



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

TALITA CRISTINA GALVÃO

**AVALIAÇÃO DAS VARIANTES DOS GENES DA
INTERLEUCINA-10 (rs1800872) E DO FATOR
TRANSFORMADOR DE CRESCIMENTO BETA-1
(rs1800469) EM PACIENTES COM DOENÇA
INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

Londrina
2020

TALITA CRISTINA GALVÃO

**AVALIAÇÃO DAS VARIANTES DOS GENES DA
INTERLEUCINA-10 (rs1800872) E DO FATOR
TRANSFORMADOR DE CRESCIMENTO BETA-1
(rs1800469) EM PACIENTES COM DOENÇA
INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Patologia, Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial.

Orientador: Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy.

Londrina
2020

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

G182 Galvão, Talita Cristina .
AVALIAÇÃO DAS VARIANTES DOS GENES DA INTERLEUCINA-10 (rs1800872) E DO FATOR TRANSFORMADOR DE CRESCIMENTO BETA-1 (rs1800469) EM PACIENTES COM DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL / Talita Cristina Galvão. - Londrina, 2020.
79 f. : il.

Orientador: Marcell Alysson Batisti Lozovoy.
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. Variantes Genéticas - Tese. 2. Doença Inflamatória Intestinal - Tese. 3. IL-10 -592 C>A - Tese. 4. TGFB1 -509 C>T - Tese. I. Lozovoy, Marcell Alysson Batisti . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial. III. Título.

CDU 61

TALITA CRISTINA GALVÃO

**AVALIAÇÃO DAS VARIANTES DOS GENES DA
INTERLEUCINA-10 (rs1800872) E DO FATOR
TRANSFORMADOR DE CRESCIMENTO BETA-1
(rs1800469) EM PACIENTES COM DOENÇA
INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcell Alysson Batisti Lozovoy
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Edna Maria Vissoci Reiche
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Karen Brajão de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de março de 2020.

Dedico este trabalho a minha família que sempre me incentivou a estudar e batalhar pelos meus objetivos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os pacientes que participaram deste estudo e depositaram em nós a esperança de que nossos resultados possam servir como base para novas estratégias que melhorem a qualidade de vida deles.

À minha família que sempre investiu em mim. Minha avó que mesmo quando estava internada me incentivava a cumprir as atividades do projeto. Meu avô que muitas vezes não entendia a minha ausência, mas sempre me auxiliou quando precisei. Minha mãe que não me deixou desistir. Meu padrasto que me auxiliou com meus avós. E minha irmã que mesmo sem saber me deu forças para fazer o meu melhor na tentativa de ser um exemplo para ela.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcell Lozovoy por aceitar me orientar e por todo o suporte ao longo desses dois anos. À Prof. Dra. Andrea Simão por ter me incentivado a entrar no programa de mestrado, por toda a compreensão e por não me deixar desistir. À banca, prof^a Dra. Edna Reiche e prof^a Dra. Karen Brajão por aceitarem o convite e por todas as correções.

Às minhas colegas de projeto: Cláudia Inoue, Beatriz Piantoni, Jaqueline Castardo, Camila Cataldi, Tamires Flauzino, Paula Kikuchi, Nayara Mari. À Ana Gabriela Bonacini pelo auxílio na estatística e às demais colegas do laboratório de pesquisa em Imunologia.

A todos os servidores que nos auxiliaram no decorrer do projeto: funcionários da coleta do Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário (AEHU), do ambulatório da Gastroenterologia do AEHU, da Endoscopia do Hospital Universitário (HU), dos Laboratórios de Análises Clínicas (LAC) do HU.

Às minhas amigas Tatyane Duran, Laíne Vieira e Erika Teshima que me acompanham e me apoiam em todos os momentos.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada!

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”

Isaac Newton

GALVÃO, Talita Cristina. **Avaliação das variantes dos genes da Interleucina-10 (rs1800872) e do fator transformador de crescimento Beta1 (rs1800469) em pacientes com doença inflamatória intestinal.** 2020. 79 f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

