alimentares (PETERSON; ARTIS, 2014). Defeitos e alterações da barreira mucosa, possivelmente causada por fatores ambientais e/ou infecções, resultam em aumento da permeabilidade intestinal e tem sido observado em pacientes com DII (DE SOUZA; FIOCCHI, 2016).

Várias células do sistema imune inato têm demonstrado contribuir para a patogênese da DII. Os neutrófilos perpetuam a inflamação intestinal através do comprometimento da função da barreira epitelial e liberação de múltiplos mediadores inflamatórios (DE SOUZA; FIOCCHI, 2016). As células dendríticas (CDs) controlam a comunicação entre a imunidade inata e adaptativa para manter a homeostase (ATREYA; NEURATH, 2010). As CDs são influenciadas pelas células epiteliais intestinais que produzem ácido retinoico, linfopoietina estromal do timo (TSLP) e

fator transformador do crescimento beta (TGF- β), promovendo o desenvolvimento de CDs produtoras de interleucina (IL) 10 que, por sua vez, estimulam respostas anti-inflamatórias e tolerância imunológica (PETERSON; ARTIS, 2014). No entanto, na DII, o condicionamento inadequado das CDs, como resultado da diminuição da expressão mucosa de TGF- β e TSLP, bem como a regulação negativa da via de sinalização do ácido retinoico foi observado durante o estado ativo e inativo da doença (MAGNUSSON *et al.*, 2016).

A homeostase imune intestinal é mantida pela detecção contínua de antígenos microbianos por macrófagos e CDs, mas também por células epiteliais e miofibroblastos. A detecção é mediada por receptores de reconhecimento padrão (PRRs), incluindo receptores do tipo *toll* (TLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e ao dano celular (DAMPs). A detecção e expressão de PRR é altamente regulada para manter tolerância a bactérias comensais e prevenir respostas imunes (AHLUWALIA; MAGNUSSON; OHMAN, 2017).

Nos pacientes com DII, as CDs da mucosa e os macrófagos mostram expressão aumentada de TLR2, TLR4, CD40 e receptor de quimiocina 7 (CCR7), que contribui e promove a inflamação, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF)- α , IL-1 β , IL-6 e IL-18 (NEURATH, 2014). A maioria dos TLRs está associada a respostas pró-inflamatórias; no entanto, demonstrou-se que o TLR9 participa da cicatrização da mucosa e promove respostas anti-inflamatórias através da indução de IL-10 e interferons (IFN) tipo 1 (IFN- α e IFN- β) (KUZNETSOV *et al.*, 2014).

Entre as citocinas pró-inflamatórias, o fator de necrose tumoral (TNF), secretado por várias populações de células imunes e estromais é considerado responsável por amplificar e manter a inflamação crônica na DII promovendo a transcrição de outras citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão com regulação positiva no endotélio e ativando a atividade fagocítica de macrófagos (NEURATH, 2014).

A IL-6 é referida como participante da sustentação dos sinais de sobrevivência das células T. Sendo uma citocina pleiotrópica, a IL-6 regula o tráfego de leucócitos direcionado à quimiocina e participa de ativação, proliferação e diferenciação de células T *helper* (Th) CD4⁺ e células T CD8⁺ através da ativação da proteína Janus Kinase (JAK) ativando vias de sinalização e o fator de transcrição

Signal transducer and activator of transcription (STAT). Portanto, a IL-6 é uma citocina importante na imunopatogênese de várias doenças inflamatórias crônicas. A IL-1 β está envolvida no recrutamento de granulócitos e aumento da atividade das células Th17 (KIMURA; KISHIMOTO, 2010).

A família de células linfoides inatas (ILC - *lymphoid innate cells*) acumula seletivamente nos tecidos da mucosa e desempenha um papel importante na manutenção da homeostase intestinal por indução de respostas imunes protetoras contra patógenos e promoção de integridade do tecido. As ILCs regulam suas respostas via secreção de citocinas e são conhecidas por conectar o sistema imune inato e adaptativo (GEREMIA; ARANCIBIA, 2017). Devido às suas semelhanças funcionais com as populações adaptativas de células Th CD4⁺, foram divididos nos subtipos ILC1, ILC2 e ILC3, com base em sua capacidade de expressão de fatores de transcrição e produção de citocinas de acordo com as células Th1, Th2 e Th17, respectivamente (SPITS *et al.*, 2013).

Evidências indicam que as ILCs participam da patogênese da inflamação intestinal crônica, como indicado pela abundância e distribuição alteradas dos seus diferentes subtipos na mucosa, em particular ILC1 e ILC3, em pacientes com DII (EBBO *et al.*, 2017). As células ILC1 estão aumentadas no íleo e as células ILC3 produtoras de IL-17 estão aumentadas no íleo e cólon inflamados de pacientes com DC (BERNINK *et al.*, 2013; GEREMIA *et al.*, 2011). Além da expansão de ILC1s em pacientes com DC, também parece haver uma redução recíproca nas células ILC3 produtoras de IL-22. A IL-22 é conhecida por seu papel na promoção da integridade da barreira intestinal e, portanto, sua redução pode ter efeitos prejudiciais com consequências no contexto de inflamação crônica (GOLDBERG *et al.*, 2015).

O acúmulo de linfócitos na mucosa intestinal é uma das características histológicas da DII. As células T entram na mucosa intestinal, por um processo chamado "*homing*" controlado por marcadores "*gut homing*" na superfície das células T (FISHER *et al.*, 2016). Os linfócitos, ativados principalmente pelas CDs CD103+ nos linfonodos mesentéricos que drenam o intestino, regulam positivamente os marcadores "*gut homing*" como a integrina $\alpha 4\beta 7$ e o receptor de quimiocina 9 (CCR9) (JOHANSSON-LINDBOM *et al.*, 2005). A localização dos linfócitos que expressam $\alpha 4\beta 7$ ocorre pela ligação desta integrina pela molécula de adesão *Mucosal addressin cell adhesion molecule 1* (MAdCAM1) expressa pelas células endoteliais nos vasos sanguíneos do trato intestinal. MAdCAM1 é também encontrada em locais

extraintestinais frequentemente afetados em pacientes com DII, como articulações, olhos, fígado e pele (ADAMS; EKSTEEN, 2006). Além disso, o CCR9 permite aos linfócitos ligarem-se ao ligante de quimiocina (CCL)25 que é expresso seletivamente nas células endoteliais do intestino delgado (MIYASAKA; TANAKA, 2004).

As células Th *naives* (Th0) CD4⁺ ativadas por antígenos específicos das células apresentadoras de antígenos (APCs) e influenciadas pelo meio das citocinas, se diferenciam em células Th efetoras: Th1, Th2, Th17, Th9 ou células Treg (AHLUWALIA; MAGNUSSON; OHMAN, 2017).

As células Th1 se diferenciam das células Th0 CD4⁺ após estimulação de IL-12 e IL-27, com subsequente indução da superfície de fatores de transcrição como *T-box expressed in T cells* (T-bet) e STAT-4, e são caracterizados pela secreção de IFN- γ , TNF- α e IL-2 (ZHU, YAMANE, PAUL, 2010).

As células Th2, por outro lado, diferenciam-se sob a influência de IL-4 e expressão de fatores de transcrição como GATA 3 (a sigla refere-se a sequência de nucleotídeos no DNA que esta proteína se liga) e STAT6. As células Th2 são caracterizadas por secreção de IL-4, IL-5 e IL-13. Células Th1 e Th2 são linhagens terminais diferenciadas estáveis que se regulam mutuamente pela secreção de citocinas. O IFN- γ secretado pelas células Th1 reprimem a proliferação de células Th2, enquanto a IL-4 secretadas pelas células Th2 antagonizam a diferenciação celular Th1 (ZUNDLER; NEURATH, 2015).

O desequilíbrio imunológico dos subgrupos Th1 e Th2 desempenha um papel importante no desenvolvimento da DII. Uma resposta imune Th1 dominante, com altas quantidades de IL-2 e IFN- γ , tem sido mais pronunciado em pacientes com DC em comparação com pacientes com RCU (FUSS *et al.*, 1996).

O aumento de IFN- γ na mucosa induz a produção de TNF- α por macrófagos intestinais (NEURATH, 2014) e, por sua vez, desempenha um papel crucial na amplificação da cronicidade da DII. Por outro lado, foi demonstrado que as células T da mucosa dos pacientes com RCU liberam quantidades maiores de citocinas características da resposta Th2, como IL-5 e IL-13, comparado aos indivíduos controles e pacientes com DC (FUSS; STROBER, 2008). A IL-13 pode contribuir para um estado de doença inflamatória por seu efeito negativo sobre função de barreira das células epiteliais intestinais (HELLER *et al.*, 2005). Portanto, historicamente, com base nas citocinas derivadas das células T detectadas na mucosa inflamada pelas DII, a DC foi designada como uma condição Th1

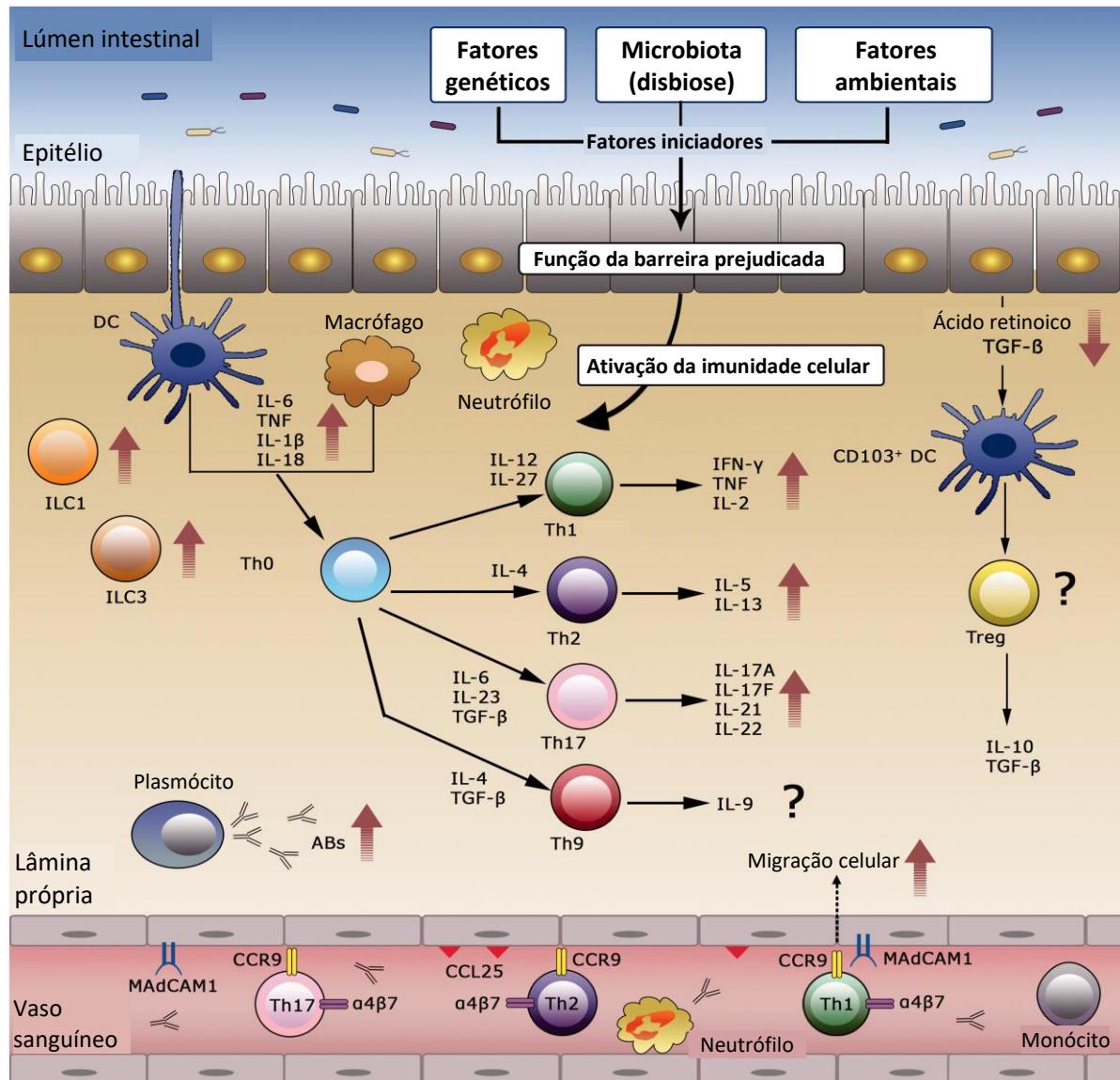
(MONTELEONE *et al.*, 2005) enquanto RCU foi caracterizada como uma condição Th2 (DE SOUZA; FIOCCHI, 2016). Contudo, essa caracterização Th1/Th2 foi revisada após a descoberta de células Th17 e seu papel fundamental nas condições inflamatórias como a DII (MIOSSEC; KOLLS, 2012).

As células Th17 são caracterizadas pela produção de grandes quantidades de IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22 e expressão do fator de transcrição *retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t* (ROR- γ t). As células Th17 são induzidas por uma combinação de IL-6 e TGF- β e expressão de STAT3 e sua expansão é promovida pela IL-23. Foi proposto que as células Th17 exibem plasticidade e podem ser induzidas a diferenciar-se em células Th1 (LEE *et al.*, 2009). As células Th17 também mostraram plasticidade em relação às células Tregs. Uma porcentagem aumentada de células Th17 foi observada na mucosa de pacientes com DC e RCU (GALVEZ, 2014). A IL-17A, uma citocina pró-inflamatória produzida pelas células Th17, desempenha um papel importante na comunicação entre imunidade inata e adaptativa, apresentando níveis elevados na mucosa e no soro de pacientes com DC e RCU, juntamente com a IL-21 e IL-23 (ROVEDATTI *et al.*, 2009).

Essas citocinas exacerbam a inflamação pela capacidade da IL-17A de promover a produção de IL-8 pelas células epiteliais, que por sua vez estimula o recrutamento de neutrófilos e células Th17 adicionais para o local da inflamação. Além disso, a IL-21 induz aumento da secreção de IL-17A e IFN- γ pelas ILCs, no intestino inflamado de pacientes com DC (GEREMIA; ARANCIBIA, 2017).

Um número aumentado de um subgrupo de células T efetoras denominados células Th9, foi relatado na mucosa intestinal de pacientes com RCU (NALLEWEG *et al.*, 2015). As células Th9, caracterizadas por produção de IL-9, são induzidas por IL-4 e TGF- β na presença de vários fatores transcricionais, incluindo PU-box binding 1 (PU.1) e fator regulador de interferon 4 (IRF4) (WEIGMANN; NEURATH, 2017). Sugere-se que a IL-9 prejudica a função da barreira intestinal, bloqueando a proliferação de células epiteliais intestinais e regulando negativamente a expressão de várias proteínas de junção celular, incluindo claudina e ocludina (GERLACH *et al.*, 2014). A figura 2 ilustra os principais componentes da imunopatogênese das DII.

Figura 2 – Imunopatogênese das doenças inflamatórias intestinais.



Fonte: Adaptado de Ahluwalia *et al.* (2018). Uma resposta imune desregulada da mucosa é o fator central da DII e é caracterizada por um sistema imunológico inato alterado, juntamente com células T efetoras ativadas, presença aumentada de células B e produção de anticorpos, além de produção aumentada de mediadores pró-inflamatórios. As principais células imunes inatas e adaptativas envolvidas na patogênese da DII e citocinas produzidas pelos vários subconjuntos celulares na mucosa afetada são mostradas. A ativação e manutenção inadequadas das respostas inflamatórias causadas por citocinas e a falta de controle por mecanismos reguladores e redução de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , levam à inflamação intestinal crônica. Além disso, o intestino inflamado mostra uma expressão aumentada de MAdCAM-1, levando ao aumento do recrutamento de células T específicas do intestino para a lâmina própria e perpetua o ciclo de inflamação, levando a lesão tecidual crônica e dano epitelial. DII: doença inflamatória intestinal; DC: doença de Crohn; RCU: retocolite ulcerativa; CD: célula dendrítica; ILC: células linfoides inatas; Th: célula auxiliar T; Célula Treg: célula T reguladora; IL: interleucina; TNF: fator de necrose tumoral; IFN: interferon; TGF- β : fator de crescimento transformador- β ; ABs: anticorpos; CCR: receptor de quimiocina; MAdCAM-1: molécula-1 de adesão celular da mucosa; α 4 β 7: integrina.

1.3.2 Células T Regulatórias, o fator de transcrição FoxP3 e as citocinas imunossupressoras IL-10 E TGF- β 1

Dada a importância das células T regulatórias (Treg) na regulação da imunidade, possíveis defeitos nas células Treg e seus mediadores têm sido sugerido como primordiais na patogênese da DII. Existe uma heterogeneidade considerável entre as células Treg FoxP3+, sendo que seus subtipos surgem em tecidos distintos e exibem capacidades funcionais únicas. A maioria das células Treg surge no timo a partir de células T precursoras autorreativas. A expressão do *FOXP3* é induzida durante a geração das células Treg derivadas do timo (tTreg) (anteriormente conhecidas como células Treg naturais) em resposta ao envolvimento do receptor de célula T (TCR). Além disso, durante o desenvolvimento das células tTreg, emerge um padrão extenso de *loci* epigeneticamente modificados (incluindo aqueles do gene *FOXP3*) que prediz compromisso transcricional estável para um fenótipo de célula Treg (MORIKAWA; SAKAGUCHI, 2014).

Acredita-se que as células tTreg sejam principalmente responsáveis pela prevenção de doenças autoimunes (JOSEFOWICZ *et al.*, 2012). Por outro lado, as células Treg extratímicas, conhecidas como células Treg de origem periférica (pTreg), surgem de células Th0 FOXP3-CD4+ que são expostas a TGF- β e IL-2 nos tecidos periféricos. Essas células pTreg se acumulam principalmente em locais de barreira, como o intestino, onde mantêm a homeostase imune (FLOESS *et al.*, 2007).

As células Tregs são caracterizadas por sua expressão constitutiva do fator de transcrição FoxP3, CD25 (receptor de IL-2A), antígeno linfocitário T citotóxico-4 (CTLA-4) e receptor do fator de necrose tumoral induzido por glicocorticóide (GITR) e são um subgrupo supressivo de células T CD4+ que desempenham um papel importante na manutenção da homeostase intestinal e previnem doenças autoimunes (AHLUWALIA; MAGNUSSON; OHMAN, 2017).

Em geral, as células Treg FoxP3+ exercem funções supressoras através de vários mecanismos bem estabelecidos: secretam citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β); expressam moléculas coinibidoras (CTLA-4) e a proteína do gene 3 de ativação de linfócitos (LAG3); podem modular a atividade das APCs. As células Treg também podem esgotar fatores cruciais de crescimento do microambiente, sequestrando-os de células efetoras e potencialmente eliminando-as em anergia ou

apoptose (SHEVAC, 2009). Elas também são conhecidas por absorver e consumir escassos aminoácidos e, através da expressão das ectoenzimas CD39 e CD73, impulsionam o acúmulo de nucleotídeos de adenosina, que interrompem o metabolismo das células efetoras, levando à anergia (DEAGLIO *et al.*, 2007).

Os subtipos de células Treg também são capazes de mediar várias funções extraimunes, incluindo a angiogênese (mediada pela expressão do fator de crescimento endotelial vascular - VEGF), reparo tecidual e regulação metabólica (nas células T ou de forma sistêmica) (LU; PAN, 2017).

O fator de transcrição FoxP3 pertence à família de fatores de transcrição *forkhead-winged-helix*. Seu papel como um amplo regulador da expressão gênica é central para a identidade e função do subtipo de células Treg CD4+ (LU, BARBI, PAN, 2017).

O FoxP3 é capaz de se ligar a mais de 2.800 locais genômicos, o que corresponde a aproximadamente de 700–1.400 genes envolvidos no desenvolvimento e estabelecimento de células Treg (SAMSTEIN *et al.*, 2012). Ao regular esses locais, o FoxP3 coopera funcionalmente, ou possivelmente reforça os padrões de expressão gênica que surgem da programação epigenética iniciada pela estimulação do TCR durante o desenvolvimento das células Treg (MORIKAWA; SAKAGUCHI, 2014).

O número de genes ligados ao FoxP3 constitui apenas uma pequena proporção (aproximadamente 6 a 10%) daqueles que se sabe estarem sob seu controle (ZHENG *et al.*, 2007). Assim, acredita-se que o FoxP3 possa controlar positiva ou negativamente a atividade transcricional de muitos genes-alvo indiretamente, interagindo com vários cofatores. O FoxP3 e seus parceiros de ligação formam um grande complexo de proteínas com tamanho de 400 a 800 kDa (ou talvez até maior), envolvendo mais de 360 fatores diferentes, alguns dos quais são outros fatores de transcrição ou fatores modificadores da cromatina (RUDRA *et al.*, 2012).

Embora os mecanismos moleculares para a supressão imunológica mediada por células Treg não sejam completamente entendidos, a secreção das citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β são importantes por suas propriedades regulatórias. A IL-10 exerce efeitos de imunossupressão em vários tipos de células, incluindo CDs e macrófagos, inibindo sua capacidade de estimular células T efetoras e induz adicionalmente a proliferação de Tregs via ativação de STAT3. Essa citocina

afeta a imunidade inata e adaptativa, inibindo o fator de transcrição *nuclear fator κB* (NF-κB), interrompendo a produção de várias citocinas pró-inflamatórias e regulando negativamente a expressão de complexo principal de histocompatibilidade tipo II (MHC - *major histocompatibility complex*) e de moléculas coestimuladoras em APCs. (MITTAL *et al.*, 2015).

Um estudo de Rodriguez-Perálvarez e colaboradores (2012) demonstrou que pacientes com RCU moderada a grave apresentavam níveis séricos de IL-10 significativamente aumentados quando comparados aos pacientes com RCU leve demonstrando que embora ação da IL-10 estivesse preservada, sua superexpressão não seria suficiente para neutralizar os mecanismos pró-inflamatórios.

Detková e colaboradores (2002) observaram respostas clínicas diferentes ao tratamento com o inibidor de TNF-α infliximabe, com diminuição significativa dos níveis séricos de IL-10 nos pacientes com boa resposta clínica ($p < 0,05$) e um aumento significativo dos níveis séricos de IL-10 nos pacientes com menor resposta ao tratamento, demonstrando que a diminuição dos níveis de IL-10 no grupo de pacientes com uma boa resposta clínica à terapia com o inibidor de TNF-α poderia refletir a supressão suficiente da resposta Th1 pelo tratamento e vice-versa.

Outra citocina produzida pelas células Treg é o TGF-β, que suprime respostas pró-inflamatórias de macrófagos e células T efectoras, via ativação de mediadores intracelulares de transdução de sinal, como os *Small Mothers Against Decapentaplegic 3 e 4* (SMAD3 e SMAD4) (PARK *et al.*, 2017).

O TGF-β é de particular importância no desenvolvimento de células pTreg derivadas extratimo. A ativação de SMADs desencadeada por TGF-β leva à ligação de heterodímeros SMAD3–SMAD4 a regiões conservadas não codificantes 1 (CNS 1 – *conserved non-coding sequences 1*) no gene *FOXP3*. Esse evento molecular é essencial para induzir a expressão de *FOXP3* em células Th0 CD4+ e, assim, promover a aquisição de um fenótipo de célula Treg em tecidos periféricos e *in vitro* (JOSEFOWICZ; LU; RUDENSKI, 2012). O TGF-β também pode ter um papel no desenvolvimento das células tTreg (LIU *et al.*, 2008). Embora alguns estudos sugiram que o TGF-β não seja necessário para a geração de células tTreg (CUROTTO DE LAFAILLE; LAFAILLE, 2009), outros relatam que a citocina pode promover a sobrevivência das células tTreg durante o desenvolvimento (OUYANG *et al.*, 2010) sem influenciar diretamente a expressão do *FOXP3*. A exposição contínua ao TGF-β estabiliza a expressão do FoxP3 nas células pTreg (FLOESS *et al.*, 2007),

mas não está claro se este mecanismo é semelhante para o TGF- β nas células tTreg.

Além de desempenhar um papel importante na indução de função das células T, o TGF- β é crucial para o desenvolvimento de Th17. A diferenciação Th17 e Treg é considerada recíproca com plasticidade entre os subgrupos, dependendo do ambiente local de citocinas (MAYNARD, WEAVER, 2009). O equilíbrio entre as células Tregs e Th17, especialmente nos tecidos intestinais com sua alta carga bacteriana, é extremamente importante e necessário para prevenir respostas imunes desreguladas.

Kiliç e colaboradores (2009) avaliaram os níveis plasmáticos de TGF β -1 na DII e demonstraram que não houve aumento significativo dos níveis plasmáticos de TGF- β 1 em pacientes com DC ativa e em remissão. Na RCU em remissão houve diminuição significativa nos níveis plasmáticos desta citocina quando comparado aos controles sem doença, e significativamente aumentado na RCU ativa na comparação com o grupo controle e também com RCU em remissão. Com esses achados foi sugerido que na DC prevalece a resposta Th1, com a presença de IFN- γ que afeta negativamente a diferenciação das células produtoras de TGF- β 1. Por outro lado, a presença de citocinas tipo Th2, como na RCU poderia favorecer o surgimento de células produtoras de TGF- β 1, demonstrando que o TGF- β 1 poderia ser utilizado como um marcador para diagnóstico diferencial de paciente com RCU ativa e aqueles em remissão.

Em um estudo polonês foi encontrado na RCU uma correlação positiva dos níveis séricos TGF β -1 com a gravidade da doença ($r=0,86$ $p<0,001$) sugerindo que os níveis séricos de TGF β -1 poderiam ser utilizados na avaliação da atividade da RCU (CIECKO-MICHALSKA *et al.*, 2014).

Apesar do número de células Tregs mostrar-se diminuído no sangue periférico durante a DII ativa em comparação com a DII inativa e controles (ZUNDLER; NEURATH, 2015), as células Tregs estão numericamente expandidas na lâmina própria e seu potencial anti-inflamatório é preservado por sua capacidade de suprimir a proliferação de células T efetoras *in vitro* (DE SOUZA; FIOCCHI, 2016). Assim, pode-se sugerir que a proporção de células T efetoras para células Tregs, em vez do número absoluto de células Tregs, desempenha um papel importante na imunopatogênese da DII. Além disso, foi sugerido que células T efetoras da mucosa de pacientes com DII podem ser resistentes ou menos

responsivas à supressão mediada por células Treg (FANTINI *et al.*, 2009). Isto foi associado à regulação positiva do SMAD7, uma proteína citoplasmática que inibe a sinalização de TGF- β , essencial para a função da célula Treg, e é superexpressa na mucosa de pacientes com DII (NEURATH, 2014).

A execução das funções supressoras das células Treg requer a regulação adequada dos seus genes, sendo que a transcrição e expressão da proteína FoxP3 são cruciais para a manutenção quantitativa e funcional destas células (LU; BARBI; PAN, 2018).

1.3.3 Fatores Genéticos

A evidência inicial de uma predisposição genética à DII foi originada em estudos familiares que revelaram um aumento significativo do risco de desenvolver a doença em primeiro, segundo e até parentes de terceiro grau de pacientes com DII quando comparados à população geral (MOLLER *et al.*, 2015). Após a introdução dos estudos de associação ampla do genoma (GWAS), o número de *loci* de risco genético significativos na DII expandiu progressivamente e novos alvos terapêuticos foram descobertos por meio do mapeamento funcional das regiões gênicas candidatas (JOSTINS *et al.*, 2012). A maioria dos *loci* é compartilhada entre DC e RCU e há sobreposição com *loci* associados a outras doenças imunomediadas, o que também é evidente nas frequentes co-ocorrências de doenças inflamatórias imunomediadas (BURISCH; JESS; EGEBERG, 2019).

Sabe-se que o sistema imunológico está desregulado na DII, sendo caracterizada por um desequilíbrio entre respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, com predomínio da primeira (DAVIES; ABREU, 2015). Assim, tem sido demonstrado que genes que codificam proteínas que desempenham um papel importante na imunidade inata estão implicados no desenvolvimento da DII (CLEYNEN *et al.*, 2013).

O *nucleotide-binding oligomerization domain 2 (NOD2)* foi o primeiro gene de suscetibilidade identificado na DII e codifica um receptor de reconhecimento padrão de patógenos (PPR), importante para detecção bacteriana. Assim, os alelos variantes do *NOD2* comprometem as defesas do hospedeiro contra a invasão de patógenos e tem sido consistentemente associado a um risco aumentado de DC, em particular, DC ileal (CLEYNEN *et al.*, 2016). Outros genes que conferem risco à DC

incluem o *autophagy related 16 like 1 (ATG16L1)* e *immunity related GTPase M (IRGM)*, sendo que ambos estão envolvidos na autofagia induzida por patógenos (WANG *et al.*, 2014). Curiosamente, enquanto variantes de *NOD2* e *ATG16L1* têm sido associados ao risco de DC em indivíduos de populações caucasianas, estudos entre populações não-caucasianas têm falhado em replicar os achados (NG *et al.*, 2012), sugerindo que a herança genética da DII pode diferir entre as etnias.

Resultados de GWAS demonstram que os defeitos da barreira epitelial podem representar um mecanismo primário da DII, uma vez que variantes de suscetibilidade foram detectados em genes que codificam proteínas juncionais como E-caderina, nucleotídeo de guanina proteína de ligação alfa 12 e *zonula occludens-1* (ANDERSON, BOUCHER, 2011). Além disso, a expressão defeituosa de peptídeos antimicrobianos e mudanças na expressão de proteínas juncionais como E-caderina, β -catenina e claudinas foram observadas em biópsias intestinais de pacientes com DII (KLAG; STANGE; WEHKAMP, 2013).

Um desequilíbrio entre resposta pró e anti-inflamatórias na imunidade adaptativa também conduz à inflamação crônica na DII. Entre os genes que codificam citocinas e seus receptores, o maior efeito foi encontrado no locus de risco do gene do receptor da IL-23 (*IL23R*) (BANK *et al.*, 2014). O receptor IL23R atua através da proteína JAK 2 e do STAT3 para ativar a transcrição de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, o IL23R é essencial para a diferenciação de células Th 17 pró-inflamatórias. Mutações resultando em uma via hiperativa de IL23R–Th17 demonstraram aumentar o risco de DII, enquanto um efeito protetor foi encontrado para alelos com perda de função de IL23R (MOMOZAWA *et al.*, 2011). Efeitos da via IL23R – Th17, incluindo JAK2, STAT3 e IL-12, também foram associados ao desenvolvimento de DII (DUBINSKY *et al.*, 2013).

Mutações nos genes que codificam agentes anti-inflamatórios na imunidade adaptativa também foram associadas ao risco de DII (PIGNEUR *et al.*, 2013). Mutações de perda de função nos genes de receptores da IL-10A (*IL10RA*) e de receptores da IL-10B (*IL10RB*) foram associadas ao risco de DII de início muito precoce, o que representa um subtipo monogênico de DII caracterizado por manifestação da doença dentro do primeiro ano de vida, que cursa com característica agressiva da doença (GLOCKER *et al.*, 2009).

Além disso, genes funcionais e regiões não codificantes estão também ganhando reconhecimento como elementos importantes na DII. Variantes de

nucleotídeo único (SNVs) em regiões não codificantes podem induzir mudanças na expressão gênica por meio de elementos reguladores transcricionais de expressão gênica e modificações epigenéticas (KALLA *et al.*, 2015).

O gene *FOXP3* humano está localizado no braço curto do cromossomo X (p11.23-13.3), com 11 éxons de codificação, 3 éxons sem codificação e 104 íntrons (BRUNKOW *et al.*, 2001). Os 2 éxons não codificantes da extremidade 5' (-2a e -2b) são emendados com um segundo éxon não codificante comum (-1) e separados por 640 pb. Os éxons -2b e -1 são separados por aproximadamente 5000 bp e possuem regiões conservadas não codificantes (CNS – *conserved non-coding sequences*), CNS2 (+2177~ +2189pb), intron CNS3 (+4393 +4506 pb). Esses íntrons são altamente conservados, e a expressão FoxP3 é fortemente influenciada pelo estado de metilação de certos motivos dentro deles (ZHENG *et al.*, 2010).

Nos seres humanos, a mutação do gene *FOXP3* leva à síndrome de imunodesregulação poliendocrinopatia, enteropatia ligada ao X (IPEX). Pacientes com esse distúrbio genético desenvolvem várias imunopatologias nos primeiros meses de vida, incluindo dermatite, enteropatia, diabetes, distúrbios da tireóide (devido à disfunção da glândula endócrina) e anemia (RAMSDELL; ZIEGLER, 2014).

O fator de transcrição FoxP3 tem um papel definidor na regulação do desenvolvimento e função de células Treg. Williams e Rudensky (2007) e posteriormente Tom e Greene (2011) demonstraram que a expressão continuada de FoxP3 em células Treg maduras é indispensável para a manutenção da tolerância que essas células medeiam.

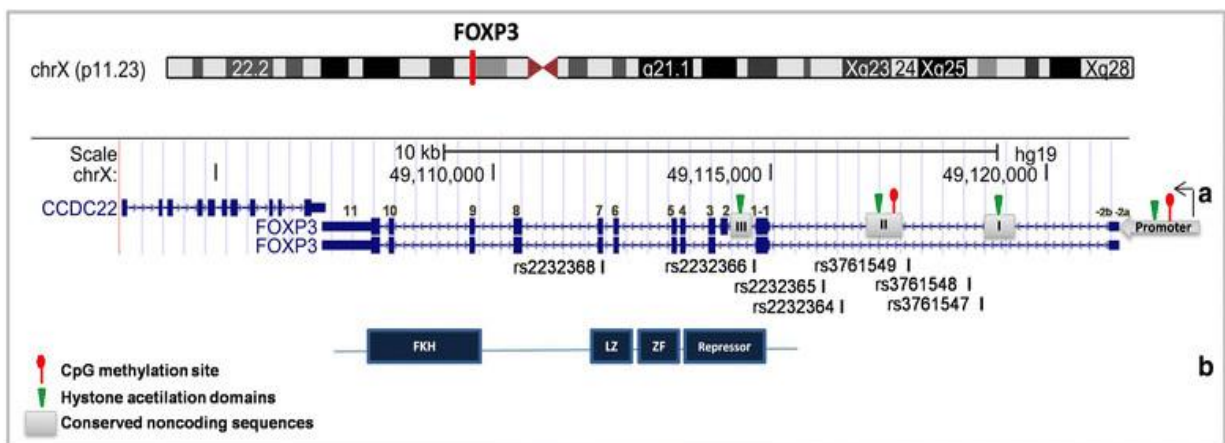
Portanto, como visto anteriormente, as células Treg são responsáveis pela regulação e manutenção da homeostase imunológica, e defeitos na diferenciação e função destas células estão relacionados à maior suscetibilidade às doenças autoimunes e infecciosas.

1.3.3.1 As variantes genéticas do FOXP3

As variantes do *FOXP3* podem alterar o fator de transcrição FoxP3 tanto funcional como quantitativamente, resultando na redução de células Tregs CD4⁺ CD25⁺ funcionais e subsequentemente células T CD4⁺ cronicamente ativadas, que expressam níveis aumentados de marcadores de ativação e de citocinas, resultando em doenças autoimunes (WILDIN *et al.*, 2002; BJORNVOLD *et al.*, 2006).

As variantes foram descritas em várias regiões do gene *FOXP3*, como regiões do promotor, do íntron e do éxon. A presença das variantes na região promotora pode potencialmente alterar a expressão gênica modificando a especificidade de ligação de fatores de transcrição para seus locais de ligação e modificando a cinética do início da transcrição (HANEL *et al.* 2011). Existem hoje várias SNVs descritas na região promotora de *FOXP3* tais como: -924 G>A (rs2232365), -1383 C>T (rs2232364), -2383 C>T (rs3761549), -3279 C>A (rs3761548) e -3499 A>G (rs3761547) (BASSUNY *et al.* 2003). A figura 3 ilustra o gene *FOXP3* e suas principais SNVs.

Figura 3 – Gene *FOXP3* e principais variantes de um único nucleotídeo



Fonte: adaptado de Marques *et al.*, 2015

Vários estudos associaram a variante rs3761548 -3279 C>A do *FOXP3* ao risco de doenças multifatoriais como a tireoidite autoimune (INOUE *et al.*, 2010), rinite alérgica (ZHANG *et al.*, 2009), aborto espontâneo recorrente inexplicável (Wu *et al.* 2012), vitiligo (JAHAN *et al.*, 2013), artrite reumatoide (HASHEMI *et al.*, 2018), esclerose múltipla (EFTEKHARIAN, *et al.* 2016; JAFARZADEH, *et al.* 2014) e psoríase (GAO *et al.*, 2010).

Em uma meta-análise, Lee e colaboradores (2015) demonstraram que a variante rs3761548 -3279 A>C do *FOXP3* está associada com a suscetibilidade a doenças autoimunes: diabetes tipo 1 (n=4), doença tireoidiana autoimune (n=3), vitiligo (n=2), artrite reumatoide (n=2), doença de Crohn (n=2), esclerose sistêmica (n=1), miastenia gravis (n=1), psoríase (n=1), cirrose biliar primária (n=1), doença de Addison (n=1), lúpus eritematoso sistêmico (n=1), retocolite ulcerativa (n=1) e

doença celíaca (n=1). Foi realizada meta-análise doença-específica e etnia-específica, e também em populações caucasianas e asiáticas. Os resultados revelaram uma associação significativa entre doença autoimune e os genótipos combinados AA + AC (OR=1.480, IC 95%: 1,263-1,614, $p=2,5 \times 10^{-9}$). Já a estratificação por etnia indicou uma associação entre o genótipo combinado AA + AC e doença autoimune em asiáticos (OR=1.416, IC 95%: 1.225–1,637, $p=2,5 \times 10^{-7}$) e em não caucasianos (OR=1,432, CI 95%: 1.245–1.647, $p=7.5 \times 10^{-8}$).

Embora as variantes do *FOXP3* tenham sido investigadas em várias doenças autoimunes, poucos estudos avaliaram essas variantes na DII. Park e colaboradores (2005) demonstraram que quatro SNVs do *FOXP3*, três na região promotora: -6054 (deleção>ATT, rs5902434), -3279 (A>C, rs376158) e -924 (A>G, rs2232365) e uma na região do íntron 9: IVS9 + 459 (T>C, rs2280883), não estavam associados com a suscetibilidade à DC, mas houve associação com a cirrose biliar primária (CBP) autoimune somente com o genótipo T/T da variante IVS9 + 459.

Entretanto, Xia e colaboradores (2019a) avaliaram a associação da DC com variantes do *FOXP3* (rs3761547, rs2232365, rs2294021 e rs376548) de acordo com o sexo e sua expressão do *FOXP3* no cólon em pacientes chineses. Neste estudo a variante rs3761547 conferiu suscetibilidade à DC somente em indivíduos do sexo masculino (maior frequência do alelo G em comparação aos controles), bem como portadores do haplótipo GCGC do sexo masculino apresentaram chance 1,7 vezes maior de desenvolvimento da DC, enquanto o haplótipo (ACGA) apresentou efeito protetor em pacientes do sexo feminino de 35% na DC (OR=0,656 95% IC 95%: 0,433-0,995 $p=0,046$). Neste mesmo estudo, as variantes de rs3761547, rs2232365, rs2294021 e rs3761548 foram relacionadas com diminuição da expressão colônica do FoxP3 nos pacientes chineses somente do sexo masculino, demonstrando que as variantes de FoxP3 podem aumentar a suscetibilidade à DC pela redução da expressão colônica de FoxP3 em pacientes chineses do sexo masculino.

Quanto à RCU, em um outro estudo de Xia e colaboradores (2019b) demonstraram que as variantes rs3761548 e rs2232365 do *FOXP3* em pacientes chineses estavam associadas à maior suscetibilidade à RCU. Na variante rs3761548, o alelo A conferiu chance de desenvolvimento de DC 1,5 vezes maior no sexo feminino e masculino; na variante rs2232365 o alelo G 1,3 vezes mais chance no sexo feminino e 1,5 vezes mais chance no sexo masculino. Estas mesmas variantes também foram associadas à maior gravidade da RCU sendo que o alelo A

da variante rs3761548 apresentou 1,7 vezes mais chance RCU grave em mulheres e 3 vezes maior chance de RCU grave em homens; e na variante rs2232365 o alelo G foi associado a 1,5 mais chance de RCU grave em mulheres e 2,4 vezes de RCU grave em homens. Neste estudo, a expressão de *FOXP3* estava reduzida em pacientes com RCU com pelo menos um alelo variante em comparação com pacientes com RCU sem alelo variante de rs3761548, rs2232365.

Portanto, diante deste cenário, fica evidente a importância de se avaliar SNVs no gene *FOXP3* que possam estar envolvidos na variabilidade da resposta regulatória de células T autorreativas e tolerância imunológica, e assim associados à suscetibilidade à DII.

1.4 TRATAMENTO DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

O objetivo do tratamento na DII é atingir a remissão clínica e, em seguida, obter manutenção da remissão livre de corticoesteroides (KORNBLUTH , SACHAR; 2010). A escolha de qual medicamento usar é determinado pela gravidade da apresentação da doença e sua localização.

A RCU leve a moderada é tratada com aminossalicilatos como o ácido 5-aminossalicílico (5-ASA) ou a sulfassalazina. A maioria dos tratamentos envolve o uso de mesalazina oral. A mesalazina é eficaz tanto na indução quanto na manutenção da remissão. (FORD, MOAYYEDI, HANAUER, 2013). O manejo inicial da doença moderada a grave é tipicamente com corticosteroides sistêmicos, usando prednisona oral ou em situações mais graves, corticosteroides intravenosos (IV). Além de um agente corticosteroide, deve ser adicionado ao medicamento de regime de longo prazo livre de corticosteroides para manutenção da remissão. A escolha de qual medicamento adicionar depende da gravidade da doença, preferência do paciente e do perfil de segurança (UNGARO *et al.*, 2017).

Para manutenção da remissão, há um número de diferentes classes terapêuticas incluindo tiopurinas, inibidores de TNF- α , anti-integrinas, e inibidor da JAK. As tiopurinas são eficazes apenas na manutenção da remissão, e não tem função na indução da remissão (KHAN *et al.*, 2011). Normalmente, apenas um imunossupressor ou agente biológico é utilizado, mas alguns dados sugerem que a terapia combinada de um inibidor de TNF com um imunossupressor pode ser mais eficaz do que apenas um agente (PANACCIONE *et al.*, 2014).

Apesar dos tratamentos médicos disponíveis, aproximadamente 15% dos pacientes necessitam de tratamento cirúrgico para sua doença (DIGNASS *et al.*, 2012). As indicações mais comuns para cirurgia incluem megacólon tóxico, perfuração, hemorragia incontrolável, falha na terapia médica (ou dependência de corticosteroides), câncer ou displasia. Em pacientes com menos de 70 anos, o tratamento cirúrgico típico é uma proctocolectomia total com ileostomia terminal ou anastomose da bolsa ileal ao canal anal. (BOHL, SOBBA, 2015)

O tratamento da DC depende da gravidade, localização da doença e subtipo de doença (inflamatória, estenosante ou penetrante). (DASSOPOULOUS *et al.*, 2013). A eficácia dos aminossalicilatos na manutenção da remissão clínica em DC foi extensivamente revisada (DIGNASS *et al.*, 2012). Nenhum efeito clínico relevante foi demonstrado, como confirmado em extensas revisões (MOJA *et al.*, 2015). Os 5-ASAs não são recomendados para manutenção de remissão clinicamente induzida na DC (GOMOLLÓN *et al.*, 2017).

Os antibióticos não têm demonstrado eficácia na indução e manutenção da remissão da DC ativa (PRANTERA *et al.*, 1996) e devem ser usados apenas para tratar as complicações supurativas da DC (SHWARTZ *et al.*, 2002).

Os corticoesteroides são usados para induzir remissão, mas não são eficazes na manutenção da remissão (STEINHART *et al.*, 2003). As formulações esteróides que estão disponíveis incluem os corticoesteróides intravenosos, a prednisona, e a budesonida que é menos absorvida sistemicamente (HANAUER, SANDBORN, 2001). Embora o uso da budesonida seja ideal devido ao seu perfil aprimorado de efeitos colaterais, sua eficácia é limitada a DC leve a moderada de íleo e cólon direito (REZAIE *et al.*, 2015).

As tiopurinas (azatioprina e 6-mercaptopurina) são mais comumente usadas para manter a remissão em oposição à indução da remissão (CHANDE *et al.*, 2015). Não agem rapidamente e podem levar aproximadamente 6 a 12 semanas para obter resposta, os corticoesteróides são normalmente usados para induzir remissão e são continuados durante esse período para garantir que o paciente não apresente crise de atividade durante a transição para uma tiopurina (QIU *et al.*, 2015).

O metotrexato pode ser usado tanto para indução de remissão e na manutenção da remissão. Para indução de remissão, apenas a injeção subcutânea foi considerada eficaz (PATEL *et al.*, 2014). O uso de inibidores de TNF (infiximabe, adalimumabe e certolizumabe pegol) é recomendado para induzir remissão em

pacientes com doença de Crohn moderada a grave que não responderam à terapia convencional, como também como terapia de manutenção da remissão.

Os anticorpos monoclonais direcionados contra o TNF- α são agentes anti-inflamatórios potentes e de ação rápida. O infliximab é um anticorpo monoclonal quimérico IgG1 humano-rato administrado por via intravenosa. O adalimumab é um anticorpo monoclonal IgG1 totalmente humanizado administrado por via subcutânea. O certolizumab pegol é um fragmento Fab PEGuilado contra TNF- α . Os inibidores de TNF podem ser usados isoladamente ou em combinação com um imunomodulador para induzir e manter a remissão. (DULAI *et al.*, 2014)

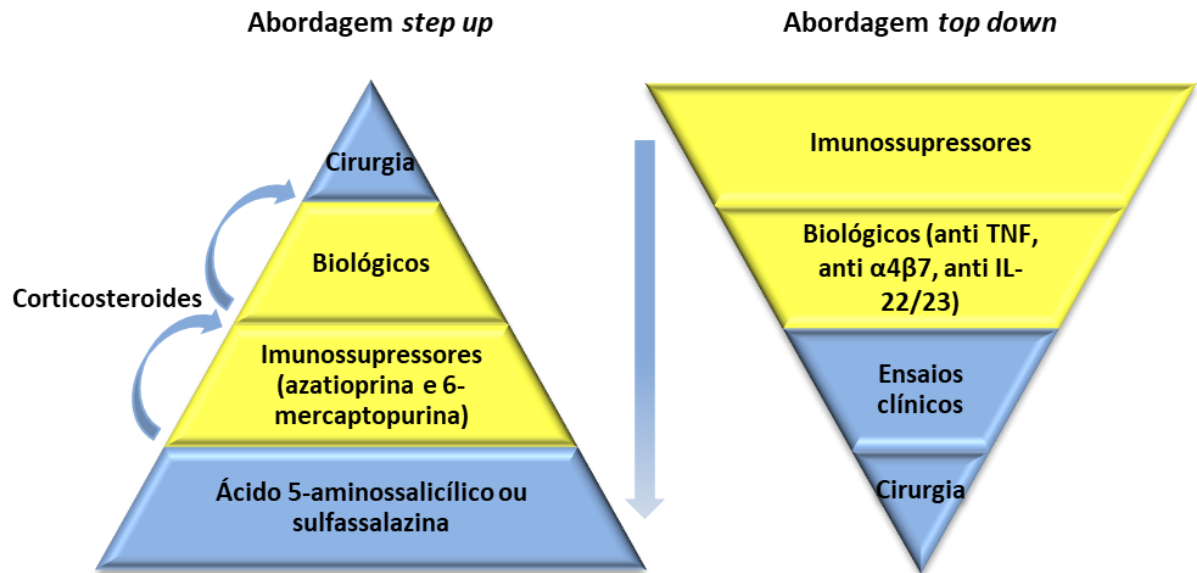
O vedolizumab é um anticorpo monoclonal IgG1 que atua bloqueando a integrina $\alpha 4\beta 7$, resultando em atividade anti-inflamatória seletiva do intestino e é recomendado para indução de resposta e remissão em pacientes com DC moderada a grave com resposta inadequada à terapia convencional e / ou à terapia com inibidor de TNF. (SANDBORN *et al.*, 2013)

O ustekinumab é um anticorpo monoclonal IgG1 que se liga à subunidade p40 compartilhada pelas IL-12 e IL-23 e recomendado para indução de remissão em pacientes com DC luminal ativa moderada a grave que não responderam à terapia convencional e/ou à terapia com inibidor de TNF (FEAGAN *et al.*, 2016).