RESUMO

Introdução: Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são doenças crônicas, imunomediadas, que afetam o trato gastrointestinal. DII consistem em dois subtipos: Retocolite Ulcerativa (RCU) e doença de Crohn (DC). Acredita-se que as DII se desenvolvam como resultado de interações entre fatores ambientais, microbianos e imunomediados em um hospedeiro geneticamente suscetível. No geral, citocinas anti-inflamatórias desempenham um papel na DII incluindo a interleucina 10 (IL-10) e o fator transformador do crescimento β (TGF- β). As diferenças na produção de citocinas têm sido associadas a variações genéticas nas regiões gênicas relacionadas à estas citocinas. Diferenças individuais na síntese de citocinas poderiam explicar a suscetibilidade à DII e sua heterogeneidade fenotípica. Estudos sobre a influência das variantes genéticas de *TGF β 1* e *IL10* na patogênese da DII foram publicados com resultados controversos. **Objetivo:** Avaliar a associação entre DII, RCU e DC e as variantes genéticas *TGFB1* -509 C>T (rs1800469) e *IL10* -592 C>A (rs1800872) e examinar a associação entre essas variantes e as citocinas presentes na DII, assim como verificar a associação com a atividade das doenças. **Sujeitos e Métodos:** O estudo incluiu 178 pacientes com DII, 89 com RCU e 89 com DC, de ambos os sexos e com idades entre 18 e 70 anos, recrutados no Ambulatório de Gastroenterologia da Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Sul do Brasil e 171 indivíduos saudáveis. A atividade da doença foi estabelecida pelos escores parcial, total e endoscópico MAYO para RCU e Índice de Atividade da Doença de Crohn (CDAI) para DC. Após jejum de 12 horas, foram obtidas amostras de sangue venoso. Os níveis plasmáticos de TGF- β 1 e IL-10 foram avaliados usando um sistema de detecção baseado em imunofluorimetria. O DNA foi extraído das células sanguíneas periféricas usando um kit comercial. A concentração de DNA foi medida em 260 nm. Para genotipar a *IL10* -592 C>A, após a amplificação de um fragmento de 154 pb do gene *IL10*, este foi submetido à digestão com a enzima de restrição *Rsal*. Os produtos de digestão foram analisados de acordo com o polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP). As variantes *TGFB1* -509 C>T foram genotipadas pelo ensaio de discriminação alélica TaqMan no sistema de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). **Resultados:** Os pacientes com DII não diferiram na idade, sexo, etnia e índice de massa corporal dos controles ($p > 0,05$). Os níveis de IL-10 e TGF- β 1 aumentaram significativamente nas DII em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$). A variante *IL10* -592 C>A não foi associada a pacientes com DII, RCU ou DC. O *TGFB1* -509 C>T não apresentou diferença significativa na DII, na RCU e na DC e nos pacientes quando comparados aos controles no modelo alélico ($p = 0,418$; $p = 0,653$; $p = 0,381$, respectivamente). O genótipo *IL10* CC da variante -592 C>A apresentou maiores níveis plasmáticos de TGF- β 1 ($p = 0,035$). Os níveis plasmáticos de IL-10 e TGF- β 1 não diferiram entre os pacientes com RCU ($p = 0,553$; $p = 0,510$, respectivamente) em relação a remissão da doença avaliada pelo escore total de MAYO. Não houve associação entre o escore

total de MAYO e *IL10* -592 C>A no modelo codominante, dominante ou recessivo em pacientes com RCU [(CC vs CA p=0,492; CC vs AA p=0,103); (CC vs CA+AA; p=0,243), (CC+CA vs AA; p=0,127) respectivamente], e no modelo genotípico do *TGFB1* -509 C>T [(CC vs CT p=0,080; CC vs TT p=0,846); (CC vs CT+TT; p=0,143), (CC+CT vs TT; p=0,693) respectivamente. Em relação aos pacientes com DC, os níveis de IL-10 foram maiores em pacientes com Índice Endoscópico de Gravidade da Doença de Crohn (CDEIS) >8 quando comparados com CDEIS ≤8 (p=0,046). Níveis de TGF-β1 não diferiram entre grupos em relação ao CDEIS (p=0.362). A variante genética da *IL10* e *TGFB1* não mostraram diferenças significativas em pacientes com DC em relação ao CDEIS em nenhum modelo de genótipo. [(CC vs CA p=0.891; CC vs AA p=0,460); (CC vs CA+AA; p=0,922), (CC+CA vs AA; p=0,418) respectivamente] e [(CC vs CT p=0,472; CC vs TT p=0,439); (CC vs CT+TT; p=0,404), (CC+CT vs TT; p=0.566) respectivamente]. **Conclusão:** Pacientes com DII apresentam níveis mais elevados de IL-10 e TGF-β1, tanto na DC quanto na RCU, quando comparados com os controles. O genótipo *IL10* CC da variante -592 C>A foi associado a maiores níveis plasmáticos de TGF-β. O genótipo *TGFB1* TT da variante -509 C>T foi associado a níveis mais altos de TGF-β1 em pacientes com RCU. A descoberta de novas variantes genéticas associadas à DII pode contribuir para o tratamento personalizado destes pacientes.

Palavras-chave: doença de Crohn; retocolite ulcerativa; *IL-10* -592 C>A; *TGFB1* -509 C>T; polimorfismo.

GALVÃO, Talita Cristina. **Evaluation of variants of the *interleukin-10* (rs1800872) and *transforming growth factor Beta1* (rs1800469) genes in patients with inflammatory bowel disease.** 2020. 79 f. Dissertation (Master Degree in Clinical and Laboratory Pathophysiology) – State University of Londrina, Londrina, 2020.