A terapia convencional de "step up" requer falha de corticosteroides, mesalazina e tiopurinas antes de considerar terapia biológica. No entanto, à medida que os dados referentes à terapia biológica evoluem, há evidências crescentes de que o início precoce biológicos em doenças moderadas a graves - antes da falha da terapia convencional - permite ótimos resultados para o paciente. É provável que exista uma "janela de oportunidade" em que a terapia pode alterar significativamente a progressão da doença por meio de uma abordagem "top down" (BERG, COLOMBEL, UNGARO, 2019). A figura 3 ilustra as abordagens de tratamento *step up* e *top down* nas DII.

A cirurgia é indicada em várias situações incluindo DC estenosante com sintomas obstrutivos, DC fistulizante ou perianal com complicações infecciosas ou problemas relacionados à drenagem da fístula, falha da terapia médica, dependência de esteróides, displasia ou câncer. O procedimento cirúrgico exato depende da indicação subjacente à cirurgia (YAMAMOTO, WATANABE, 2014).

Figura 4 – Abordagens terapêuticas *step up* e *top down*.



Fonte: <https://pregnancy.ibdclinic.ca/ibd-medications-2>

2 JUSTIFICATIVA

As células Treg são fundamentais para a manutenção da tolerância imunológica e prevenção de doença autoimune; suprimem respostas imunes por vários mecanismos e sendo um deles a produção de TGF- β 1 e IL-10. Estas citocinas parecem ter papéis cruciais na manutenção da homeostase no sistema imune intestinal e alterações em seus níveis podem resultar em inflamação intestinal patológica. O fator de transcrição FoxP3 está envolvido tanto na manutenção quantitativa das células Treg como também na sua atividade funcional. Poucos estudos avaliaram a associação das variantes -3279 C>A e -924 G>A do *FOXP3* na suscetibilidade à DII, e nenhum deles na população brasileira. Além disso, não há até o presente momento, estudos que tenham avaliado as variantes -3279 C>A e -924 G>A e os níveis plasmáticos de TGF- β 1 e IL-10 na suscetibilidade e na atividade das DII. Não há também qualquer estudo que tenha avaliado o envolvimento destas variantes em haplótipo com os parâmetros clínicos e laboratoriais.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se as variantes genéticas -924 G>A (rs2232365) e -3279 C>A (rs3761548) do *FOXP3* e os níveis plasmáticos TGF- β 1 e IL-10 estão associados com a suscetibilidade e com a atividade da DII e subgrupos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar os níveis plasmáticos de TGF- β 1 e IL-10 em pacientes com DII e indivíduos controles;
- Determinar a frequência das variantes genéticas -924 G>C (rs2232365) e -3279 C>A (rs3761548) do *FOXP3* em pacientes com DII e controles;
- Associar as variantes genéticas -924 G>C e -3279 C>A e os subgrupos de DII (DC e RCU);
- Avaliar se a combinação em haplótipo das variantes do *FOXP3* pode alterar a suscetibilidade à DII e aos seus subgrupos;
- Analisar se as variantes genéticas, isoladamente ou em haplótipo, estão associadas aos níveis plasmáticos de TGF- β 1 e IL-10 em pacientes com DII.
- Verificar se as variantes genéticas, isoladamente ou em haplótipo, estão associadas à atividade clínica e/ou endoscópica em pacientes com DII.

4 SUJEITOS E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (CAAE. 06405812.1.0000.5231), Parecer CEP/UEL nº 205.175 (Anexo A). Os indivíduos foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e um termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido dos indivíduos envolvidos na pesquisa ou de seus responsáveis (Apêndice A). Este estudo foi conduzido de acordo com as diretrizes estabelecidas na Declaração de Helsinque.

4.2 DELINEAMENTO DO ESTUDO E AMOSTRAGEM

Este é um estudo caso-controle onde foram selecionados 154 mulheres saudáveis atendidas no Hemocentro Regional de Londrina (grupo controle) e 110 mulheres com DII (RCU=60 e DC=50), com idade entre 18 a 70 anos atendidas pelo ambulatório de Gastroenterologia do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário de Londrina, no período compreendido entre junho de 2018 a maio de 2019. Informações referentes a estilo de vida e histórico médico foram obtidas a partir de avaliação clínica de cada paciente (Apêndice B). Foram considerados critérios de exclusão em ambos os grupos os seguintes fatores: presença de outras doenças autoimunes, doenças cardiovasculares, doença renal crônica, doença hepática crônica, neoplasias e doenças infecciosas agudas ou crônicas.

Os diagnósticos de RCU e DC foram realizados de acordo com a avaliação clínica e combinação de investigações endoscópica, histológica e bioquímica conforme proposto pelo terceiro consenso europeu baseado em evidências sobre diagnóstico e manejo da RCU (MAGRO *et al.*, 2017) e da DC (GOMOLLÓN *et al.*, 2017). Na avaliação clínica, foi considerada a presença de sintomas como aumento da frequência e diminuição da consistência das fezes, presença de diarreia mucossanguinolenta, dor abdominal, tenesmo, urgência fecal, associados ou não à presença de febre, fadiga e anorexia; uso prévio de medicamentos (anti-inflamatórios não esteroidais, antibióticos); doenças infecciosas entéricas; história familiar de DC ou RCU e de câncer colorretal; presença de manifestações

extraintestinais (reumatológicas, dermatológicas, oftálmicas, e outras) (MAGRO *et al.*, 2017).

Foi realizado a videocolonosopia com ileoscopia ou videorretossigmoidoscopia (videocolonoscópico EC-250HL5-sistema EPX 2500 Fujinon, Tóquio, Japão) dos pacientes para avaliação da atividade endoscópica da DII, com preparo intestinal prévio com manitol a 20% conforme já realizado de acordo com protocolo do serviço do ambulatório de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas. A videocolonosopia permite visualização direta e biópsia da mucosa de reto, cólon e íleo terminal (SHERGILL *et al.*, 2015). Foram coletados pela biópsia o mínimo de dois fragmentos em, pelo menos, cinco locais diferentes do cólon (incluindo o reto) e fragmentos da mucosa de íleo terminal (MOWAT; BAIN, 2011).

Para a avaliação da atividade clínica da RCU foi utilizado o escore parcial (clínico) de Mayo e o subescore endoscópico de Mayo para a avaliação da gravidade endoscópica da RCU (FAUSEL; KORNBLUTH; DUBINSKI, 2016). Na avaliação da atividade da DC foi utilizado o CDAI para avaliar a atividade clínica (BEST *et al.*, 1976) e para a avaliação endoscópica de atividade da DC foi utilizado o CDEIS (FAUSEL; KORNBLUTH; DUBINSKI, 2016).

Na análise histopatológica, o diagnóstico microscópico da RCU baseou-se na combinação de distorção arquitetural e criptas e atrofia mucosa e presença de infiltrado inflamatório transmucoso difuso com plasmocitose basal, com inflamação ativa com criptite e abscessos de criptas (MAGRO *et al.*, 2017) e da DC baseou-se no encontro de inflamação crônica focal e descontínua, irregularidade focal de criptas e granulomas (não relacionado à lesão de criptas). As mesmas características em adição com irregularidade arquitetural vilosa podem ser utilizadas para as amostras do íleo terminal (GOMOLLÓN *et al.*, 2017).

Como métodos complementares para avaliação da extensão e localização da DC no intestino delgado, foram realizados radiografia contrastada de morfologia de intestino delgado e enterografia por tomografia computadorizada (GOMOLLÓN *et al.*, 2017).

4.3 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

Após jejum de 12 horas, os indivíduos (pacientes e controles) foram submetidos à coleta de 10mL de sangue venoso com ácido etilenodiamino tetra-

acético (EDTA). O material foi centrifugado a 3.000 r.p.m. por 15 minutos e alíquotas de plasma e *buffy-coat* foram armazenadas no *freezer* a -80°C até o momento das análises quando as amostras não eram analisadas no mesmo dia.

4.4 DOSAGEM DE CITOCINAS

Os níveis plasmáticos das citocinas TGF- β 1 e IL-10 foram determinados por imunofluorimetria utilizando *Kit ProcartaPlex Human High Sensitivity (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Viena, Austria)* para a plataforma Luminex[®] utilizando o equipamento MAGPIX[®] (*Luminex Corporation, Austin, TX, USA*). Os resultados foram expressos em pg/mL.

4.5 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA genômico a partir das amostras de sangue periférico, foi realizada pelo método de separação em coluna, com reagentes comercialmente disponíveis (*PureLink Genomic DNA, Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*), e de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. As amostras de DNA foram quantificadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop 2000c[™] (*ThermoScientific, Waltman, MA, USA*) a 260nm e a pureza foi avaliada pela razão 260/280nm.

4.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA AS VARIANTES RS3332365 E RS3761548 DO GENE *FOXP3*

Aproximadamente 100 ng de DNA foram utilizados para amplificar o fragmento de 249 pares de base (pb) (rs2232365) e 155 pb (rs3761548) do gene *FOXP3*, utilizando a PCR de acordo com os protocolos descritos na literatura, com algumas modificações (BANIN HIRATA et al., 2017). Os *primers* utilizados para a amplificação das sequências de 249pb e 155pb do gene *FOXP3*, foram sintetizados de acordo com a sequência depositada no *GenBank* sob número NT_0073921. Para a variante rs2232365, o *primer forward* é formado pela sequência 5' AGG AGA AGG AGT GGG CAT TT 3' e o *primer reverse* é formado pela sequência 5' TGT GAG TGG AGG AGC TGA GG 3' (Paradowska-Gorycka et al., 2015). Enquanto que para a variante rs3761548, o *primer forward* é formado pela sequência 5' GGC AGA GTT

GAA ATC CAA GC 3' e o *primer reverse* é formado pela sequência 5' CAA CGT GTG AGA AGG CAG AA 3' (He *et al.*, 2013).

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25µL, contendo 0,25µM de cada *primer*, 1,50 mM de MgCl₂, 0,10mM de dNTP (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*), 1,25U da enzima DNA polimerase recombinante diluída em seu tampão 1X (20mM de Tris-HCl pH: 8,4; 50mM de KCl) (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*), e 100ng da amostra de DNA. A reação de amplificação foi realizada em termociclador (*Applied Biosystems Veriti™ 96-well Thermal Cycler, Life Technologies, Foster City, CA, USA*), com um ciclo de desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C; seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturação, para o anelamento 30 segundos a 59°C para o rs2232365 ou 30 segundos a 65°C para o rs3761548 e 30 segundos a 72°C para extensão; e 10 minutos a 72°C para a extensão final. Todas as reações foram realizadas com um controle negativo (ausência de DNA) para assegurar a não contaminação com ácidos nucleicos.

Para a análise da amplificação do gene *FOXP3*, 5 µL do produto por PCR e 5 µL do corante xileno cianol (XC) foram aplicados em gel de poli(acrilamida) 10%. Em cada eletroforese foi incluído o controle negativo, com ausência de DNA e o *ladder* de 50pb (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) para determinar o tamanho do fragmento de DNA amplificado. A eletroforese foi realizada a 100 V por 60 minutos com posterior coloração do gel com nitrato de prata.

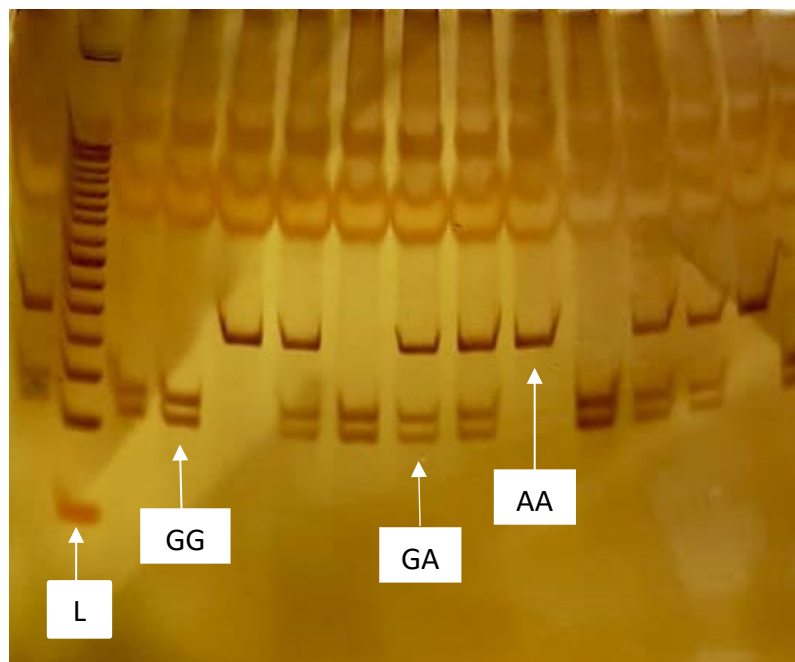
4.7 POLIMORFISMO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP) PARA A VARIANTE RS2232365

A partir dos produtos de amplificação da PCR, foi realizada a digestão enzimática com a enzima de restrição *Esp3I* (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Cinco microlitros do produto da PCR foram completamente digeridos com 10U/µL de enzima *Esp3I overnight* a 37°C em termobloco. Os produtos da digestão enzimática foram analisados por eletroforese em gel de poli(acrilamida) 10%. A análise dos fragmentos permitiu a identificação dos três genótipos da variante estudada (Figura 5).

- AA representa o genótipo em homozigose sem o sítio de restrição, apresentando somente um fragmento com 249 pb.

- GA representa o genótipo em heterozigose, contendo três fragmentos na eletroforese, com 132 pb e 117 pb (provenientes da clivagem do sítio de restrição presente no alelo G) e 249 pb (proveniente do alelo A que não sofre a ação da enzima).
- GG representa o genótipo com homozigose para o sítio de restrição e apresenta dois fragmentos com 132 pb e 117 pb.

Figura 5– Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, para caracterização dos genótipos do rs2232365 FOXP3 -924 G>A.



Fonte: Próprio autor. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% após coloração com nitrato de prata caracterizando os três genótipos após a digestão com a enzima de restrição *Esp3I*. L: *ladder* de DNA com 50 pb; genótipo AA (presença de um único fragmento com 249pb); genótipo GG (presença de dois fragmentos com 132 e 117pb); genótipo GA (presença de três fragmentos com 249, 132 e 117pb).

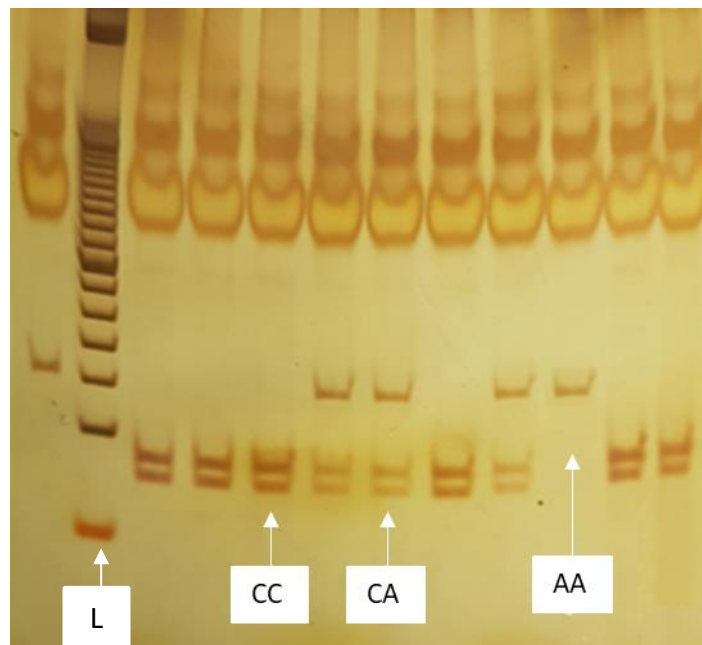
4.8 POLIMORFISMO DE FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (RFLP) PARA A VARIANTE RS3761548

A partir dos produtos de amplificação da PCR, foi realizada a digestão enzimática com a enzima de restrição *PstI* (*Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*). Cinco microlitros do produto da PCR foram completamente digeridos com 10U/μL de enzima *PstI overnight* a 37°C em termobloco. Os produtos da digestão enzimática foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida

10%. A análise dos fragmentos permitiu a identificação dos três genótipos da variante estudada (figura 6).

- CC representa o genótipo com homozigose para o sítio de restrição e apresenta dois fragmentos com 75 pb e 80 pb.
- CA representa o genótipo em heterozigose, contendo três fragmentos na eletroforese, com 75 pb e 80 pb (provenientes da clivagem do sítio de restrição presente no alelo C) e 155 pb (proveniente do alelo A que não sofre a ação da enzima).
- AA representa o genótipo em homozigose sem o sítio de restrição, apresentando somente um fragmento com 155 pb.

Figura 6- Perfil eletroforético em gel de poliacrilamida, para caracterização dos genótipos do rs3761548 FOXP3 -3279 C>A.



Fonte: Próprio autor. Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% após coloração com nitrato de prata caracterizando os três genótipos após a digestão com a enzima de restrição *PstI*. L: *ladder* de DNA com 50 pb; genótipo AA (presença de um único fragmento com 155 pb); genótipo CC (presença de dois fragmentos com 80 e 75 pb); genótipo CA (presença de três fragmentos com 155, 80 e 75pb).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise de tabelas de contingência (X^2 ou Teste exato de Fisher) para avaliar a associação entre variáveis categóricas e os grupos de pacientes. Para analisar as diferenças entre as variáveis contínuas, foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Variáveis categóricas foram expressas em número absoluto (n) e porcentagem (%) e as variáveis contínuas foram expressas como mediana e percentis (25%-75%). O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para avaliar a normalidade da distribuição. TGF- β 1 e IL-10 foram transformadas em logaritmo natural (Ln) para garantir a normalidade dos dados.

A associação entre as variantes genéticas do *FOXP3* foi analisada em modelos alélico, dominante, codominante e recessivo. A inferência dos locais de recombinação entre os alelos do *FOXP3* foi determinada usando-se o *software* PHASE versão 2.1.1, atribuindo cada haplótipo com probabilidade máxima (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001; STEPHENS; SCHEET, 2005). O equilíbrio de Hardy-Weinberg e a estimativa do desequilíbrio de ligação por pares foi realizada no *software Haploview* versão 4.2. O desequilíbrio de ligação por pares entre os SNVs foi fornecido descrevendo o valor D e o quadrado do r. Análise de regressão logística binária ou multinomial foi realizada para avaliar o efeito das variantes genéticas no grupo de estudo e foram determinados *Odds ratio* (OR) relacionado e intervalo de confiança (IC) de 95%. Os resultados foram ajustados pelas variáveis confundidoras idade, etnia, índice de massa corpórea (IMC) e tabagismo.

Para todos os testes estatísticos, foi considerado nível de significância quando $p < 0,05$. Análises estatísticas foram realizadas usando SPSS IBM Windows versão 24 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

5 RESULTADOS

Estão demonstrados no artigo científico intitulado ***FOXP3 variants and haplotype structures are associated with inflammatory bowel disease and transforming growth factor β 1 plasma levels*** que será submetido ao periódico *Molecular Immunology*.

5.1 ARTIGO

***FOXP3* variants and haplotype structures are associated with inflammatory bowel disease and transforming growth factor β 1 plasma levels.**

Abstract

Introduction: Genetic variants of transcription factor Forkhead Box Protein 3 (FoxP3) influence protein expression and function, reducing T regulatory (Treg) cell activity and leading to autoimmunity development. **Objective:** To evaluate the *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and -3279 C>A (rs3761548) variants and their individual and haplotype associations with Inflammatory bowel disease (IBD) susceptibility, clinical and endoscopic activity, and interleukin 10 (IL-10) and transforming growth factor-beta (TGF- β 1) levels. **Subjects and Methods:** The study included 110 IBD female patients, 60 with ulcerative colitis (UC) and 50 with Crohn's disease (CD), and 154 female controls. **Results:** AA genotype of rs2232365 and rs3761548 was associated with higher susceptibility to CD (OR: 3.147, 95% CI: 1.015–9.758, $p=0.047$) and the UC (OR: 3.221, 95% CI: 1.050–9.876, $p=0.041$), respectively. However, *FOXP3* variant genotypes were not associated with TGF- β 1 and IL-10 plasma levels, and endoscopic/clinical activity disease score. The GAGA haplotype was associated with IBD (OR: 4.003, 95% CI: 1.100–14.56, $p=0.035$) and UC susceptibility (OR: 6.107, 95% CI: 1.609–23.18, $p=0.008$), but not with CD. In addition, IBD patients with the GAGA haplotype had lower TGF- β 1 plasma levels ($p=0.041$) than other haplotypes structures. Moreover, G/C haplotype (dominant model) had protective effect of 60% in the susceptibility to CD and lower Endoscopic Severity Index for CD than other haplotypes. **Conclusion:** These results suggest that *FOXP3* variants could exert a role in the Treg, which could be one of the factors involved in the susceptibility and pathogenesis of IBD.

Keywords: Inflammatory bowel diseases, Ulcerative Colitis, Crohn's Disease, Transforming growth factor β 1, rs2232365, rs3761548.

Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) is an immune-mediated chronic inflammatory disorder of the gastrointestinal tract. The two major clinical phenotypes of IBD are ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Both diseases are associated with significant morbidity and have a major impact on an individual's quality of life (Maaser *et al.*, 2019). Although the exact etiology of IBD is not yet clearly understood, it is well known that the genetic predisposition and the immunological imbalance have been implicated in the cause of this disorder (Khor *et al.*, 2011; Ananthakrishnan *et al.*, 2018).

Genetics and immunology evidences have clarified that the innate and adaptive immune responses are equally important in inducing intestinal inflammation. About adaptive immune response, besides T helper cell type (Th)1 and Th2 immune responses, other subsets of T cells, namely Th17 and regulatory T (Treg) cells, are likely to play a role in IBD (Geremia *et al.* 2014; Zundler and Neurath, 2015). Th2 cells and their cytokines are believed to be predominantly involved in UC pathogenesis, while Th1 cells are thought to play a major role in CD and Th17 cells are implicated in both conditions. On the other hand, Treg cells have important protective functions in the context of intestinal mucosal inflammation (Zundler and Neurath, 2015). Treg cells suppress effector T cell responses by producing the pleiotropic cytokines transforming growth factor-beta (TGF- β) and interleukin (IL)-10, which are dominantly viewed as critical mediators for tolerance and immunosuppression (Wan and Flavell, 2007; Huber *et al.*, 2011).

The forkhead box protein 3 (FoxP3), a member of the transcription factor winged-helix family, is a crucial regulator of CD4⁺ CD25⁺ Treg cells development and function (Walker *et al.*, 2003). The human *FOXP3* gene is located on the short arm of chromosome X (Xp11.23) and variants in this gene may influence protein expression and function, reducing Treg cell activity and leading to autoimmunity development (Shen *et al.*, 2010). The *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and -3279 C>A (rs3761548) are single-nucleotide variants (SNV) in the promoter region, in which the A allele of both variants is associated with diminished *FoxP3* expression (Beiranvand *et al.*, 2017; Shen *et al.*, 2010). Furthermore, different SNVs in the promoter region of *FOXP3* have been

associated with the susceptibility and prognosis of autoimmune diseases, such as multiple sclerosis (Flauzino *et al.*, 2019), rheumatoid arthritis (Hashemi *et al.*, 2018), psoriasis (Gao *et al.*, 2010), and systemic sclerosis (D'Amico *et al.*, 2013).

Until now, few studies evaluated the *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) variants in UC (Xia *et al.*, 2019a) and CD (Park *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2019b), but none in IBD. In addition, there are no studies that evaluated TGF- β 1 and IL-10 plasma levels according to these *FOXP3* genotypes or haplotypes. Moreover, until now, there is no information about the association between those variants and score activity disease. Thus, this study aimed to evaluate the *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) variants and their individual and haplotype associations with IBD susceptibility, clinical and endoscopic activity, as well as with TGF- β 1 and IL-10 plasma levels in female patients with UC and CD.

Subjects and Methods

Study Subjects

From July 2018 to May 2019, a total of 110 female patients with IBD (UC=60 and CD=50), were recruited from the Gastroenterology Outpatient of the State University of Londrina, Londrina, Paraná, South Brazil. The diagnosis of IBD was established according to clinical evaluation and combination of endoscopic, histological, radiological and biochemical investigations as proposed in the 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and Management of UC (Magro *et al.*, 2017) and CD (Gomollón *et al.*, 2017). In addition, a total of 154 female controls were selected among blood donors of the Regional Blood Bank of Londrina, from the same geographic region of the IBD patients. None of the participants in the study presented other autoimmune diseases, acute or chronic infectious diseases, heart, thyroid, kidney, hepatic, or oncologic diseases.

Demographic, epidemiological and anthropometric data (for patients and controls), as well as clinical history, symptoms, and the treatment before the inclusion in this study (for patients) were obtained using a standard questionnaire at the admission

of the individuals. Briefly, body mass index (BMI) was calculated as weight (kg) divided by height (m) squared and the ethnicity was self-reported as Caucasian and non-Caucasian (BRAZIL, 2011; Suarez-Kurtz *et al.*, 2012)

The protocol was approved by the Institutional Research Ethics Committees of the University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE: 91833018.2.0000.5231) and all of the individuals invited were informed in detail about the research and gave written informed consent.

Clinical and endoscopic examinations

In UC patients, the clinical activity was evaluated by Partial Mayo Index Score and categorized as remission (<2), mild activity (2-4), moderate (5-7), and severe (>7) (Fausel *et al.*, 2016). In CD patients, the clinical activity was assessed by Crohn's Disease Activity Index (CDAI) and the results were classified according to the activity status: remission (≤ 150), mild (151-219), moderate (220-450), and severe or very severe activity (>450) (Best *et al.* 1976).

The colonoscopies were performed by an experienced gastroenterologist with Fujifilm endoscope (EC-250HL5-system EPX 2500 Fujinon, Minato-Ku, Tokyo, Japan) and immediately after the procedure, the findings were graded according to both Mayo endoscopic score for UC and Crohn's disease endoscopic index of severity (CDEIS) for CD. The inflammatory severity within the intestine determined by Mayo was classified in remission (0), mild activity (1), moderate (2), and severe (3) (Fausel *et al.*, 2016) and, according to CDEIS values, as remission (<3), mild (3-8), moderate (9-12), and severe (>12) (Mary and Modigliani, 1989). Based on their MAYO and CDEIS values, patients were divided into two groups of endoscopic activity: remission/mild (MAYO ≤ 1 or CDEIS ≤ 8) and moderate/severe (MAYO > 1 and CDEIS > 8) for statistical analysis (Gomollón *et al.*, 2017).

Blood Collection and Immunological Biomarkers

After fasting for 12 h, venous blood samples were obtained with anticoagulant ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), centrifuged at 3000 rpm for 15 min; further, plasma and buffy-coat were separated, divided into aliquots and stored at -80°C until thawed for assays. The IL-10 and TGF- β 1 plasma levels were determined using microspheres multiplex immunofluorimetric assay (Procarta Plex High Sensitivity Assay by Thermo Fisher Scientific, Vienna, Austria) for Luminex platform (MAGPIX™, Luminex Corp., Austin, TX, USA), that was performed according to the manufacturer's instructions.

Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from a buffy-coat of peripheral blood cells using a resin column procedure for *FOXP3* genotyping, (PureLink Genomic DNA, Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's recommendations. The DNA concentration was measured with a NanoDrop 2000c™ spectrophotometer (ThermoScientific, Waltman, MA, USA) at 260nm and purity was assessed by measuring the 260/280nm ratio.

FOXP3 genetic variant genotyping

Two SNV in the promoter region of the *FOXP3* gene located on chromosome X were genotyped: -924 G>A (rs2232365) at position 49259426 and -3279 C>A (rs3761548) at position 49261784 according to listed in the international single nucleotide polymorphism (SNP) database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>).

Polymerase chain reaction (PCR) followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis was used to detect the rs2232365 and rs3761548 SNV, according to GenBank Accession number NG_007392.1, as previously reported by Banin Hirata *et al.*, 2017 with some modifications. For rs2232365 genotyping, the following primers were used: 5'-AGG AGA AGG AGT GGG CAT TT-3' (forward) and 5'-

TGT GAG TGG AGG AGC TGA GG -3' (reverse), according to Paradowska-Gorycka *et al.*, 2015. The rs3761548 genotyping was performed with the following primers: 5'-GGCAGAGTTGAAATCCAAGC-3' (forward) and 5'-CAACGTGTGAGAAGGCAGAA-3' (reverse), according to He *et al.*, 2013. All reactions were performed with negative control (without a DNA sample). The PCR products of rs2232365 [249 base pairs (bp)] were digested overnight at 37°C with *Esp3I* restriction endonuclease (Invitrogen™, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), generating two fragments of 132 bp and 117 bp corresponding to G allele, while the A allele that did not undergo enzymatic cleavage and remained with 249 bp. PCR products (155 bp) of rs3761548 were digested with *PstI* restriction endonuclease (Anza™, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), which generated two fragments, 80 bp and 75 bp, that correspond to C allele, while the A allele remained with 155 bp. All PCR-RFLP products were analyzed using 10% polyacrylamide gel and stained with silver nitrate.

Statistical Analysis

Analysis of contingency tables (χ^2 or Fisher's exact test) were employed to evaluate the associations between categorical variables and diagnostic groups. The Kolmogorov-Smirnov test was used to assess the normality of distribution. TGF- β 1 plasma levels were transformed into natural logarithm (Ln) to ensure data normality. We assessed the differences in other continuous variables between groups using the Mann-Whitney test. The results were adjusted by extraneous variables using binary logistic regression. Categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%) and continuous variables were expressed as median and percentiles (25%-75%).

The association between *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) were tested in four different models: the allelic model, codominant model (heterozygotes or variant homozygotes *versus* major allele homozygotes), dominant model (heterozygotes and variant homozygotes *versus* major allele homozygotes), and recessive model (variant homozygotes *versus* major allele homozygotes and

heterozygotes). The Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was calculated in both groups (female patients and female controls).

Inference of recombination sites between *FOXP3* alleles were determined using the PHASE software version 2.1.1 by assigning each haplotype with maximum probability (Stephens et al. 2001; Stephens and Scheet 2005).

The estimation of pairwise linkage disequilibrium was performed in Haploview software version 4.2. by describing D and r-squared value. Binary or multinomial logistic regression analysis was performed to assess the effect of the genetic variants in the study group and related odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI) were determined. For all statistical tests ($p < 0.05$) considered as the significant level. Statistical analyses were performed using IBM SPSS windows version 24 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

Results

Characteristics of the subjects

IBD patients and controls did not differ in ethnicity ($p = 0.227$) and smoking ($p = 0.432$). However, IBD patients was older [median = 50 years (38–56) *versus* median = 36 years (28–44), $p < 0.001$] and had higher BMI [median = 26.6 kg/m² (22.9–29.5) *versus* 23.9 kg/m² (21.7–27.1), $p = 0.005$] than controls (data not shown).

Table 1 shows the endoscopic and clinical characteristics of IBD patients according to the disease (UC and CD). Endoscopic activity evaluated by MAYO in UC patients demonstrated that 26 (43.3%) were in remission, 10 (16.7%) in mild, 17 (28.3%) in moderate, and 11 (11.7%) in severe activity. Clinical activity score showed that 34 (56.7%) UC patients were in remission, 22 (36.7%) had mild, 3 (5.0%) moderate, and 1 (1.7%) severe activity. In CD patients, endoscopic activity evaluated by CDEIS demonstrated that the most of patients, 31 (62.0%) were in remission, while 8 (16.0%) had mild, 5 (10.0%) moderate, and 6 (12.0%) severe activity. According to clinical disease activity, 30 patients (60.0%) were in remission, 19 (38.0%) had mild, and 1

(2.0%) moderate activity. None of the CD patients had severe or very severe clinical activity (CDAI >450).

Regarding to treatment, most of UC female patients, 55 (91.7%), were treated with aminosalicylates (Sulfasalazine or 5-aminisalicylic acid), 8 (13.3%) with corticosteroids, 11 (18.3%) with TNF- α inhibitors, and 17 (28.3%) with azathioprine or methotrexate. Most of CD female patients, 34 (68.0%), were in treatment with azathioprine or methotrexate, 30 (60.0%) patients were treated with TNF- α inhibitors, 9 (18.0%) with aminosalicylates, and only 5 (10.0%) were in treatment with corticosteroids.

FOXP3 genotype and IBD susceptibility

Table 2 shows the *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) allelic and genotype frequency in different genetic models among patients with IBD and controls. Case-control analysis was performed to assess the influence of *FOXP3* genetic variants on IBD susceptibility. The HWE was observed among the of rs2232365 and rs3761548 genotype frequency ($p>0.05$). However, the HWE was not observed in the rs3761548 in control group ($p=0.034$).

The *FOXP3* -924 G>A rs2232365 did not differ in patients with IBD and UC in comparison to controls. In CD patients, the presence of AA genotype in the codominant model was higher compared to controls, 11 (22.0%) *versus* 26 (17.1%), respectively (OR 3.147, 95% CI 1.015–9.758, $p=0.047$). Furthermore, there was a statistic trend toward an association of the presence of A allele of rs2232365 and CD ($p=0.056$). Regarding to *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548), the frequency of the genotypes did not differ in patients with IBD and CD in comparison to controls. In UC patients, the presence of AA genotype in the recessive model was higher compared to controls, 11 (18.3%) *versus* 8 (5.2%), respectively (OR 3.221, 95% CI 1.050–9.876), $p=0.041$), also, there was a statistic trend toward an association of the presence of AA genotype in the codominant model and UC ($p=0.053$). All the results were adjusted by age, ethnicity, BMI, and smoking.

FOXP3 haplotype structures and IBD susceptibility

Four possible haplotype combinations from rs2232365 and rs3761548 were investigated in our study: A/C, A/A, G/C, and G/A. The linkage disequilibrium between *FOXP3* rs2232365 and rs3761548 showed that those SNV are not good surrogate markers for each other due to the low correlation coefficient presented ($D'=0.983$; $r^2=0.386$); therefore, it is important to assess their combined effects.

In the association study of *FOXP3* haplotypes, the following models were analyzed: A/C dominant (A/C carriers *versus* A/A, G/C, and G/A carriers), A/C recessive (A/C carriers *versus* A/A, G/C, and G/A carriers), G/C dominant (G/C carriers *versus* A/C, A/A, and G/A carriers), G/C recessive (G/C carriers *versus* A/C, A/A, and G/A carriers), G/A dominant (G/A carriers *versus* A/C, A/A, and G/C carriers), and G/A recessive (G/A carriers *versus* A/C, A/A, and G/C carriers). The A/A combination and the G/C recessive haplotype were rare (<5.0%) and were excluded from the analysis. The predominant haplotype was A/C while the less frequent haplotype was A/A in our patient cohort.

Table 3 shows the distribution of *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) haplotypes among patients with IBD and controls from Brazilian population. We found an association between the G/A recessive haplotype with IBD (OR 4.003, 95% CI 1.100 – 14.56, $p=0.035$) and UC (OR 6.107, 95% CI 1.609 – 23.18, $p=0.008$) adjusted by age, sex, ethnicity, BMI, and smoking. However, this association was not found in CD patients (OR 2.215, 95% CI 0.303 – 16.20, $p=0.433$). On the other hand, we found a protective effect of the G/C haplotype in the dominant model with CD patients (OR 0.432, 95% CI 0.196 – 0.951, $p=0.037$) adjusted by age, sex, ethnicity, BMI, and smoking, but not with IBD ($p=0.088$) and UC ($p=0.494$).

Cytokines plasma levels and FOXP3 genetic variants

IBD, as well, UC and CD patients showed higher levels of TGF- β 1 and IL-10 than controls (Figure 1). All results of figure 1 were adjusted by age, ethnicity, BMI and smoking. However, TGF- β 1 and IL-10 plasma levels did not differ according to *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and -3279 C>A (rs3761548) genotypes (dominant and recessive

models) in IBD, as well as among the UC and CD patients, and controls (data not shown).

The plasma levels of TGF- β 1 and IL-10 according to *FOXP3* -924 G>A and *FOXP3* -3279 C>A haplotype structures in IBD patients are shown in Figure 2. IBD patients with the GAGA haplotype (G/A recessive haplotype) had lower TGF- β 1 plasma levels ($p=0.041$) than other haplotypes (A/C, A/A or G/C carriers), after adjusted by age, ethnicity, BMI, and smoking. However, TGF- β 1 plasma levels did not differ when we analyzed UC and CD separately (Figure 2A). TGF- β 1 plasma levels also did not differ in IBD, UC and CD according to the G/C dominant haplotype model (Figure 2B). In addition, IL-10 plasma levels also did not differ according to *FOXP3* haplotype models in IBD, as well as among the patients with UC and CD (Figure 2C and 2D, respectively). In control group, cytokine plasma levels did not differ according to *FOXP3* haplotype structures (data not shown).

FOXP3 genetic variants and IBD clinical and endoscopic activity

Regarding to endoscopic and clinical activity, we did not find association between the *FOXP3* -924 G>A and *FOXP3* -3279 C>A genotypes (dominant and recessive models) and disease activity in UC and CD patients (data not shown). Moreover, when we analyzed those variants in haplotypes, no significant association was found between GAGA haplotype and Mayo endoscopic and partial Mayo score in UC patients (Figure 3A and 3B, respectively). However, we found that CD patients with G/C haplotype (dominant model) had diminished CDEIS score ($p=0.035$, Figure 3C) and higher frequency of patients ($p=0.046$) in remission/mild activity (CDEIS <8) (data not shown). In addition, G/C haplotype structure (dominant model) was not associate with clinical activity evaluated by CDAI (Figure 3D).

Discussion

The main findings of the present study were that the AA genotype of *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) was associated with a 3-fold chance of developing CD than other genotypes, while the AA genotype of *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) was associated with a 3-fold chance of developing UC than other genotypes. However, *FOXP3* variant genotypes (dominant and recessive models) were not associated with TGF- β 1 and IL-10 plasma levels as well as endoscopic/clinical activity disease score. In addition, we found an association between the GAGA haplotype with IBD and UC, but not with CD. IBD patients with the GAGA haplotype had 6-fold higher chance to develop UC and lower TGF- β 1 plasma levels than other haplotype structures. Moreover, G/C haplotype (dominant model) showed a protective effect of 60.0% in the susceptibility to CD and lower CDEIS endoscopic score than other haplotypes.

FoxP3 is the most specific and reliable biomarker of Treg cells and is essential for driving CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg cell function (Fontenot *et al.*, 2003). Previous studies demonstrated that variations in *FOXP3* may cause immune response impairment and contribute to autoimmune disease development (Gao *et al.*, 2010; D'Amico *et al.*, 2013; Flauzino *et al.*, 2019). The association between *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) variant with CD susceptibility in the present study suggest a functional defect on Treg in patients with the AA genotype. The G>A substitution is located in a putative-binding site for the transcription factor GATA-3 (Wu *et al.*, 2012). This transcription factor binds to the promoter region of *FOXP3* to inhibits its expression only when the A allele is present. To occur *FOXP3* expression, GATA-3 must be removed from the promoter region (Maruyama *et al.*, 2011). So, GG carriers lose their GATA-3-binding site, enabling *FOXP3* gene transcription. Previous studies failed to find any association of *FOXP3* -924 G>A with CD susceptibility in female patients (Park *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2019b). The inconsistent result observed in this previously reported study may be also explained by differences in the cohort ethnicity.

Our data also demonstrated that AA genotype of the *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) variant confers 3-fold more chance to development UC. This result could suggest a functional defect on Treg in patients with the AA genotype. Similarly, other

study found an association between the *FOXP3* -3279 C>A variant and UC in the Chinese population (Xia *et al.*, 2019a). Also, these authors showed that female patients with the AA genotype have decreased expression of FoxP3 mRNA and protein compared to CC genotype. The presence of the A allele alters the promoter region and consequently, there is a loss of binding of some transcription factors, such as E47 and C-Myb, leading to defective transcription of *FOXP3* (Shen *et al.*, 2010), and therefore, might affect the function or quantity of Tregs (Hoogendoorn *et al.*, 2003). Regarding to CD female patients, we did not find an association between the *FOXP3* -3279 C>A variant and CD susceptibility. Our results are in agreement with previous studies that also did not demonstrate this association in CD female patients (Park *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2019b).

Genetic variants do not exert great influence by itself and the analysis in combination is better to understand the role of *FOXP3* variants in IBD. Thus, we investigated the haplotype structures of *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) variants. We demonstrated an association between the G/A haplotype in the recessive model (GAGA carriers), with IBD and UC, but not with CD. Furthermore, we found that the susceptibility to UC in haplotype was 2-fold higher than in genotype analysis. On the other hand, the G/C haplotype (dominant model) showed a protective effect on CD female patients.

In addition, we found higher TGF- β 1 and IL-10 plasma levels in patients with IBD, UC, and CD than in control group. Our data are in agreement with previous studies that also demonstrated higher TGF- β 1 plasma levels in UC (Wiercińska-Drapała *et al.*, 2001) and CD (Kiernan *et al.*, 2020). Moreover, Kiliç *et al.* (2009) suggested that TGF- β 1 could be used as a marker for differential diagnosis of active UC. TGF- β 1 has several important functions in the pathogenesis of IBD that include control of epithelial cells proliferation and differentiation, immunosuppression and regulation of extracellular matrix formation. TGF- β 1 inhibits proliferation and stimulates differentiation of epithelial cells that aids in the repair process of the mucosa following the damage (Beck and Podolsky, 1999).

IL-10 is an anti-inflammatory cytokine produced by Treg, macrophages M2 and other cells to modulate the inflammatory response (Wan and Flavell, 2007). The higher

IL-10 plasma levels demonstrated in our study in IBD patients (UC and CD) than controls are also in agreement with other studies carried out in UC patients (Szkardkiewicz *et al.*, 2009; Rodríguez-Perlvárez *et al.*, 2012; Korolkova *et al.*, 2015; Kiernan *et al.*, 2020) but not in CD patients (Szkardkiewicz *et al.*, 2009; Korolkova *et al.*, 2015, Kiernan *et al.*, 2020).

IL-10 acts directly on Treg cells to maintain FoxP3 expression and their suppressive capacity (Murai *et al.*, 2009), as well as on antigen-presenting cells (Fiorentino *et al.*, 1991). Moreover, infliximab treatment (a TNF- α inhibitor) could increase TGF- β 1 and IL-10 serum levels in CD patients (Sabatino *et al.*, 2010). In this study, 60.0% of CD patients used TNF- α inhibitor. Thus, our data suggested that elevated TGF- β 1 and IL-10 plasma levels could be related to inflammation activity and therapy response, and could represent compensatory mechanisms involved in mucosal healing.

Furthermore, in the present study, the *FOXP3* variants evaluated could alter the TGF- β 1 and IL-10 levels. IBD patients with GAGA haplotype (recessive model) showed diminished TGF- β 1 plasma levels, but not IL-10, compared to other haplotype structures. However, when we evaluated the *FOXP3* -924 G>A and -3279 C>A genotypes individually, in the dominant and recessive models, we did not find an association between them and the plasma levels of TGF- β 1 and IL-10. Our data suggested that GAGA haplotype could interfere in the Treg cell function by decreasing *FOXP3* expression, and consequently decreasing the TGF- β 1 levels. Studies support the role of TGF- β 1 as a negative regulator of mucosal inflammation and indicate that defective production/activity of this cytokine can lead to the development of or exacerbate colitis (Kulkarni and Karlsson, 1993; Monteleone *et al.*, 2008). We did not find an association between *FOXP3* genetic variants and IL-10 plasma levels, which could be explained by the fact of many other cell types can produce this cytokine and IL-10 plasma levels can be affected by genetic variants in *IL10* (Ouyang *et al.*, 2011, Trifunović *et al.*, 2015, Bank *et al.*, 2014).

Regarding to endoscopic and clinical disease activity, the G/C dominant haplotype model was associated with diminished endoscopic activity evaluated by CDEIS. However, when we evaluated the *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and *FOXP3* -

3279 C>A (rs3761548) genotypes individually, in the dominant and recessive models, we did not find an association between them and endoscopic/clinical disease activity scores. We hypothesize that the benefic effect of G/C dominant haplotype model in CD development and endoscopic activity can be due to the presence of G allele of *FOXP3* -924 G>A and the A allele of *FOXP3* -3279 C>A, as both were associated with higher *FOXP3* expression. Furthermore, the complex interaction between *FOXP3* haplotype structures/genotypes and plasma levels of TGF- β 1 and IL-10, as well as endoscopic/clinical disease activity scores in IBD female patients, deserves further investigation.

Some limitations of this study should be considered. First, this is a case-control design, which does not allow inferences a causal relationship; second, the ethnicity of patients and controls was self-reported and third, we evaluate the *FOXP3* variants only in females. However, this study has some strength, such as the adjusted results for many confounding variables.

In conclusion, this is the first study to demonstrate the association between *FOXP3* variants (rs2232365 and rs3761548) in female Brazilian patients with IBD and these results suggest that *FOXP3* variants, individually or in haplotype structures, could exert a role in the Treg cell function, which could be one of the factors involved in the susceptibility and pathogenesis of IBD in females.

References

ANANTHAKRISHNAN, A.N.; BERNSTEIN, C.N.; ILIOPOULOS, D. *et al.* Environmental triggers in IBD: A review of progress and evidence. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v.15, p.39–49, 2018.

ASSEMAN, C.; MAUZE, S.; LEACH, M.W. *et al.* An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. **Journal of Experimental Medicine**, v.190, p.995–1003, 1999.

BABYATSKY, M.W.; ROSSITER, G.; PODOLSKY, D.K. Expression of transforming growth factors α and β in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.110, p.975–984, 1996.

BANIN HIRATA, B.K.; LOSI GUEMBAROVSKI, R.; VITIELLO, G.A.F., *et al.* *FOXP3* Allelic Variants and Haplotype Structures Are Associated with Aggressive Breast Cancer Subtypes. **Disease Markers**, v. 2017, p.1-8, 2017.

BANK S, SKYTT ANDERSEN P, BURISCH J, *et al.* Polymorphisms in the Inflammatory pathway genes *TLR2*, *TLR4*, *TLR9*, *LY96*, *NFKBIA*, *NFKB1*, *TNFA*, *TNFRSF1A*, *IL6R*, *IL10*, *IL23R*, *PTPN22*, and *PPARG* are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish cohort. **PLoS One**, v.9, n.6, p.1-10, 2014.

BECK, P.L.; PODOLSKY, D.K. Growth factors in inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.5, p.44–60, 1999.

BEIRANVAND, E.; ABEDIANKENARI, S.; KHANI, S. *et al.* G allele at -924 A > G position of FoxP3 gene promoter as a risk factor for tuberculosis. **BMC Infectious Diseases**, v.17, p.4–9, 2107.

BEST, W.R.; BECKTEL, J.M.; SINGLETON, J.W.; KERN, F. Development of a Crohn's Disease Activity Index: National Cooperative Crohn's Disease Study. **Gastroenterology**, v. 70, p.439–444, 1976.

BRAZIL. IBGE. Brazilian Institute of Geography and Statistics (2011) Characteristics of the population and households: results of the universe. https://ww2.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm. Accessed 2 Jul 2018

D'AMICO, F.; SKARMOUTSOU, E.; MARCHINI, M. *et al.* Genetic polymorphisms of *FOXP3* in Italian patients with systemic sclerosis. **Immunology Letters** 152:109–113, 2013.

DI SABATINO, A. *et al.* Peripheral Regulatory T Cells and Serum Transforming Growth Factor- β : Relationship with Clinical Response to Infliximab in Crohn's Disease **Inflammatory Bowel Disease**, v.16, n.11, p. 1891-1897, 2010.

FAUSEL, R.A.; KORNBLUTH, A.; DUBINSKY, M.C. The First Endoscopy in Suspected Inflammatory Bowel Disease. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v.26, p.593–610, 2016.

FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P. *et al.* IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **Journal of Immunology**, v.146, p.3444–51, 1991.

FLAUZINO, T.; ALFIERI, D.F.; DE CARVALHO JENNINGS PEREIRA, W.L. *et al.* The rs3761548 *FOXP3* variant is associated with multiple sclerosis and transforming growth factor β 1 levels in female patients. **Inflammation Research**, v. 68, p.933–943, 2019.

FONTENOT, J.D.; GAVIN, M.A.; RUDENSKY, A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v.4, p.330–336, 2003.

FU, S.; ZHANG, N.; YOPP, A.C. *et al.* TGF-beta Induces Foxp3 + T-Regulatory Cells from CD4 + CD25 - Precursors. **American Journal of Transplantation**, v.4, p.1614–1627, 2004.

GAO, L.; LI, K.; LI, F. *et al.* Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients. **Journal of Dermatological Science**, v. 57, p. 51–56.

GEREMIA, A.; BIANCHERI, P.; ALLAN, P. *et al.* Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity Reviews**, v.13, p.3–10, 2014.

GOMOLLÓN, F.; DIGNASS, A.; ANNESE, V. *et al.* 3rd European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016: Part 1: Diagnosis and medical management. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.11, p.3–25, 2017.

HASHEMI, V.; FARROKHI, A.S.; TANOMAND, A. *et al.* Polymorphism of Foxp3 gene affects the frequency of regulatory T cells and disease activity in patients with rheumatoid arthritis in Iranian population. **Immunology Letters**, v. 204, p.16–22, 2018.

HE Y-Q, BO Q, YONG W, *et al.* FoxP3 genetic variants and risk of non-small cell lung cancer in the Chinese Han population. **Gene**, v. 531, p. 422–425, 2013.

HOOGENDORN, B.; COLEMAN, S.L.; GUY, C.A. *et al.* Functional analysis of human promoter polymorphisms. **Human Molecular Genetics**, v.12, p. 2249–2254, 2003.

HUBER, S.; GAGLIANI, N.; ESPLUGUES, E. *et al.* Th17 Cells Express Interleukin-10 Receptor and Are Controlled by Foxp3⁻ and Foxp3⁺ Regulatory CD4⁺ T Cells in an Interleukin-10-Dependent Manner. **Immunity**, v.34, p.554–565, 2011.

KHOR, B.; GARDET, A.; XAVIER, R.J. Genetics and pathogenesis of IBD. **Nature**, v.474, p.307–317, 2011.

KIERNAN, M.G.; COFFEY, J.C.; SAHEBALLY, S.M. *et al.* Systemic Molecular Mediators of Inflammation Differentiate Between Crohn's Disease and Ulcerative Colitis, Implicating Threshold Levels of IL-10 and Relative Ratios of Pro-inflammatory Cytokines in Therapy. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.14, n.1, p.118-129, 2020.

KILIÇ, Z.M.Y.; AYAZ, S.; ÖZİN, Y. *et al.* Plasma transforming growth factor-β1 level in inflammatory bowel disease. **Turkish Journal of Gastroenterology**, v.20, p.165–170, 2009.

KOROLKOVA, O.Y.; MYERS, J.N.; PELLON, S.T. *et al.* Characterization of Serum Cytokine Profile in Predominantly Colonic Inflammatory Bowel Disease to Delineate Ulcerative and Crohn's Colitis. *Clinical Medicine Insights: Gastroenterology*, v.8, p.29–44, 2015.

KULKARNI, A.B.; KARLSSON, S. Transforming growth factor- β 1 knockout mice: A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. ***American Journal of Pathology***, v.143, p.3–9, 1993.

MAASER, C.; STURM, A.; VAVRICKA, S.R. *et al.* ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. ***Journal of Crohn's and Colitis***, v.13, p.144–164, 2019.

MAGRO F, GIONCHETTI P, ELIAKIM R, *et al.* Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: Definitions, diagnosis, extra-intestinal manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch disorders. ***Journal of Crohn's and Colitis***, v.11, p.649–670, 2017.

MARUYAMA, T.; LI, J.; VAQUE, J.P. *et al.* Control of the differentiation of regulatory T cells and TH17 cells by the DNA-binding inhibitor Id3. ***Nature Immunology***, v.12, p.86–95, 2011.

MARY, J.Y.; MODIGLIANI, R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Thérapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif (GETAID). ***Gut***, v.30, p.983–989, 1989.

MCCABE, R.P.; SECRIST, H.; BOTNEY, M. *et al.* Cytokine mRNA expression in intestine from normal and inflammatory bowel disease patients. *Clinical Immunology and Immunopathology*, v.66, p.52–58, 1993.

MONTELEONE, G.; BOIRIVANT, M.; PALLONE, F.; MACDONALD, T.T. TGF- β 1 and smad7 in the regulation of IBD. ***Mucosal Immunology***, v.1, p.50–53, 2008.

MURAI, M.; TUROVSKAYA, O.; KIM, G. *et al.* Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. ***Nature Immunology***, v.10, p.1178–1184, 2009.

OUYANG, W. *et al.* Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. ***Annual Review of Immunology***, v.29, p.71–109, 2011.

PARADOWSKA-GORYCKA A, JURKOWSKA M, FELIS-GIEMZA A, *et al.* Genetic polymorphisms of FOXP3 in patients with rheumatoid arthritis. ***The Journal of Rheumatology***, v. 42, p. 170–180, 2015.

PARK, O; GRISHINA, I; LEUNG, P.S. *et al.* Analysis of the Foxp3/scurfin gene in Crohn's disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1051, p.218–228, 2005.

RODRÍGUEZ-PERLVÁREZ, M.L.; GARCÍA-SÁNCHEZ, V.; VILLAR-PASTOR, C.M. *et al.* Role of serum cytokine profile in ulcerative colitis assessment. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 18, p.1864–1871, 2012.

SHEN, Z.; CHEN, L.; HAO, F. *et al.* Intron-1 rs3761548 is related to the defective transcription of Foxp3 in psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.14, p.226–241, 2010.

STEPHENS, M.; SCHEET, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. **American Journal of Human Genetics**, v.76, p.449–462, 2005.

STEPHENS, M.; SMITH, N.J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **American Journal of Human Genetics**, v.68, p.978–989, 2001.

SUAREZ-KURTZ, G.; PENA, S.D.J.; STRUCHINER, C.J.; HUTZ, M.H. Pharmacogenomic Diversity among Brazilians: Influence of Ancestry, Self-Reported Color, and Geographical Origin. **Frontiers in Pharmacology**, v.3, p.1-7, 2012.

SZKARADKIEWICZ, A.; MARCINIAK, R.; CHUDZICKA-STRUGAŁA, I. *et al.* Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory bowel disease and colorectal cancer patients. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v.57, p.291–294, 2009.

TRIFUNOVIC, J. *et al.* Pathologic patterns of interleukin 10 expression – A review. **Biochem Med**, v.25, n.1, p.36-48, 2015.

WALKER, M.R.; KASPROWICZ, D.J.; GERSUK, V.H. *et al.* Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25– T cells. **Journal of Clinical Investigation**, v.112, p.1437–1443, 2003.

WAN, Y.Y.; FLAVELL, R. A . 'Yin-Yang' functions of TGF- β and Tregs in immune regulation. **Immunological Reviews**, v.220, p.199–213, 2007.

WIERCÍŃSKA-DRAPAŁO, A.; FLISIAK, R.; PROKOPOWICZ, D. Effect of ulcerative colitis activity on plasma concentration of transforming growth factor β 1. **Cytokine**, v.14, p343–346, 2001.

WU, Z.; YOU, Z.; ZHANG, C. *et al.* Association between functional polymorphisms of Foxp3 gene and the occurrence of unexplained recurrent spontaneous abortion in a Chinese Han population. **Clinical & Developmental Immunology**, v.2012, p.1-7, 2012. ID:896458

XIA, S-L.; YING, S.J.; LIN, Q.R. *et al.* Association of Ulcerative Colitis with FOXP3 Gene Polymorphisms and Its Colonic Expression in Chinese Patients. **Gastroenterology Research and Practice**, v.2019, p.1–10, 2019a.

XIA, S.; ZHANG, D.; ZHENG, S. *et al.* Association of Crohn's disease with Foxp3 gene polymorphisms and its colonic expression in Chinese patients. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.33:e22835, 2019b.

ZUNDLER, S.; NEURATH, M.F. Immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases: Functional role of T cells and T cell homing. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.33, p.19–28, 2015.

Table 1 Endoscopic and clinical parameters of female patients with inflammatory bowel disease (IBD).

Characteristics	Ulcerative Colitis (n=60)	Crohn Disease (n=50)
Endoscopic Activity ^a		
Remission	26 (43.3)	31 (62.0)
Mild	10 (16.7)	8 (16.0)
Moderate	17 (28.3)	5 (10.0)
Severe	7 (11.7)	6 (12.0)
Clinical Activity ^b		
Remission	34 (56.7)	30 (60.0)
Mild	22 (36.7)	19 (38.0)
Moderate	3 (5.0)	1 (2.0)
Severe	1 (1.7)	0 (0.0)
Treatment		
Sulfasalazine or 5-aminosalicylic acid (Yes/No)	55 (91.7) / 5 (8.3)	9 (18.0) / 41 (82.0)
Corticosteroids (Yes/No)	8 (13.3) / 52 (86.7)	5 (10.0) / 45 (90.0)
TNF- α inhibitors (Yes/No)	11 (18.3) / 49 (81.7)	30 (60.0) / 20 (40.0)
Azathioprine or methotrexate (Yes/No)	17 (28.3) / 43 (71.7)	34 (68.0) / 16 (32.0)

Data were expressed by absolute number and percentage. TNF: tumor necrosis factor. ^a Endoscopic activity in UC patients was evaluated by Mayo endoscopic score as remission (0), mild activity (1), moderate (2), and severe (3). In CD patients by Crohn's disease endoscopic index of severity (CDEIS) and classified in remission (<3), mild (3-8), moderate (9-12), and severe (>12). ^b Clinical activity in UC patients was evaluated by Partial Mayo Index Score: remission (<2), mild activity (2-4), moderate (5-7), and severe (>7). In CD patients, clinical activity was assessed by Crohn's Disease Activity Index (CDAI) and the results were classified according to the activity status: remission (≤ 150), mild (151-219), moderate (220-450), and severe or very severe activity (>450).

Table 2 Distribution of *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) and *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) genotypes and allelic frequencies among Brazilian patients with inflammatory bowel disease (IBD) and controls.

	Controls (n=154)	IBD (n=110)	UC (n=60)	CD (n=50)	Controls x IBD p value*	Controls x UC p value*	Controls x CD p value*
rs2232365 -924 (G>A)							
Allele model							
G	170 (55.9)	120 (54.5)	70 (58.3)	50 (50.0)	Reference	Reference	Reference
A	134 (44.1)	100 (45.5)	50 (41.7)	50 (50.0)	0.214	0.892	0.056
Co-dominant model							
GG	44 (28.9)	29 (26.4)	18 (30.0)	11 (22.0)	Reference	Reference	Reference
GA	82 (53.9)	62 (56.4)	34 (56.7)	28 (56.0)	0.302	0.505	0.202
AA	26 (17.1)	19 (17.2)	8 (13.3)	11 (22.0)	0.193	0.914	0.047^a
Dominant model							
GG	44 (28.9)	29 (26.4)	18 (30.0)	11 (22.0)	Reference	Reference	Reference
GA+AA	108 (71.1)	81 (73.6)	42 (70.0)	39 (78.0)	0.219	0.610	0.105
Recessive model							
GG+GA	126 (82.9)	91 (82.7)	52 (86.7)	39 (78.0)	Reference	Reference	Reference
AA	26 (17.1)	19 (17.2)	8 (13.3)	11 (22.0)	0.368	0.627	0.097
rs3761548 -3279 (C>A)							
C	215 (69.8)	140 (63.6)	73 (60.8)	67 (67.0)	Reference	Reference	Reference
A	93 (30.2)	80 (36.4)	47 (39.2)	33 (33.0)	0.478	0.287	0.896
Co-dominant							
CC	69 (44.8)	45 (40.9)	24 (40.0)	21 (42.0)	Reference	Reference	Reference
CA	77 (50.0)	50 (45.5)	25 (41.7)	25 (50.0)	0.794	0.800	0.962
AA	8 (5.2)	15 (13.6)	11 (18.3)	4 (8.0)	0.141	0.053	0.510
Dominant model							
CC	69 (44.8)	45 (40.9)	24 (40.0)	21 (42.0)	Reference	Reference	Reference
CA+AA	85 (55.2)	65 (59.1)	36 (60.0)	29 (58.0)	0.891	0.779	0.934
Recessive model							
CC+CA	146 (94.8)	95 (86.4)	49 (81.7)	46 (92.0)	Reference	Reference	Reference
AA	8 (5.2)	15 (13.6)	11 (18.3)	4 (8.0)	0.104	0.041^b	0.482

The genotyping was successful in 110 cases and 152 controls for rs2232365 and 110 cases and 154 controls for rs3761548. Bold values represent statistically significant values; IBD: inflammatory bowel disease; UC: ulcerative colitis; CD: Crohn's Disease; OR (odds ratio) and 95% CI (confidence interval); *p value adjusted by age, ethnicity, body mass index, and smoking.

^aOR: 3.147, 95% CI: 1.015 – 9.758, p=0.047; ^bOR: 3.221, 95% CI: 1.050 – 9.876, p=0.041.

Table 3 Distribution of rs2232365 -924 (G>A) and rs3761548 -3279 (C>A) *FOXP3* haplotypes among Brazilian patients with inflammatory bowel disease (IBD) and controls.

Haplotypes (rs2232365/ rs3761548)	Controls n (%)	IBD n (%)	OR (95% CI)	p*	UC n (%)	OR (95% CI)	p*	CD n (%)	OR (95% CI)	p*
A/C dominant	110 (72.8)	80 (72.7)	1.270 (0.679 – 2.377)	0.454	42 (70.)	1.038 (0.499 – 2.160)	0.920	38 (76.0)	1.628 (0.692 – 3.825)	0.264
A/C recessive	28 (18.5)	19 (17.3)	1.275 (0.622 – 2.615)	0.507	8 (13.3)	0.764 (0.304 – 1.921)	0.764	11 (22.0)	1.934 (0.780 – 4.792)	0.154
G/A dominant	82 (54.3)	65 (59.1)	1.077 (0.614 – 1.890)	0.796	36 (60.0)	1.163 (0.598 – 2.262)	0.656	29 (58.0)	1.065 (0.505 – 2.247)	0.869
G/A recessive	5 (3.3)	14 (12.7)	4.003 (1.100 – 14.56)	0.035	11 (18.3)	6.107 (1.609 – 23.18)	0.008	3 (6.0)	2.215 (0.303 – 16.20)	0.433
G/C dominant	67 (44.4)	39 (35.5)	0.606 (0.341 – 1.077)	0.088	22 (36.7)	0.789 (0.400 – 1.555)	0.494	17 (34.0)	0.432 (0.196 – 0.951)	0.037

Bold values represent statistically significant values; OR (odds ratio) and 95% CI (confidence interval); IBD: inflammatory bowel disease (IBD); UC: ulcerative colitis; CD: Crohn's Disease. *p value adjusted by age, ethnicity, body mass index, and smoking. Haplotype models: A/C dominant (A/C carriers versus A/A, G/C, and G/A carriers), A/C recessive (ACAC versus A/A, G/C, and G/A carriers), G/A dominant (G/A carriers versus A/C, A/A, and G/C carriers), G/A recessive (GAGA versus A/C, A/A, and G/C carriers), and G/C dominant (G/C carriers versus A/C, A/A, and G/A carriers).

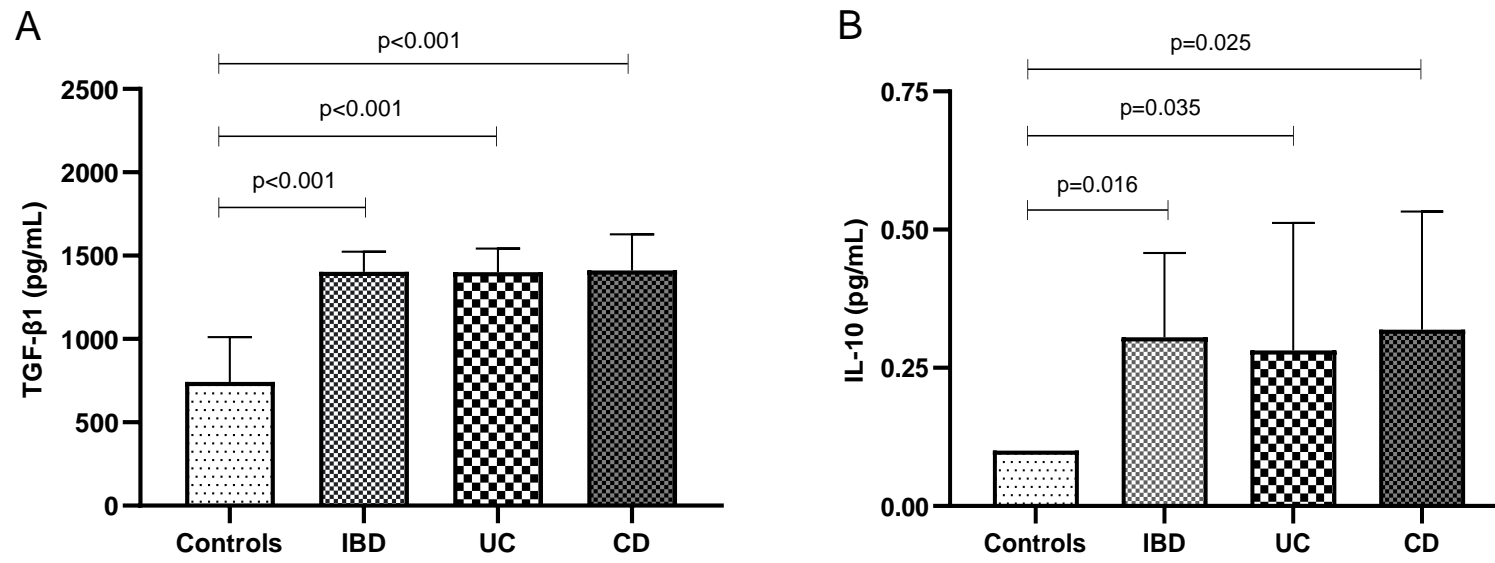


Figure 1. Cytokine plasma levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD), ulcerative colitis (UC), Crohn's disease (CD) and controls. A) Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) plasma levels in IBD, UC and CD patients compared to controls; B) Interleukin 10 (IL-10) plasma levels in IBD, UC and CD patients compared to controls; results were expressed as median and confidence interval 95%; p value adjusted by age, ethnicity, body mass index, and smoking.

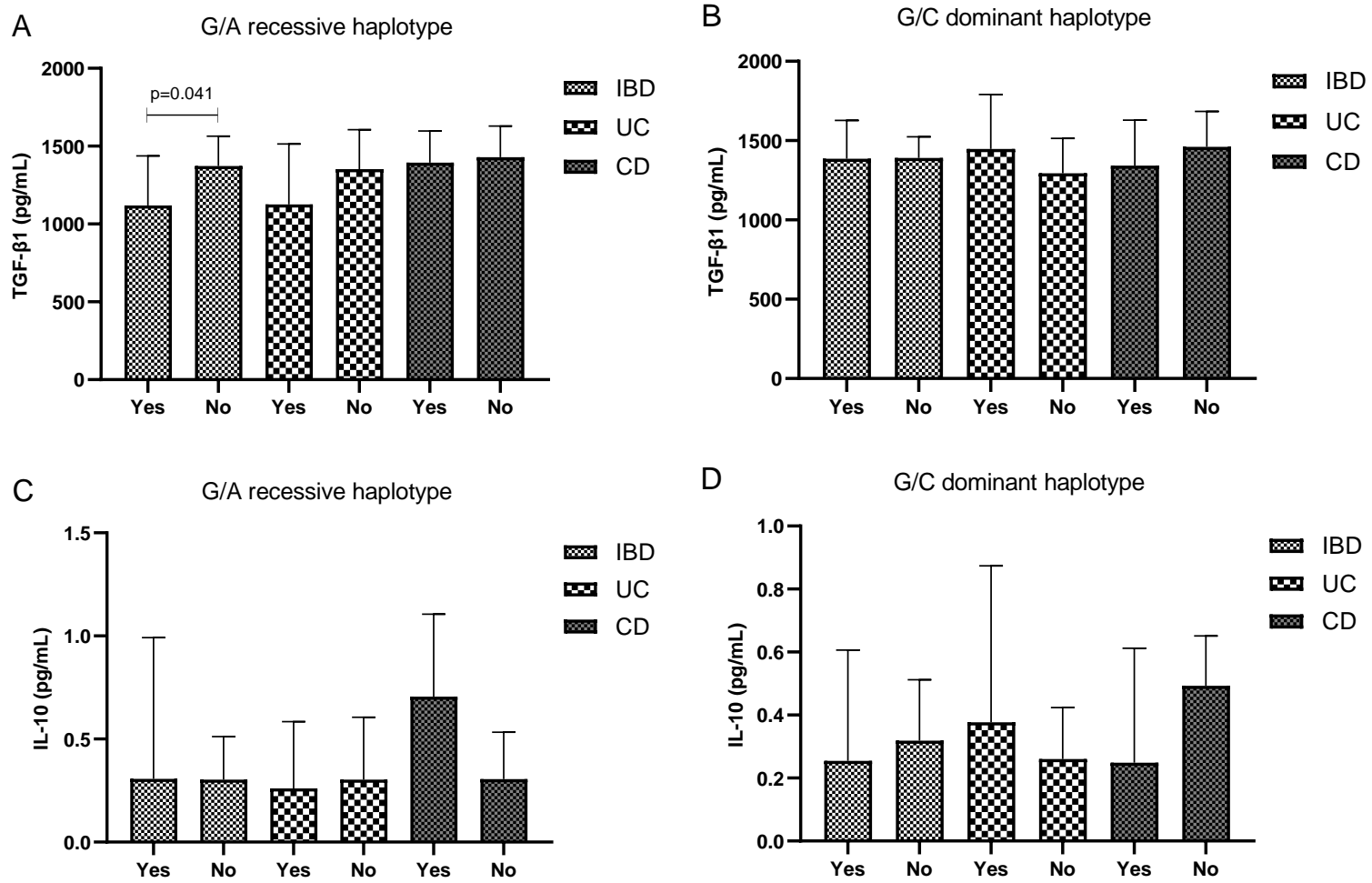


Figure 2. Cytokine plasma levels according to the haplotypes of *FOXP3* -924 A>G (rs2232365) and *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) variants in inflammatory bowel disease (IBD) patients. A) Transforming growth factor beta 1 (TGF-β1) plasma levels in G/A recessive haplotype in IBD, ulcerative colitis (UC), and Crohn's disease (CD) female patients; B) TGF-β1 plasma levels in G/C dominant haplotype in IBD, UC and CD female patients; C) Interleukin 10 (IL-10) plasma levels in G/A recessive haplotype in IBD, UC, and CD female patients; D) IL-10 plasma levels in G/C dominant haplotype model in IBD, UC, and CD female patients; results expressed as median and 95% confidence interval; p value adjusted by age, ethnicity, body mass index, and smoking. Haplotype models: G/A recessive (GAGA versus A/C, A/A, and G/C carriers) and G/C dominant (G/C carriers versus A/C, A/A, and G/A carriers). Yes: presence of haplotype. No: other haplotypes.

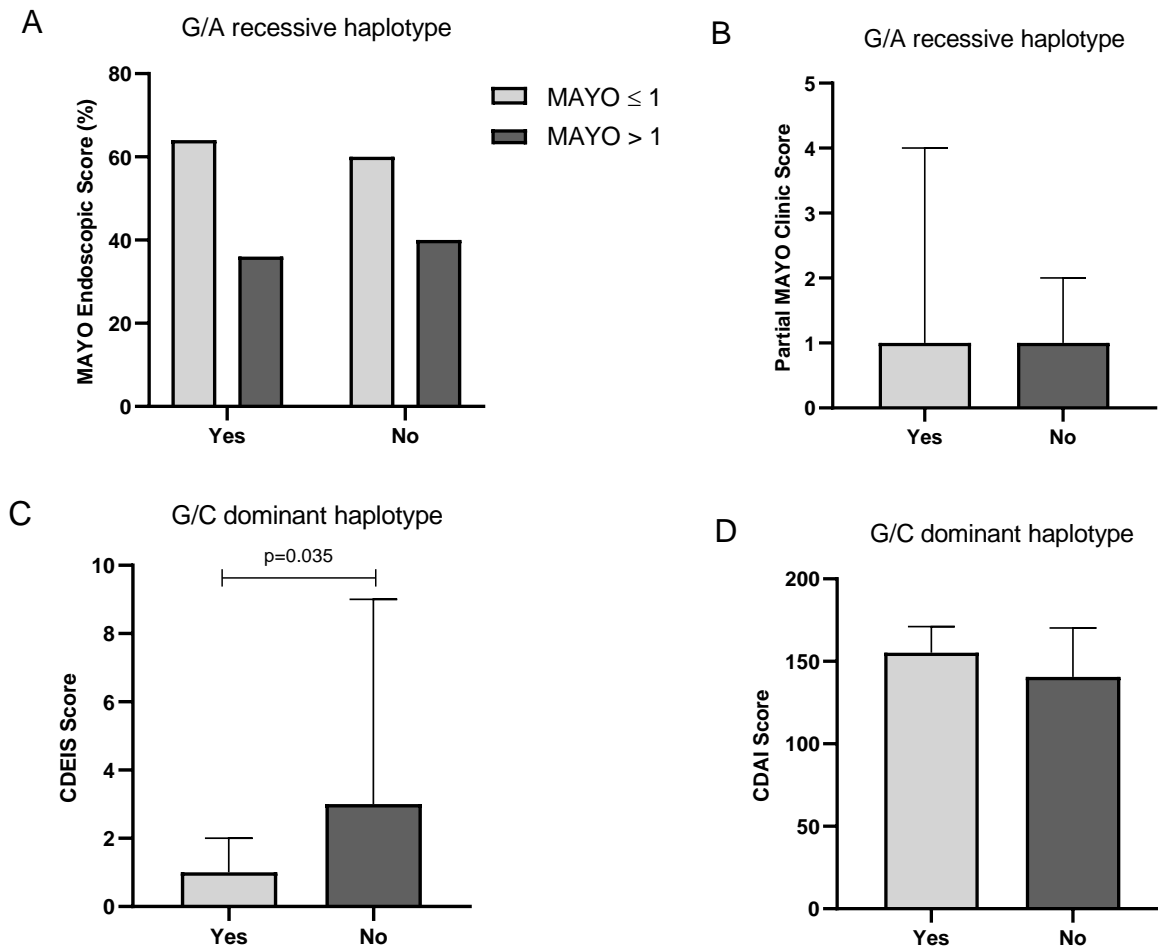


Figure 3. Endoscopic and clinical activity according to the haplotypes of *FOXP3* -924 A>G (rs2232365) and *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) variants in inflammatory bowel disease (IBD) patients. A) Endoscopic activity in ulcerative colitis (UC) patients was evaluated by Mayo endoscopic score in G/A recessive haplotype model; B) Clinical activity in UC patients was evaluated by Partial Mayo Index Score G/A recessive haplotype model; C) Endoscopic activity in Crohn's disease (CD) patients was evaluated by Crohn's disease endoscopic index of severity (CDEIS) in G/C dominant haplotype model; D) Clinical activity in CD patients was evaluated by Crohn's Disease Activity Index (CDAI) in G/C dominant haplotype model. Haplotype models: G/A recessive (GAGA versus A/C, A/A, and G/C carriers) and G/C dominant (G/C carriers versus A/C, A/A, and G/A carriers). Yes: presence of haplotype. No: other haplotypes.

6 CONCLUSÕES

- As pacientes com DII, RCU e DC apresentaram níveis mais elevados de TGF- β 1 e IL-10 quando comparados aos níveis apresentados pelas mulheres do grupo controle, mesmo após ajuste pelas variáveis confundidoras como idade, etnia, IMC e tabagismo.
- O genótipo AA da variante *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) foi associado a maior suscetibilidade à DC enquanto o genótipo AA da variante *FOXP3* -3279 C>A (rs3761548) foi associado a maior suscetibilidade à RCU, em mulheres (dados ajustados pela idade, etnia, IMC e tabagismo).
- As pacientes que apresentam o haplótipo GAGA das variantes *FOXP3* -924 G>A e -3279 C>A apresentaram cerca de 4 vezes maior chance de desenvolverem DII e 6 vezes mais chance de desenvolver RCU, quando comparado às demais estruturas haplotípicas (os dados foram ajustados pela idade, etnia, IMC e tabagismo).
- A presença do haplótipo G/C no modelo dominante apresentou um efeito protetor de cerca de 60% na suscetibilidade à DC.
- O haplótipo GAGA foi associado com menores níveis de TGF- β 1 quando comparados aos níveis observados nas pacientes com as demais estruturas haplotípicas (dados ajustados pela idade, etnia, IMC e tabagismo).
- As variantes *FOXP3* -924 G>A (rs2232365) e -3279 C>A (rs3761548), analisadas individualmente ou em haplótipo, não foram associadas aos níveis de IL-10 e atividade clínica da doença em pacientes com DII, RCU e DC (dados ajustados pela idade, etnia, IMC e tabagismo).
- O haplótipo G/C no modelo dominante foi associado com menor atividade endoscópica avaliada por CDEIS em pacientes com DC quando comparado à atividade endoscópica das pacientes com as demais estruturas haplotípicas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas últimas décadas grandes avanços ocorreram no campo das DII, resultando em melhor entendimento de mecanismos e fatores envolvidos na inflamação intestinal. A expansão dos conhecimentos em genética e imunologia oferece novas alternativas no manejo das DII. Este é o primeiro estudo a avaliar o papel das variantes -924 G>A e -3279 C>A do *FOXP3* em mulheres com DII na população brasileira. Além disso, não há estudos, até o presente momento, que tenham avaliado a associação destas variantes com os níveis de TGF- β 1 e IL-10. Nossos dados demonstram que as variantes aqui estudadas estão associadas com a suscetibilidade às DII e o resultados da análise em haplótipo interferiram de forma distinta na suscetibilidade, na atividade endoscópica e nos níveis plasmáticos de TGF- β 1 na DC e RCU. Estes resultados demonstram, portanto, que as variantes -924 G>A e -3279 C>A desempenham um papel importante na suscetibilidade e patogênese da RCU e DC em mulheres.

Apesar de algumas questões na patogênese das DII ainda não terem sido completamente elucidadas, os conhecimentos gerados a partir deste estudo podem contribuir para pesquisas futuras visando melhorar o diagnóstico, o acompanhamento, a resposta terapêutica e, de maneira geral, a qualidade de vida dos pacientes com DII.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D.H.; EKSTEEN, B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Immunology**, v.6, p.244–251, 2006.
- AFZALI, A; CROSS, R.K. Racial and Ethnic Minorities with Inflammatory Bowel Disease in the United States: A Systematic Review of Disease Characteristics and Differences. **Inflammatory Bowel Disease**, v.22, n.8, p. 2023-2040, 2016.
- AHLUWALIA, B. *et al* Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanism of biological therapies **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.5, n.4, p.379- 389, 2018.
- AHLUWALIA, B.; MAGNUSSON, M.K.; OHMAN, L. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.52, p.1185–1193, 2017.
- AHMED, F.E. Role of genes, the environment and their interactions in the etiology of inflammatory bowel diseases. **Expert Review of Molecular Diagnosis**, v.6, p.345–363, 2006.
- ALLAIS, L.; KERCKHOF, F.M.; VERSCHUERE, S. *et al*. Chronic cigarette smoke exposure induces microbial and inflammatory shifts and mucin changes in the murine gut. **Environmental Microbiology**, v.18, n.5, p.1352-1363, 2016.
- ANANTHAKRISHNAN, A.N.; KHALILI, H.; KONIJETI, G.G. *et al*. A prospective study of long-term intake of dietary fiber and risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v.145, n.5, p.970-977, 2013.
- ANANTHAKRISHNAN, A.N.; KHALILI, H.; KONIJETI, G.G. *et al*. Long-term intake of dietary fat and risk of ulcerative colitis and Crohn's disease. **Gut**, v.63, n.5, p776-784, 2014.
- ANANTHAKRISHNAN, A.N. *et al*. Environmental triggers in IBD: a review of progress and evidence. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, vol.15, p. 39-49, 2018.
- ANDERSON, C.A; BOUCHER, G.; LEES, C.W. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. **Nature Genetics**, v.43, p.246–252, 2011.
- ANNESE, V.; BEAUGERIE, L.; EGAN, L. *et al*. European Evidence-based Consensus: Inflammatory Bowel Disease and Malignancies. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.9, p.945-65, 2015.
- ANNESE, V.; DAPERNO, M.; RUTTER, M.D. *et al*.; European Crohn's and Colitis Organization. European evidence-based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.7, p.982–1018, 2013.

- ARAI, M.; NAGANUMA, M.; SUGIMOTO, S. *et al.* The Ulcerative Colitis Endoscopic Index Of Severity is useful to predict medium- to long-term prognosis in ulcerative colitis patients with clinical remission. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.10, p.1303–9, 2016.
- ARVEY, A. *et al.* Inflammation-induced repression of chromatin bound by the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. **Nature Immunology**, v.15, p.580–587, 2014.
- ATREYA, R.; NEURATH, M.F. Factors affecting mucosal homeostasis: a fine balance. In: Targan SR, Shanahan F, Karp LC, editors. **Inflammatory bowel disease: translating basic science into clinical practice**. Chichester: Wiley-Blackwell, 2010.p.52-60.
- BABON, J.J.; LUCET, I.S.; MURPHY, J.M. *et al.* The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation. **Biochemical Journal**, v.462, p.1–13, 2014.
- BAERT, F.J. *et al.* Tumor necrosis factor α antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. **Gastroenterology**, v.116, p.22-28, 1999.
- BANIN HIRATA, B. K. *et al.* FOXP3 Allelic Variants and Haplotype Structures Are Associated with Aggressive Breast Cancer Subtypes. **Disease Markers**, v.2017, p.1–8, 2017.
- BANK, S.; SKYTT ANDERSEN, P.; BURISCH, J. *et al.* Polymorphisms in the Inflammatory Pathway Genes TLR2, TLR4, TLR9, LY96, NFKBIA, NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and PPARG Are Associated with Susceptibility of Inflammatory Bowel Disease in a Danish Cohort. Heimesaat MM, ed. **PLoS One**, v.9, e98815, 2014.
- BARON, J.H.; CONNELL, A.M.; KANAGHINIS, T.G. *et al.* Out-patient treatment of ulcerative colitis. Comparison between three doses of oral prednisone. **British Medical Journal**, v.2, p.5302, p.441-3, 1962.
- BARRETT, J.C.; HANSOUL, S.; NICOLAE, D.L. *et al.* Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. **Nature Genetics**, v.40, p.955–962, 2008.
- BASSUNY, W. M.; IHARA, K.; SASAKI, Y.; KUROMARU, R.; KOHNO, H.; MATSUURA, N.; HARA, T. A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes. **Immunogenetic**, v.55, p.149–156, 2003.
- BAUMGART, D.C.; SANDBORN, W.J. Crohn's disease. **The Lancet**, v.380 (9853), p.1590-1605, 2012.
- BENCHIMOL, E.I.; MANUEL D.G.; GUTTMANN A., *et al.* Changing age demographics of inflammatory bowel disease in Ontario, Canada: a population-based cohort study of epidemiology trends. **Inflammatory Bowel Disease**, v.20, p.1761–1769, 2014.

- BECKER, H.M. *et al.* Living with inflammatory bowel disease: A Crohn's and Colitis Canada survey . **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 29, n.2, p.77-84, 2015.
- BENTLEY, E.; JENKINS, D.; CAMPBELL, F. *et al.* How could pathologists improve the initial diagnosis of colitis? Evidence from an international workshop. **Journal of Clinical Pathology**, v.55, p.955-960, 2002.
- BERG,D.R.; COLOMBEL, J.F.; UNGARO, R. The Role of Early Biologic Therapy in Inflammatory Bowel Disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v.25, n.12, p.1896-1905, 2019.
- BERNINK, J.H.; PETERS, C.P.; MUNNEKE, M. *et al.* Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. **Nature Immunology**, v.14, p.221–229, 2013.
- BERNSTEIN, C. N. *et al.* A population-based case control study of potential risk factors for IBD. **American Journal of Gastroenterology**, v.101, p.993–1002, 2006.
- BEST, W.R. *et al.* Development of a Crohn´s Disease Activity Index. **Gastroenterology**, v.70, n.3, p.439-444,1976.
- BEWTRA, M. *et al.* Crohn's disease and ulcerative colitis are associated with elevated standardized mortality ratios: a meta-analysis. **Inflammatory Bowel Disease**, v.19, p.599-613, 2013.
- BJORNVOLD, M.; AMUNDSEN, S. S.; STENE, L. C.; JONER, G.; DAHL-JORGENSEN, K.; NJOLSTAD, P. R. *et al.* FOXP3 polymorphisms in type 1 diabetes and coeliac disease. **Journal of Autoimmunity**, v.27, p.140–144, 2006.
- BOHL, J.L.; SOBBA, K. Indications and options for surgery in ulcerative colitis. **Surgery Clinics of North America**, v.95, n.6, p.1211-1232, 2015.
- BOSSUY, T. X. Serologic markers in inflammatory bowel disease. **Clinical Chemistry**, v.52, p.171–81, 2006.
- BOTH, H.; TORP-PEDERSEN, K.; KREINER, S. *et al.* Clinical appearance at diagnosis of ulcerative colitis and Crohn´s disease in a regional patient group. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.18, p.987–91, 1983.
- BREESE, E.; BRAEGGER, C.P.; CORRIGAN, C.J. *et al.* Interleukin-2- and interferon- gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa. **Immunology**, v.78, p.127–131, 1993.
- BURICH, J.; JESS, T. *et al.* The burden of inflammatory bowel disease in Europe. **Journal of Crohn´s and Colitis**, v.7, p.322–337, 2013.
- BURISCH, J.; JESS, T.; EGEBERG, A. Incidence of immune-mediated inflammatory diseases among patients with inflammatory bowel diseases in Denmark. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.17, n.13, p.2704-2712, 2019.

CHAMBERS, T.; MORSON B. The granuloma in Crohn's disease. **Gut**, v. 20, n.4, p.269-274, 1979.

CHANDE, N. *et al.* Azathioprine or 6-mercaptopurine for maintenance of remission in Crohn's disease. **Cochrane Database of Systematic Review**, Issue 10: art. No. CD000067, 2015

CHARPENTIER, .C.; SALLERON, J.; SAVOYE, G. *et al.* Natural history of elderly-onset inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. **Gut**, v.63, p.423-32, 2014.

CHATHADI K. *et al.* ASGE guidelines. The role of endoscopy in inflammatory bowel disease. **Gastrointestinal Endoscopy**, v.81, n.5, p.1101-1121, 2015.

CHEN, Y.; WANG, Y.; SHEN, J. Role of environmental factors in the pathogenesis of Crohn's disease: a critical review. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 34, n.12, p.2023-2034, 2019

CHEN Q.; KIM Y.C; LAURENCE A.; PUNKOSDY, G.A.; SHEVACH, E.M. IL-2 controls the stability of Foxp3 expression in TGF- β -induced Foxp3+ T cells in vivo. **Journal of Immunology**, v.186, p.6329 –6337, 2011.

CHOLAPRANEE, A.; ANANTHAKRISHNAN, A.N. Environmental hygiene and risk of inflammatory bowel diseases: a systematic review and meta-analysis. **Inflammatory Bowel Disease**, v.22, n.9, p.2191-2199, 2016.

CIECKO-MICHALSKA, I. TGF- β and granulocyte elastase in the evaluation of activity of inflammatory bowel disease. A pilot study. **Postepy higieny i medycyny doswiadczonej**, v.68, p.66-72, 2014.

CLEYNEN, I.; BOUCHER, G.; JOSTINS, L. *et al.* Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. **The Lancet**, v. 387, p.156–167, 2016.

CLEYNEN, I.; GONZÁLEZ, J.R.; FIGUEROA, C. *et al.* Genetic factors conferring an increased susceptibility to develop Crohn's disease also influence disease phenotype: results from the IBDchip European Project. **Gut**, v.62, p.1556–1565, 2013.

COLOMBEL, J.F. *et al.* Agreement between rectosigmoidoscopy and colonoscopy analyses of disease activity and healing in patients with ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v.150, p.389–95.e3, 2016.

COLOMBEL, J.F. *et al.* Early mucosal healing with infliximab is associated with improved long-term clinical outcomes in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v.141, p.1194–201, 2011.

CORNISH, J. A. *et al.* The risk of oral contraceptives in the etiology of inflammatory bowel disease: a meta-analysis. **Journal of Gastroenterology**, v.103, p. 2394–2400, 2008.

COSNES, J. *et al.* Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v.140, p. 1785–1794, 2011.

CUROTTO DE LAFAILLE, M.A.; LAFAILLE, J.J. Natural and adaptive Foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? **Immunity**, v.3, p.626–635, 2009.

DANESE, S.; FIOCCHI, C. Ulcerative colitis. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n.18, p.1713-1725, 2011.

DASSOPOULOS, T. *et al.* American Gastroenterological Association Institute technical review on the use of thiopurines, methotrexate, and anti-TNF- α biologic drugs for the induction and maintenance of remission in inflammatory Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.145, n.6, p. 1464-1478: e1-e5, 2013.

DAVIES, J.M.; ABREU, M.T. The innate immune system and inflammatory bowel disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.50, p.24–33, 2015.

DE CRUZ, P. *et al.* Mucosal healing in Crohn's disease: a systematic review. **Inflammatory Bowel Disease**, v.19, p.429–44, 2013.

DE DOMBAL, F.T.; WATTS, J.M.; WATKINSON, G.; GOLIGHER, J.C. Local complications of ulcerative colitis: stricture, pseudopolyposis, and carcinoma of colon and rectum. **British Medical Journal.**, v. 1, p.1442, 1966.

DE SOUZA, H.S.; FIOCCHI, C. Immunopathogenesis of IBD: current state of the art. **Nature Reviews of Gastroenterology and Hepatology**, v.13, p.13–27, 2018.

DEAGLIO, S. *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, p.1257–1265, 2007.

DEJACO, C. *et al.* Diagnosing colitis: a prospective study on essential parameters for reaching a diagnosis. **Endoscopy**, v.35, p.1004-1008, 2003.

DETKOVÁ, Z. *et al.* Different patterns of serum interleukin 110 response to treatment with anti-tumor necrosis factor α antibody (infliximab) in Crohn's disease. **Physiological Research**, v.52, p.95-100, 2003.

DIGNASS, A. *et al.* Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: definitions and diagnosis. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.6, p.965–90, 2012.

DONG, C. *et al.* Systematic review with meta-analysis: mortality in acute severe ulcerative colitis. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v.51, n.1, p.8-33, 2020.

DUBINSKY, M.C.; KUGATHASAN, S.; KWON, S. *et al.* Multidimensional prognostic risk assessment identifies association between IL12B variation and surgery in Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v.19, p.1662–1670, 2013.

DULAI, O.S. *et al.* Systematic review: monotherapy with anti tumour necrosis factor α agents versus combination therapy with an immunosuppressive for IBD. **Gut**, v.63, n.12, p.1843-1853, 2014.

EASTAFF-LEUNG, N.; MABARRACK, N.; BARBOUR, A. *et al.* Foxp3 β regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. **Journal of Clinical Immunology**, v.30, p.80–89, 2010.

EBBO, M.; CRINIER, A.; VELY, F. *et al.* Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. **Nature Review Immunology**, v.17, p.665–678, 2017.

EFTEKHARIAN, M.M. *et al.* Single nucleotide polymorphisms in the FOXP3 gene are associated with increased risk of relapsing remitting multiple sclerosis. **Human Antibodies**, v.24 p.85–90, 2016.

FANTINI, M. C.; RIZZO, A.; FINA, D. *et al.* Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression. **Gastroenterology**, n. 136, p.1308–1316, 2009.

FAUSEL, R. A.; KORNBLUTH, A.; DUBINSKI, M. The first Endoscopy in suspected inflammatory bowel disease. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics**, v. 26, n. 4, p. 593-610, 2016

FEAGAN, B. G. *et al.* Ustekinumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 375, p.1946-1960, 2016.

FEFFERMAN, D.S.; FARRELL, R.J. Endoscopy in inflammatory bowel disease: indications, surveillance, and use in clinical practice. **Clinical Gastroenterology Hepatology**, v.3, p.11–24, 2005

FEUERSTEIN, J.D.; CHEIFETZ, A.S. Crohn Disease: Epidemiology, Diagnosis, and Management. **Mayo Clinic Proceedings**, v.92, n.7, p.1088-1103, Jul.2017,

FEURSTEIN, J. D.; MOSS, A. C.; FARRAYE, F. A. Ulcerative colitis. **Mayo Clinic Proceedings**, v.94 n.7, p.1357-1373, 2019.

FISCHER, A.; ZUNDLER, S.; ATREYA, R. *et al.* Differential effects of a4b7 and GPR15 on homing of effector and regulatory T cells from patients with UC to the inflamed gut in vivo. **Gut**, v. 65, p.1642–1664, 2016.

FLOESS, S., FREYER, J.; SIEWERT, C. *et al.* Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. **PLoS Biology**, v.5, n. 2, e38, 2007.

FORD, A. C.; MOAYYEDI, P.; HANAUER, S.B. Ulcerative colitis. **British Medical Journal**, v.346, f432, 2013.

FRANK, D. N.; ST AMAND, A. L.; FELDMAN, R. A. *et al.* Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.104, n.34, p.3780-13785, 2007.

FRIEDMAN, S.; RUBIN, P.H.; BODIAN, C. *et al.* Screening and surveillance colonoscopy in chronic Crohn's colitis. **Gastroenterology**, v.120, p.820-6, 2001

FUJINO, S.; ANDOH, A.; BAMBA, S. *et al.* Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. **Gut**, v.52, p.65–70, 2003.

FUSS, I.J.; NEURATH, M.; BOIRIVANT, M. *et al.* Disparate CD4⁺ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN- γ , whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. **Journal of Immunology**, v.157, p1261–1270, 1996.

FUSS, I. J.; STROBER, W. The role of IL-13 and NK T cells in experimental and human ulcerative colitis. **Mucosal Immunology**, v.1, p. S31–S33, 2008, Supp1.

GALVEZ, J. Role of Th17 cells in the pathogenesis of human IBD. **International Scholarly Research Notices Inflammation**, 2014: 928461, 2014.

GAO, L.; LI, K.; LI, F.; LI, H.; LIU, L.; WANG, L. *et al.* Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients. **Journal of Dermatological Science**, v.57, p.51–56, 2010.

GARBER, A.; REGUEIRO, M. Extraintestinal Manifestations of Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Etiopathogenesis, and Management. **Current Gastroenterology Reports**, v.21, n.7, p.1-13, 2019.

GASCHE, C. *et al.* A simple classification of Crohn's disease: report of the Working Party for the World Congresses of Gastroenterology, Vienna 1998. **Inflammatory Bowel Disease**, v.6, p.8-15, 2000.

GASSLER, N.; ROHR, C.; SCHNEIDER, A. *et al.* Inflammatory bowel disease is associated with changes of enterocytic junctions. **American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, v.281, p.G216–G228, 2001.

GEREMIA, A.; ARANCIBIA-CARCAMO, C.V.; FLEMING, M.P. *et al.* IL-23-responsive innate lymphoid cells are increased in inflammatory bowel disease. **Journal of Experimental Medicine**, v.208, p.1127–1133, 2011.

GEREMIA, A.; ARANCIBIA-CARCAMO, C. V. Innate lymphoid cells in intestinal inflammation. **Frontiers in Immunology**, v.8, p.1296, 2017.

GEREMIA, A.; BIANCHERI, P.; ALLAN, P. *et al.* Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. **Autoimmunity Review**, v.13, p.3–10, 2014.

GERLACH, K.; HWANG, Y.; NIKOLAEV, A. *et al.* TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. **Nature Immunology**, v.15 p.676–686, 2014.

GLAS, J.; KONRAD, A.; SCHMECHEL, S. *et al.* The *ATG16L1* gene variants rs2241879 and rs2241880 (T300A) are strongly associated with susceptibility to

Crohn's disease in the German population. **American Journal of Gastroenterology**, v.103, p.682–691, 2008.

GLOCKER, E. O.; KOTLARZ, D.; BOZTUG, K. *et al.* Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. **New England Journal of Medicine**, v.36, p.2033–2045, 2009.

GOLDBERG, R.; PRESCOTT, N.; LORD, G. M. *et al.* The unusual suspects – innate lymphoid cells as novel therapeutic targets in IBD. **Nature Reviews of Gastroenterology and Hepatology**, v.12, p.271–283, 2015.

GOMOLLON, F.; DIGNASS, A.; ANNESE, V. *et al.* ECCO Third European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease 2016. Part 1: diagnosis and medical management. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.11, p.3–25, 2017.

GREER, E.L.; SHI, Y. Histone methylation: a dynamics mark in health, disease and inheritance. **Nature Reviews Genetics**, v.13, n.5, p.343–357, 2012.

HANAUER, S.B.; SANDBORN, W. Management of Crohn's disease in adults. **American Journal of Gastroenterology**, v.96, n.3, p.635, 2001

HARBORD, M.; ANNESE, V.; VAVRICKA, S.R. *et al.* The First European Evidence-based Consensus on Extra-intestina Manifestations in Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.10, p.239-54, 2016.

HANEL, S. A.; VELAVAN, T. P.; KREMSNER, P. G.; KUN, J. F. Novel and functional regulatory SNPs in the promoter region of FOXP3 gene in a Gabonese population. **Immunogenetics**, v.63, n.7, p. 409-415, 2011.

HART, A.L.; AL-HASSI, H.O.; RIGBY, R.J. *et al.* Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v.129, p.50–65, 2005.

HASHEMI, V. *et al.* Polymorphism of Foxp3 gene affects the frequency of regulatory T cells and disease activity in patients with rheumatoid arthritis in Iranian population. **Immunology Letters**, v. 204, p.16–22, 2018.

He Y-Q, BO Q, YONG W, *et al.* FoxP3 genetic variants and risk of non-small cell lung cancer in the Chinese Han population. **Gene**, v. 531, p. 422–425, 2013.

HELIÖ T, HALME L, LAPPALAINEN M, *et al.* CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. **Gut**, v.52, p.558–562, 2003.

HELLER, F.; FLORIAN, P.; BOJARSKI, C. *et al.* Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. **Gastroenterology**, v.129, p.550–564, 2005.

HENCKAERTS, L.; VERMEIRE, S. NOD2/CARD15 disease associations other than Crohn's disease. **Inflammatory Bowel Disease**, v.13, p.235–241, 2007.

HOMMES, D.W.; VAN DEVENTER, S.J. Endoscopy in inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**, v.126, n.6, p.1561–73, 2004.

HOOGENDOORN, B., COLEMAN, S. L., GUY, C. A., SMITH, K., BOWEN, T., BUCKLAND, P. R., O'DONOVAN, M. C. Functional analysis of human promoter polymorphisms. **Human Molecular Genetics**, v.12, p.2249–2254, 2003.

HORI, S. The Foxp3 interactome: a network perspective of Treg cells. **Nature Immunology**. v.13, p.943–945, 2012.

HOU, J.K.; ABRAHAM, B.; EL-SERAG, H. Dietary intake and risk of developing inflammatory bowel disease: a systematic review of the literature. **American Journal of Gastroenterology**, v.106, n.4, p.563-573, 2011.

IKEYA, K.; HANAI, H.; SUGIMOTO, K. *et al.* The ulcerative colitis endoscopic index of severity more accurately reflects clinical outcomes and long-term prognosis than the Mayo Endoscopic Score. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.10, p.286–95, 2016.

ILIEV, I.D.; SPADONI, I.; MILETI, E. *et al.* Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. **Gut**, v.58, p.1481–1489, 2009.

INOUE, N.; WATANABE, M.; MORITA, M.; TOMIZAWA, R.; AKAMIZU, T.; TATSUMI, K. *et al.* Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid diseases. **Clinical & Experimental Immunology**, v.162, p.402–406, 2010.

IRVINE, E.J.; MARSHALL, J.K. Increased intestinal permeability precedes the onset of Crohn's disease in a subject with familial risk. **Gastroenterology**, v.119, p.1740–1744, 2000.

JAFARZADEH, A. *et al.* Circulating levels of interleukin-35 in patients with multiple sclerosis: evaluation of the influences of FOXP3 gene polymorphism and treatment program. **Journal of Molecular Neurosciences**, v. 55 p. 891–897, 2015.

JAHAN, P. *et al.* Association of FOXP3 (rs3761548) promoter polymorphism with nondermatomal vitiligo: A study from India. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 69, n.2, p.262-266, 2013.

JOHANSSON-LINDBOM, B.; SVENSSON, M.; PABST, O. *et al.* Functional specialization of gut CD103⁺ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. **Journal of Experimental Medicine**, v.202 p.1063–1073, 2005.

JOSEFOWICZ, S.Z. *et al.* Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. **Nature**, v.482, p.395–399, 2012.

JOSEFOWICZ, S.Z.; LU, L.F.; RUDENSKY, A.Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. **Annual Review Immunology**, v.30, p.531–564, 2012.

JOSTINS, L.; RIPKE, S.; WEERSMA, R.K. *et al.* Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. **Nature**, v.491, p.119–124, 2012.

JOWETT, S.L.; SEAL, C.J.; PEARCE, M.S. *et al.* Influence of dietary factors on the clinical course of ulcerative colitis: a prospective cohort study. **Gut**, v.53, n.10, p.1479-1484, 2004.

KAISTHA, A.; LEVINE, J. Inflammatory bowel disease: the classic gastrointestinal autoimmune disease. **Current Problems in Pediatrics Adolescents Health Care**, 44, p.328–334, 2014

KALLA, R.; VENTHAM, N.T.; KENNEDY, N.A. *et al.* MicroRNAs: new players in IBD. **Gut**, v.64, p.504–513, 2015.

KAPPELMAN, M.D.; RIFAS-SHIMAN, S.L.; KLEINMAN, K. *et al.* The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.5, p.1424–1429, 2007.

KHAN KJ *et al.* Efficacy of immunosuppressive therapy for inflammatory bowel disease: a systematic review and meta-analysis. **American Journal of Gastroenterology**, v.106, n.4, p.630-642, 2011.

KHASAWNEH, M. *et al.* The role of smoking and alcohol behaviour in the management of inflammatory bowel disease. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 31, p. 553-559, 2017.

KILIC, Z.M.Y. Plasma transforming growth factor- β 1 level in inflammatory bowel disease. **Turkish Journal of Gastroenterology**, v.20 n. 3 p. 165-170, 2009.

KIMURA, A.; KISHIMOTO, T. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. **European Journal Immunology**, v.40, p.1830–1835, 2010.

KLAGE, T.; STANGE, E.F.; WEHKAMP, J. Defective antibacterial barrier in inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases**, v.31, p.310–316, 2013.

KLINGER, A.L.; KANN, B.R. Endoscopy in Inflammatory Bowel Disease. **Surgical Clinics North America**, v.99 n.6 p. 1063-1082, 2019.

KORNBLUTH, A.; SACHAR, D.B. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. **American Journal of Gastroenterology**, v.105, n. 3, p.501-523, 2010

KOTLARZ, D.; BEIER, R.; MURUGAN, D. *et al.* Loss of interleukin-10 signaling and infantile inflammatory bowel disease: implications for diagnosis and therapy. **Gastroenterology**, v.143, p.347–355, 2012.

KOTZE, P.G.; UNDERWOOD, F.; DAMIÃO, A.O.M.C. *et al.* The progression of inflammatory bowel disease throughout Latin America: a systematic review. Poster

105 In: Crohns and Colitis Congress, Las Vegas, February 2019. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 25, p. S51-57, Feb.2019, Issue Supplement_ 1

KRISHNAN, A.; KORZENIK, J.R. Inflammatory bowel disease and environmental influences. **Gastroenterology Clinics of North America**, v.31, p.21–39, 2002.

KUZNETSOV, N.V.; ZARGARI, A.; GIELEN, A.W. *et al.* Biomarkers can predict potential clinical responders to DIMS0150 a toll-like receptor 9 agonist in ulcerative colitis patients. **BioMed Central Gastroenterology**, v.14, p.79, 2014.

LANGNER, C.; MAGRO, F.; DRIESSEN, A. *et al.*; European Society of Pathology; European Crohn's and Colitis Foundation. The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide. **Virchows Archives**, v.464, p.511–527, 2014.

LAURENCE, A. *et al.* STAT3 transcription factor promotes instability of nTreg cells and limits generation of iTreg cells during acute murine graft-versus-host disease. **Immunity**, v.37, p.209–222, 2012.

LEDDIN, D., TAMIM, H., LEVY, A.R. Decreasing incidence of inflammatory bowel disease in Eastern Canada: a population database study. **BioMed Central Gastroenterology**, v.14, p.140, 2014.

LEE, Y.K.; TURNER, H.; MAYNARD, C.L. *et al.* Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. **Immunity**, v.30, p.92–107, 2009.

LEE, M.G; BAE, S.C.; LEE, Y.H. Association between FOXP3 polymorphisms and susceptibility to autoimmune diseases: a meta-analysis. **Autoimmunity**, v.48, n.7, p. 445-452, 2015.

LENNARD-JONES, J,E; SHIVANANDA; S. Clinical uniformity of inflammatory bowel disease a presentation and during the first year of disease in the north and south of Europe. EC-IBD Study Group. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.9, p.353-359, 1997.

LENNARD-JONES, J.E. Cancer risk in ulcerative colitis: surveillance or surgery. **Bristh Journal of Surgery**, v.72, pS84, 1985, Suppl.

LEVIN, B. Inflammatory bowel disease and colon cancer. **Cancer**, v.70, p.1313, 1992.

LEWIS, J.D.; CHUAI, S.; NESSEL, L. *et al.* Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess clinical response in ulcerative colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.14, p.1660–6, 2008.

LIN, Y. C.; LEE, J. H.; WU, A. S.; TSAI, C. Y.; YU, H. H.; WANG, L. C. *et al.* Association of single-nucleotide polymorphisms in FOXP3 gene with systemic lupus erythematosus susceptibility: a case–control study. **Lupus**, v.20, p.137– 143, 2011.

- LIU, Y. *et al.* A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. **Nature Immunology**, v.9, p.632–640, 2008.
- LIU, Y. *et al.* Inhibition of p300 impairs Foxp3⁺ T regulatory cell function and promotes antitumor immunity. **Nature Medicine**, v.19, p.1173–1177, 2013.
- LOFTUS, E. V. Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: incidence, prevalence, and environmental influences. **Gastroenterology**, v.126, p.1504–1517, 2004.
- LOFTUS, E.V. JR.; SANDBORN, W.J. Epidemiology of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology Clinical North America**, v.31, p.1–20, 2002.
- LOIZOU, L.; ANDERSEN, K.G; BETZ, A.G. Foxp3 interacts with c-Rel to mediate NF- κ B repression. **PLoS ONE**, v.6:e18670, 2011.
- LU, L.; BARBI, J.; PAN, F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. **Nature Reviews Immunology**, v.17, n.11, p 703–717, 2017.
- LUTGENS, M.W.; VAN OIJEN, M.G.; VAN DER HEIJDEN, G.J. *et al.* Declining risk of colorectal cancer in inflammatory bowel disease: an updated meta-analysis of population-based cohort studies. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 19, p.789, 2013.
- MAASER, C. *et al.*. ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 1: Initial diagnosis, monitoring of known IBD, detection of complications. **J Crohns Colitis**, v.13, n.2, p.144-164, 2019.
- MAGNUSSON, M.K.; BRYNJOLFSSON, S.F.; DIGE, A. *et al.* Macrophage and dendritic cell subsets in IBD: ALDH⁺ cells are reduced in colon tissue of patients with ulcerative colitis regardless of inflammation. **Mucosal Immunology**, v.9, p.171–182, 2016.
- MAGRO, F. *et al.* Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 1: definitions, diagnosis, extra-intestinal manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch disorders. **Journal of Crohn's Colitis**, v.11, p.649–70, 2017.
- MAHID, S. S. *et al.* Inflammatory bowel disease and African Americans: a systematic review. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.14, p.960–967, 2008.
- MAILER, R.K. *et al.* IL-1 β promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. **Scientific Reports**, v.5, p.14674, 2015.
- MAK, W.Y. *et al.* The epidemiology of inflammatory bowel disease: East meets West. Disponível em <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jgh.14872> . Acesso em 25 nov. 2019. (Orcid ID: 0000-0001-5221-7349)
- MARQUES. C. R. *et al.* Genetic and epigenetic studies of FOXP3 in asthma and allergy. **Asthma Research and Practice**, v.1, n.1, p.10, 2015.

MARSON, A. *et al.* Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. **Nature**, v.445, p.931–935, 2007.

MARTEAU, P. Evaluation of disease extent with the Crohn's disease endoscopic index of severity. **Gut**, v.62, n.12, p.1819-1820, 2013.

MARY, J.Y.; MODIGLIANI, R. Development and validation of an endoscopic index of the severity for Crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'Etudes Therapeutiques des Affections Inflammatoires du Tube Digestif [GETAID]. **Gut**, v. 30, p.983–9, 1989.

MAUL, J.; LODDENKEMPER, C.; MUNDT, P. *et al.* Peripheral and intestinal regulatory CD4⁺ CD25^(high) T cells in inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**. v.128, p.1868–1878,2005.

MAYNARD, C.L.; WEAVER, C.T. Intestinal effector T cells in health and disease. **Immunity**, v.31, p.389–400, 2009.

MENEES, S.B.; POWELL, C.; KURLANDER, J.; GOEL, A.; CHEY, W.D. A meta-analysis of the utility of C-reactive protein, erythrocyte sedimentation rate, fecal calprotectin, and fecal lactoferrin to exclude inflammatory bowel disease in adults with IBS. **American Journal of Gastroenterology**, v.110, p.444–54, 2015.

MIOSSEC, P.; KOLLS, J.K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.11, p.763–776, 2012.

MITTAL, S.K.; CHO, K.J.; ISHIDO, S. *et al.* Interleukin 10 (IL-10)-mediated immunosuppression: March-I induction regulates antigen presentation by macrophages but not dendritic cells. **Journal of Biology Chemistry**., v.290, p.27158–27167, 2015.

MIYARA, M. *et al.* Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. **Immunity**, v. 30, p.899–911, 2009.

MIYASAKA, M.; TANAKA, T. Lymphocyte trafficking across high endothelial venules: dogmas and enigmas. **Nature Reviews Immunology**., v.4, p.360–370, 2004.

MOJA, L. *et al.* Systematic review with network meta-analysis: comparative efficacy and safety of budesonide and mesalazine (mesalamine) for Crohn's disease.. **Alimentary Pharmacology Therapeutic**., v.41, n.11, p.1055-65, 2015.

MOLLER, F.T.; ANDERSEN, V.; WOHLFAHRT, J.; JESS, T. Familial risk of inflammatory bowel disease: a population-based cohort study 1977–2011. **American Journal of Gastroenterology**, v.110, p.564–571, 2015.

MOLODECKY, N.A.; SOON I.S.; RABI D.M. *et al.* Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. **Gastroenterology**, v.142, p.46–54 e42; quiz e30, 2012

MOMOZAWA, Y.; MNI M.; NAKAMURA, K. *et al.* Resequencing of positional candidates identifies low frequency IL23R coding variants protecting against inflammatory bowel disease. **Nature Genetics**, v.43, p.43–47, 2011.

MONICK, M.M.; POWERS, L.S.; WALTERS, K. *et al.* Identification of an autophagy defect in smokers' alveolar macrophages. **Journal of Immunology**, v.185, n.9, p.5425-5435, 2010

MONTELEONE, G.; BIANCONE, L.; MARASCO, R. *et al.* Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. **Gastroenterology**, v.112, p.1169–1178, 1997.

MONTELEONE, G.; KUMBEROVA, A.; CROFT, N.M. *et al.* Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. **Journal of Clinical Investigation**, v.108, p.601–609, 2001.

MONTELEONE, G.; MONTELEONE, I.; FINA, D. *et al.* Interleukin-21 enhances T-helper cell type I signaling and interferon-gamma production in Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.128, p.687–694, 2005.

MORAN, C.J.; WALTERS, T.D.; GUO, C.H. *et al.* IL-10R polymorphisms are associated with very-early-onset ulcerative colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.19, p.115–123, 2013.

MORIKAWA, H.; SAKAGUCHI, S. Genetic and epigenetic basis of Treg cell development and function: from a FoxP3-centered view to an epigenome-defined view of natural Treg cells. **Immunology Reviews**, v. 259, p.192–205, 2014.

MOWAT, A. M.; BAIN, C. C. Mucosal macrophages in intestinal homeostasis and inflammation. **Journal of Innate Immunity**, v.3, p.550-564, 2011.

MUISE, A.M; WALTERS, .TD.; GLOWACKA, W.K. *et al.* Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localized cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease. **Gut**, v.58, p.1121–1127, 2009.

NAHON, S.; BOUHNİK, Y.; LAVERGNE-SLOVE, A. *et al.* Colonoscopy accurately predicts the anatomical severity of colonic Crohn's disease attacks: correlation with findings from colectomy specimens. **American Journal of Gastroenterology**, v.97, p. 3102-7, 2002.

NALLEWEG ,N.; CHIRIAC, M.T.; PODSTAWA, E. *et al.* IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC. **Gut**, v.64, p.743–755, 2015.

NEURATH, M.F. Cytokines in inflammatory Bowel disease, **Nature reviews Immunology**, v.14 p.329–342, 2014.

NG, S.C.; TSOI, K.K.F.; KAMM, M.A. *et al.* Genetics of inflammatory bowel disease in Asia: systematic review and meta-analysis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.18, p.1164–1176, 2012.

NG, S.C.; SHI, H.Y.; HAMIDI, N. *et al.* Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. **The Lancet**, v.390, n.1014, p.2769-2778, 2018.

NG, S.C.; TANG, W.; LEONG, R.W. *et al.*; Asia-Pacific Crohn's and Colitis Epidemiology Study ACCESS Group. Environmental risk factors in inflammatory bowel disease: a population-based case-control study in Asia-Pacific. **Gut**, v.64, n.7, p.1063-1071, 2015.

NISHIDA, A.; INOUE, R.; INATOMI, O.; BAMBA, S.; NAITO, Y.; ANDOH, A. Gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Clinical Journal of Gastroenterology**, v.11, n.1, p.1-10, 2018.

NOGUCHI, E.; HOMMA, Y.; KANG, X. *et al.* A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. **Nature Immunology**, v.10, p.471–479, 2009.

O'GARRA A, VIEIRA P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. **Nature Medicine**, v.10, p.801–805, 2004.

OHKURA, N.; HAMAGUCHI, M.; MORIKAWA, H. *et al.* T cell receptor stimulation-induced epigenetic changes and Foxp3 expression are independent and complementary events required for Treg cell development. **Immunity**, v.37, n.5, p.785–799, 2012.

OHKURA, N.; KITAGAWA Y.; SAKAGUCHI, S. Development and maintenance of regulatory T cells. **Immunity**, v.38, n.3, p.414–423, 2013.

OLSZAK, T.; ZEISSIG, S. *et al.* Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. **Science**, v.336 (6080), p.489-493, 2012.

ORHOLM, M.; FONAGER, K.; SØRENSEN, H.T. Risk of ulcerative colitis and Crohn's disease among offspring of patients with chronic inflammatory bowel disease. **American Journal of Gastroenterology**, v.94, p.3236–3238, 1999.

OTT, C.; SCHÖLMERICH, J. Extraintestinal manifestations and complications in IBD. **Nature Reviews of Gastroenterology and Hepatology**, v.10, n.10, p.585-595, 2013.

OUYANG, W.; BECKETT, O.; MA, Q.; LI, M.O. Transforming growth factor- β signaling curbs thymic negative selection promoting regulatory T cell development. **Immunity**, v.32, n.642–653, 2010.

PANACCIONE, R. *et al.* Combination therapy with infliximab and azathioprine is superior to monotherapy with either agent in ulcerative colitis. **Gastroenterology**, v.146, n.2, p.392-400.e3., 2014.

PANES, J.; BOUHNİK, Y.; REINISCH, W. *et al.* Imaging techniques for assessment of inflammatory bowel disease: joint ECCO and ESGAR evidence-based consensus guidelines. **Journal of Crohns & Colitis**, v.7, p. 556–85, 2013.

PAPAY, P.; IGNJATOVIC, A.; KARMIRIS, K. *et al.* Optimising monitoring in the management of Crohn's disease: a physician's perspective. **Journal of Crohns & Colitis**, v.7, p. 653–69, 2013.

PARADOWSKA-GORYCKA A, JURKOWSKA M, FELIS-GIEMZA A, *et al.* Genetic polymorphisms of FOXP3 in patients with rheumatoid arthritis. **The Journal of Rheumatology**, v. 42, p. 170–180, 2015.

PARK, J.H.; PEYRIN-BIROULET, L.; EISENHUT, M. *et al.* IBD immunopathogenesis: a comprehensive review of inflammatory molecules. **Autoimmunity Reviews**, v.16, p.416–426, 2017.

PARK, O.; GRISHINA, I.; LEUNG, P. S.; GERSHWIN, M. E.; PRINDIVILLE, T. Analysis of the Foxp3/scurfin gene in Crohn's disease. **Annals of New York Academy Sciences**, v.1051, p.218–228, 2005.

PARKES, G.C.; WHELAN, K.; LINDSAY, J. O. Smoking in inflammatory bowel disease: Impact on disease course and insights into the aetiology of its effect. **Journal of Crohns & Colitis**, v.8, n.8, p.717-25, 2014.

PATEL, V. *et al.* Methotrexate for maintenance of remission in Crohn's disease. **Cochrane Database Systematic Reviews**, v.8, CD006884, 2014

PEDERSEN, G.; ANDRESEN, L.; MATTHIESSEN, M.W. *et al.* Expression of Toll-like receptor 9 and response to bacterial CpG oligodeoxynucleotides in human intestinal epithelium. **Clinical & Experimental Immunology**, v.141, p.298–306, 2005.

PENE, J.; CHEVALIER, S.; PREISSER, L. *et al.* Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. **Journal of Immunology**, v.180, p.7423–7430, 2008.

PERA, A. Review article: Crohn's disease: monitoring disease activity. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v.17, p.11–7, 2003, Suppl 2.

PERA, A.; BELLANDO, P.; CALDERA, D. *et al.* Colonoscopy in inflammatory bowel disease. Diagnostic accuracy and proposal of an endoscopic score. **Gastroenterology**, v.92, p.181–5, 1987.

PETERSON, L.W.; ARTIS, D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, v.14, p.141–153, 2014.

PEYRIN-BIROULET, L.; SANDBORN, W.; SANDS, B.E. *et al.* Selecting Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Disease [STRIDE]: determining therapeutic goals for treat-to-target. **American Journal of Gastroenterology**, v.110, p.1324–38, 2015.

PIGNEUR, B.; ESCHER, J.; ELAWAD, M. *et al.* Phenotypic characterization of very early-onset IBD due to mutations in the IL10, IL10 receptor alpha or beta gene: a survey of the Genius Working Group. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.19, p.2820–2828, 2013.

PLEVY, S. Do serological markers and cytokines determine the indeterminate? **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.38, S51–6, 2004.

POWELL-TUCK, J.; DAY, D.W.; BUCKELL, N.A.; WADSWORTH, J.; LENNARD-JONES, J.E. Correlations between defined sigmoidoscopic appearances and other measures of disease activity in ulcerative colitis. **Digestive Disease Sciences**, v.27, p.533–7, 1982.

PRANTERA, C. *et al.* An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled clinical trial of metronidazole plus ciprofloxacin. **American Journal of Gastroenterology**, v.91, n.2, p.328-332, 1996.

QUARESMA, A. B.; KAPLAN, G. G.; KOTZE, P. The globalization of inflammatory bowel disease: the incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Brazil. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.35, p.250-264, 2019.

QIU, Y. *et al.* Safety profile of thiopurines in Crohn disease: analysis of 893 patient-years follow-up in a Southern China cohort. **Medicine**, v.94, n.41, p. e1513, 2015.

RAMOS, G. P.; PAPADAKIS, K. A. Mechanisms of Disease: Inflammatory Bowel Diseases. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 1, p. 155-165, 2019.

RAMSDELL, F.; ZIEGLER, S.F. FOXP3 and scurfy: how it all began. **Nature Reviews Immunology**, v.14, p.343–349, 2014.

RAO, S.S.; HOLDSWORTH, C.D.; READ, N. W. Symptoms and stool patterns in patients with ulcerative colitis. **Gut**, v.29, p.342–5, 1988.

REESE, G. E.; CONSTANTINIDES, V. A.; SIMILLIS, C. *et al.* Diagnostic precision of anti-*Saccharomyces cerevisiae* antibodies and perinuclear antineutrophil cytoplasmic antibodies in inflammatory bowel disease. **American Journal Gastroenterology**, v.101, p.2410–22, 2006.

REZAIIE, A. *et al.* Budesonide for induction of remission in Crohn's disease. **Cochrane Database Systematic Reviews**, v.6, CD000296, 2015

RIMOLDI, M.; CHIEPPA, M.; SALUCCI, V. *et al.* Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. **Nature Immunology**, v.6, p.507–514, 2005.

RODRÍGUEZ-PERALVAREZ, M.L. *et al.*, Role of sérum Cytokine Profile in Ulcerative Colitis Assessment. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.12, p. 1864-1871, 2012.

ROVEDATTI, L.; KUDO, T.; BIANCHERI, P. *et al.* Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. **Gut**, v.58, p.1629–1636, 2009.

RUDRA, D. *et al.* Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. **Nature Immunology**, v.13, p.1010–1019, 2012.

SAIGUSA, K.; MATSUOKA, K.; SUGIMOTO, S. *et al.* Ulcerative colitis endoscopic index of severity is associated with long-term prognosis in ulcerative colitis patients treated with infliximab. **Digestive Endoscopy**, v.28, p.665–70, 2016.

SALIM, S.Y.; SODERHOLM, J.D. Importance of disrupted intestinal barrier in inflammatory bowel diseases. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.17, p.362–381, 2011.

SAMSTEIN, R.M. *et al.* Foxp3 exploits a pre-existent enhancer landscape for regulatory T cell lineage specification. **Cell**, v.151, p.153–166, 2012.

SANDBORN, W.J. *et al.* GEMINI 2 Study Group. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. **New England Journal of Medicine**, v.369, n.8, p.711-721, 2013.

SANDBORN, W.J.; SU, C.; SANDS, B.E. *et al.* Tofacitinib as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. **New England Journal of Medicine**, v.376, p.1723–1736, 2017.

SANDLER, R.S.; LOFTUS, E.V. JR: Epidemiology of inflammatory bowel disease; in Sartor RB, Sandborn WJ (eds): **Kirsner's Inflammatory Bowel Diseases**, ed 6. Philadelphia, Saunders, 2004, p.245-262.

SANDS, B.E. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. **Gastroenterology**, v.126, p.1518-1532, 2004.

SARTOR, R.B.; WU, G.D. Roles for intestinal bacteria, viruses, and fungi in pathogenesis of inflammatory bowel diseases and therapeutic approaches. **Gastroenterology**, v.152, n.2, p.327-339.e4, 2017.

SATSANGI, J.; SILVERBERG, M.S.; VERMEIRE, S. *et al.* The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. **Gut**, v.55, p.749-753, 2006.

SEHGAL, R.; KOLTUN, W. A. Scoring systems in inflammatory bowel disease. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, v.4, n.4, p. 513–521, 2010.

SCHWARTZ, D.A. *et al.* The natural history of fistulizing Crohn's disease in Olmsted County, Minnesota. **Gastroenterology**, v.122, n.4, p.875-880, 2002.

SHAW, S.Y.; BLANCHARD, J.F.; BERNSTEIN, C.N. Association between the use of antibiotics in the first year of life and pediatric inflammatory bowel disease. **American Journal of Gastroenterology**, v.105, n.12, p.2687-2692, 2010.

SHER, M.E.; BANK, S.; GREENBERG, R. *et al.* The influence of cigarette smoking on cytokine levels in patients with inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.5, n.2, p.73-78, 1999.

SHERGILL, A.K. *et al.* The role of endoscopy in inflammatory bowel disease. **Gastrointestinal Endoscopy**, v.81, n.5, p.1101-1121, 2015.

SHEVACH, E. M. Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. **Immunity**, v.30, p.636–645, 2009.

SHUAI K, LIU B. Regulation of JAK-STAT signaling in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v.3, p.900–911, 2003.

SILVERBERG, M.S.; SATSANGI, J.; AHMAD ,T. *et al.* Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v.19, p.5-36, 2005, Suppl A.

SIMON, E.G.; GHOSH, S.; IACUCCI, M.; MORAN, G.W. Ustekinumab for the treatment of Crohn's disease: can it find its niche? **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v.9, p.26–36, 2016.

SINGH, S.; GRAFF, L. A. ; BERNSTEIN, C. N. Do NSAIDs, antibiotics, infections, or stress trigger flares in IBD? **American Journal of Gastroenterology**, v.104, p.1298–1313, 2009.

SMITH, E.L.; FINNEY, H.M.; NESBITT, A.M.; RAMSDELL, F.; ROBINSON, M.K. Splice variants of human FOXP3 are functional inhibitors of human CD4+ T-cell activation. **Immunology**, v.119, p.203–211, 2006.

SOSTEGNI, R. *et al.* Review article: Crohn's disease: monitoring disease activity. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v.17, p.11-7, 2003. Supl. 2.

SPITS, H.; ARTIS, D.; COLONNA, M. *et al.* Innate lymphoid cells-a proposal for uniform nomenclature. **Nature Reviews Immunology**, v.13, p. 145–149, 2013.

STAUDT, V.; BOTHUR, E.; KLEIN, M. *et al.* Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. **Immunity**, v.33, p.192–202, 2010.

STEPHENS, M.; SCHEET, P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. **Journal of Human Genetics**, v.76, n.3, p.449-62, 2005.

STEPHENS, M.; SMITH, N.J.; DONNELLY, P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. **American Journal of Human Genet.**, v.68, n.4, p.978-89, 2001.

STEINHART, A.H. *et al.* Corticosteroids for maintenance of remission in Crohn's disease. **Cochrane Database Systematic Review.**, v.4, CD000301, 2003.

STURM, A. *et al.* ECCO-ESGAR Guideline for Diagnostic Assessment in IBD Part 2: IBD scores and general principles and technical aspects. **Journal of Crohn's and Colitis**, v.13, n.3, p.273-290, 2019.

SUTHERLAND, L.R.; MARTIN, F.; GREER, S. *et al.* 5-Aminosalicylic acid enema in the treatment of distal ulcerative colitis, proctosigmoiditis, and proctitis. **Gastroenterology**, v.92, p.1894–8, 1987.

TAO, J H., CHENG, M., LIU, T.Q., PAN, F., LI, X.P. Foxp3, Regulatory T Cell, and Autoimmune Diseases. **Inflammation**, v.40, n.1, p.328-339, 2016.

THEODOSSI, A.; SPIEGELHALTER, D.J.; JASS, J. *et al.* Observer variation and discriminatory value of biopsy features in inflammatory bowel disease. **Gut**, v.35, p.961-8, 1994.

THOMAS, G. A. O. *et al.* Role of smoking in inflammatory bowel disease: implications for therapy. **Postgraduate Medical Journal**, v. 76, n.895, p. 273-279, 2000.

THOMPSON, A.I.; LEES, C.W. Genetics of ulcerative colitis. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.17, p.831–848, 2011.

THORNTON, A.M.; DONOVAN, E.E.; PICCIRILLO, C.A.; SHEVACH, E.M. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. **Journal of Immunology**, v.172, p.6519–6523, 2004.

TIMMER, A. Environmental influences on inflammatory bowel disease manifestations: lessons from epidemiology. **Digestive Diseases**, v.21, p.91–104, 2003.

TOM, M.; GREENE, M. I. Cooperative regulatory events and Foxp3 expression. **Nature Immunology**, v.12, p.14–16, 2011.

TONTINI, G.E.; BISSCHOPS, R.; NEUMANN, H. Endoscopic scoring systems for inflammatory bowel disease: pros and cons. **Expert Reviews in Gastroenterology & Hepatology**, v.8, n.5, p.543-54, 2014.

TOROK, H.P; GLAS, J.; TONENCHI, L. *et al.* Crohn's disease is associated with a toll-like receptor-9 polymorphism. **Gastroenterology**, v.127, p.365–366, 2014.

TORRES *et al.* Crohn's disease. **The Lancet**, v.389, p.1741-1755, 2017.

TRAVIS, S.P.; JEWELL, D.P. Ulcerative colitis: clinical presentation and diagnosis. In: Satsangi J, Sutherland LR, editors. **Inflammatory Bowel Diseases**. London, Churchill Livingstone, 2003, p.169–81.

TRAVIS, S.P.; SCHNELL, D.; KRZESKI, P. *et al.* Developing an instrument to assess the endoscopic severity of ulcerative colitis: the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity [UCEIS]. **Gut**, v.61, p.535–42, 2012.

TRAVIS, S.P.; SCHNELL, D.; KRZESKI, P. *et al.* Reliability and initial validation of the ulcerative colitis endoscopic index of severity. **Gastroenterology**, v.145, p.987–995, 2013.

TRUELOVE, S.C.; WITTS, L.J. Cortisone in ulcerative colitis; final report on a therapeutic trial. **British Medical Journal**, v.2, p.1041–8, 1955.

UNGARO, R. *et al.* Ulcerative colitis. **The Lancet**, v.389, n. 10089, p. 1756-1770, 2017.

UK IBD Genetics Consortium, Barrett, J.C.; Lee, J.C.; Lees, C.W. *et al.* Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. **Nature Genetics**, v.41, p.1330–1334, 2009.

VAN DER SLUIS, M.; DE KONING, B.A.E.; DE BRUIJN, A.C.J.M. *et al.* Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. **Gastroenterology**, v.131, p.117–129, 2006.

VAVRICKA, S.R.; SCHOEPFER, A.; SCHARL, M. *et al.* Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.21, n.8, p.1982-1992, 2015.

VELDHOEN, M.; UYTENHOVE, C.; VAN SNICK, J. *et al.* Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. **Nature Immunology**, v.9, p.1341–1346, 2008.

VERMEIRE, S.; VAN ASSCHE, G.; RUTGEERTS, P. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary toys? **Gut**, v.55, p.426–31, 2006.

VERMEIRE, S.; VAN ASSCHE, G.; RUTGEERTS, P. The role of C-reactive protein as an inflammatory marker in gastrointestinal diseases. **Nature Clinical Practice in Gastroenterology & Hepatology**, v.2, p.580–6, 2005.

VINOLO, M.A.; RODRIGUES, H.G.; NACHBAR, R.T.; CURI, R. Regulation of inflammation by short chain fatty acids. **Nutrients**, v.3, n.10, p.858-876, 2011.

VON ROON, A.C.; KARAMOUNTZOS, L.; PURKAYASTHA, S. *et al.* Diagnostic precision of fecal calprotectin for inflammatory bowel disease and colorectal malignancy. **American Journal of Gastroenterology**, v.102, p.803–13, 2007.

WANG, C.; YUAN, X.; MA, E. *et al.* NOD2 is dispensable for ATG16L1 deficiency-mediated resistance to urinary tract infection. **Autophagy**, v.10, p.331–338, 2014.

WEERSMA, R.K.; ZHERNAKOVA, A.; NOLTE, I.M. *et al.* ATG16L1 and IL23R are associated with inflammatory bowel diseases but not with celiac disease in the Netherlands. **American Journal of Gastroenterology**, v.103, p.621–627, 2008.

WEIGMANN, B.; NEURATH, M.F. Th9 cells in inflammatory bowel diseases. **Seminars in Immunopathology**, v.39, p.89–95, 2017.

WILDIN, R. S.; SMYK-PEARSON, S.; FILIPOVICH, A. H. Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. **Journal of Medicine Genetics**, v.39, p. 537–545, 2002.

WILLIAMS, L. M.; RUDENSKY, A. Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. **Nature Immunology**, v.8, p.277–284, 2007.

WILLIAMS, H.; WALKER, D.; ORCHARD, T.R. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. **Current Gastroenterology Reports**, v.10, n.6, p.597-605, 2008.

WU, Y. et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. **Cell**, v.126, p.375–387, 2006.

WU, Y.; BORDE, M.; HEISSMEYER, V.; FEUERER, M.; LAPAN, A. D.; STROUD, J. C. et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. **Cell**, v.126, p.375–387, 2006.

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

XIA, S.L. et al. Association of Crohn's disease with Foxp3 gene polymorphisms and its colonic expression in Chinese patients. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v.33:e22835, 2019a.

XIA, S.L. et al. Association of Ulcerative Colitis with FOXP3 Gene Polymorphisms and Its Colonic Expression in Chinese Patients. **Gastroenterology Research and Practice**, v.2019, p.1-10, 2019b.

YAL, Z.M. et al. Plasma transforming growth factor 1 level in inflammatory bowel disease. **Turkish Journal of Gastroenterology**, v.20, n.3, p.165-170, 2009.

YAMADA, A.; ARAKAKI, R.; SAITO, M. et al. Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v.22, p.2195–2205, 2016.

YAMAMOTO, T.; WATANABE, T. Surgery for luminal Crohn's disease. **World Journal of Gastroenterology**, v.20, n.1, p.78-90, 2014.

YANG, S.K.; LOFTUS, E.V. JR.; SANDBORN, W.J. Epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.7, p.260–270, 2001.

ZENEWICZ, L.A.; ANTOV, A.; FLAVELL, R.A. CD4 T-cell differentiation and inflammatory bowel disease. **Trends in Molecular Medicine**, v.15, p.199–207, 2009.

ZHANG, L.; ZHANG, Y.; DESROSIERS, M.; WANG, C.; ZHAO, Y.; HAN, D. Genetic association study of FOXP3 polymorphisms in allergic rhinitis in a Chinese population. **Human Immunology**, v.70, p.930–934, 2009.

ZHAO, M.; BURISCH, J. Impact of genes and the environment on the pathogenesis and disease course of inflammatory bowel disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v.4, p.1759-1769, 2019.

ZHENG, Y. *et al.* Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. **Nature**, v.44, p.936–940, 2007.

ZHENG, Y.; JOSEFOWICZ, S.; CHAUDHRY A. *et al.* Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. **Nature**, v.463, n.7282, p. 808–812, 2010.

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

ZHOU, L.; IVANOV, I.I.; SPOLSKI, R. *et al.* IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. **Nature Immunology**, v.8, p.967–974, 2007.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W.E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annals Reviews in Immunology**, v.28, p.445–489, 2010.

ZUNDLER, S.; NEURATH, M.F. Immunopathogenesis of inflammatory Bowel diseases: functional role of T cells and T cell homing. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.33, p.S19–S28, 2015.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado(a) Senhor(a):Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa **“AVALIAÇÃO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS, DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E DOS BIOMACADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL: ASSOCIAÇÃO COM A ATIVIDADE DA DOENÇA”**, a ser realizada no Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital Universitário de Londrina . O objetivo da pesquisa é “estudar os mecanismos imunológicos, genético e de estresse oxidativo envolvidos na Doença Intestinal Inflamatória”. Sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: realização de uma avaliação clínica pelo médico gastroenterologista e uma coleta de sangue.

Esclarecemos que sua participação é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Esclarecemos, também, que suas informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade. Todos os dados coletados, clínicos e laboratoriais, serão descartados após a publicação do estudo. Esclarecemos ainda, que o(a) senhor(a) não pagará e nem será remunerado(a) por sua participação.

Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação. A sua participação neste estudo contribuirá para o melhor entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento da doença. Quanto aos riscos, informamos que sua participação não acarretará em qualquer risco à sua saúde nem alteração de qualquer um dos seus tratamentos. A coleta de sangue pode ocasionar sinais decorrentes da punção venosa e consiste: dor no local da punção venosa ou pequeno hematoma e, muito raramente, vermelhidão ou infecção local. Mesmo sendo mínimos, caso ocorra algum tipo de desconforto o participante

será prontamente atendido e amparado pelos farmacêuticos responsáveis pela coleta de sangue e um dos pesquisadores deste estudo.

Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar (**Andréa Name Colado Simão, Avenida Robert Koch 60, telefone: 3371-2321, 99627-8181**), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC – Laboratório Escola, no Campus Universitário, telefone 3371- 5455, e-mail: cep268@uel.br.m

Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor(a).

Londrina, ____ de _____ de 201_.

Pesquisadores Responsáveis:

Profa Dra. Andréa Name Colado Simão

RG: 6.226.736-4

Tel: 3371-2321 / 99627-8181

_____ tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura : _____

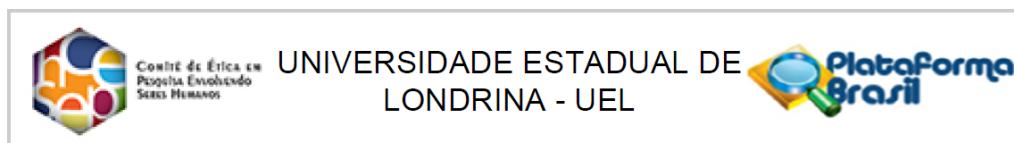
Data: _____

APÊNDICE B - FICHA DE AVALIAÇÃO PROJETO DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Nome:	Prontuário:
DN:	Idade na coleta:
Telefone:	
Etnia: () Caucasiano	() Não Caucasiano
Sexo: () Feminino	() Masculino
Peso:	Altura:
Circ. Abdominal:	IMC:
Fumante: () Não () Sim	PA:
Etilismo: () Não () Sim	Frequência semanal:
	Frequência semanal:
Diagnóstico: () Doença de Crohn	() Retocolite Ulcerativa
Depressão: () Sim	() Não
Medicamentos	
Antioxidantes/Vitaminas:	
Mesalazina: () oral () retal	Dose:
Sulfassalazina:	Dose:
Azatioprina:	Dose:
Metotrexate:	Dose:
Inibidores de TNF: () Infliximabe	Dose:
() Adalimumabe	Dose:
Prednisona:	Dose:
Outros Medicamentos:	
Metformina:	
Sinvastatinas:	
Anti-hipertensivos:	
Outros:	
Atividade da Doença: () Sim () Não	
Clínico: CDAI	
TrueLove Whit:	
Endoscópico: Mayo:	
Rutgeers:	
CDEIS:	
Outras doenças:	

ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de polimorfismos genéticos, da resposta imunológica e dos biomarcadores de estresse oxidativo em pacientes com doença inflamatória intestinal: associação com a atividade da doença

Pesquisador: Andréa Name Colado Simão

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 91833018.2.0000.5231

Instituição Proponente: CCS - Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicologias

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.767.257

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo caso-controle prospectivo. Serão avaliados 200 indivíduos controles e 200 pacientes com Doença Inflamatória Intestinal (DII), de ambos os sexos e com idade entre 18 a 70 anos, atendidos pelo ambulatório de gastroenterologia do Ambulatório de Especialidade do Hospital Universitário (AEHU) cuja contribuição para a pesquisa será a realização de uma avaliação clínica pelo médico gastroenterologista e uma coleta de sangue. O grupo controle será composto por indivíduos avaliados em projeto de pesquisa anterior, cuja amostras já foram coletadas (CAAE: 06405812.1.0000.5231) e os testes laboratoriais já realizados. As DIIs são caracterizadas por condições inflamatórias crônicas em resposta a um desequilíbrio imunológico da mucosa intestinal, principalmente associado às células do sistema imune adaptativo que reconhecem autoantígenos. Os dois grandes exemplos destas doenças são a Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI) e a Doença de Crohn (DC). A RCUI caracteriza-se por uma inflamação limitada à mucosa colônica em um processo que envolve o reto em 95% dos casos e manifesta-se principalmente com diarreia sanguinolenta associada a tenesmo e urgência fecal. Já a DC pode acometer todo o trato digestório, desde a boca até o ânus, e é caracterizada por formação de estenoses, fístulas, úlceras e granulomas na mucosa. A hipótese do presente estudo é que o polimorfismo genético (PCR, TNF-, CCR5, FOXP3) junto com os biomarcadores imunológicos e estado redox dos pacientes com DII estejam associados com a atividade da doença.

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

CEP: 86.057-970

UF: PR **Município:** LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br