ABSTRACT

Background: Inflammatory Bowel Diseases (IBD) are chronic, immune-mediated diseases that affect the gastrointestinal tract. IBD consists of two subtypes: Ulcerative Retocolitis (UC) and Crohn's disease (CD). IBD are thought to develop as a result of interactions between environmental, microbial and immunomediated factors in a genetically susceptible host. Overall, anti-inflammatory cytokines that play a role in IBD include interleukin-10 (IL-10) and Transforming Growyh Factor Beta1 (TGF- β 1). Differences in the production of cytokines have been associated with genetic variations in gene regions related to these cytokines. Individual differences in cytokine synthesis could explain the susceptibility to IBD and its phenotypic heterogeneity. Studies on the influence of the genetic variants of *TGFB1* and *IL10* on the pathogenesis of IBD have been published with controversial results.

Objective: To evaluate the association between IBD, UC and CD and the *TGFB1* -509 C>T (rs1800469) and *IL10* -592 C>A (rs1800872) gene variants and examine the association between these variances and the cytokine levels present in IBD, as well as to verify the association with the disease activity.

Subjects and Methods: The study included 178 IBD patients, 89 with UC and 89 with CD, of both sexes and aged between 18 and 70 years, recruited from the Gastroenterology Ambulatory of the State University of Londrina, Londrina, Paraná, South Brazil and 171 healthy individuals. The disease activity was established by the partial, total and MAYO endoscope scores for UC and Crohn's Disease Activity Index (CDAI) for CD. After fasting for 12 h, venous blood samples were obtained. Plasma levels of TGF- β 1 and IL-10 were assessed using a fluorometry-based detection system. DNA was extracted from peripheral blood cells using an extraction kit. The DNA concentration was measured at 260 nm. To genotype the *IL10* -592 C>A, after the amplification of a 154 bp fragment of the *IL10* gene, it was submitted to digestion with the restriction enzyme *RsaI*. The digestion products were analyzed according to Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). The -509 C>T *TGFB1* variants were genotyped by TaqMan allelic discrimination assay on real-time polymerase chain reaction (qPCR) system.

Results: The patients with IBD did not differ in age, sex, ethnicity and BMI from controls ($p > 0.05$). IL-10 and TGF- β 1 levels increased significantly in IBD compared to the control group ($p < 0.001$). The *IL10* -592 C> A variant was not associated with IBD, UC or CD patients. *TGFB1* -509 C>T did not show significant difference in IBD, UC and CD and in patients when compared to controls in the allelic model ($p = 0.418$; $p = 0.653$; $p = 0.381$, respectively). The IL10 CC genotype of -592 C>A variant showed higher plasma levels of TGF- β ($p = 0.035$). Plasma levels of IL-10 and TGF- β did not differ between patients with UC ($p = 0.553$; $p = 0.510$, respectively) in relation to disease remission assessed by the total MAYO score. There was no association between the total MAYO score and IL10 -592 C> A in the codominant, dominant or recessive model in patients with UC [(CC vs CA $p = 0.492$; CC vs AA $p = 0.103$); (CC vs CA + AA; $p = 0.243$), (CC + CA vs AA; $p = 0.127$) respectively], and in the TGF β -509 C> T genotype model [(CC vs CT $p = 0.080$; CC

vs TT $p = 0.846$); (CC vs CT + TT; $p = 0.143$), (CC + CT vs TT; $p = 0.693$) respectively]. Regarding patients with CD, IL-10 levels were higher in patients with Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity (CDEIS) >8 when compared to CDEIS ≤ 8 ($p = 0.046$). TGF- β levels did not differ between groups in relation to CDEIS ($p = 0.362$). The genetic variant of *IL10* and *TGFB1* showed no significant difference in CD patients compared to CDEIS in any genotype model [(CC vs CA $p = 0.891$; CC vs AA $p = 0.460$); (CC vs CA + AA; $p = 0.922$), (CC + CA vs AA; $p = 0.418$) respectively] and [(CC vs CT $p = 0.472$; CC vs TT $p = 0.439$); (CC vs CT + TT; $p = 0.404$), (CC + CT vs TT; $p = 0.566$) respectively]. **Conclusion:** IBD patients shows higher levels of IL-10 and TGF- β 1, both in CD and UC, when compared to controls. The *IL10* CC genotype was associated to higher plasmatic levels of TGF- β . The *TGFB1* TT genotype was associated to higher plasmatic levels of TGF- β . The discovery of new genetic variants associated with IBD can contribute to personalized treatment of these patients.

Key Words: Crohn's disease; ulcerative colitis; *IL-10* -592 C>A; *TGFB1* -509 C>T; polymorphism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fatores relacionados à patogênese das Doenças Inflamatórias Intestinais	18
Figura 2 – Citocinas na Patogênese das Doenças Inflamatórias Intestinais	21
Figura 3 – Estrutura do gene <i>TGFβ1</i>	25
Figura 4 – Estrutura do gene <i>IL10</i>	27
Figura 5 – Estratégias de tratamento para doenças inflamatórias intestinais.....	31
Figura 6 – Gel em acrilamida 10% da digestão com a enzima de restrição <i>RsaI</i> , corado com nitrato de prata, após a amplificação de um fragmento de 154 pares de base do gene <i>IL10</i>	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Índice de Atividade da Doença de Crohn (CAI).....	28
Quadro 2 – Escore Total de Mayo para a Retocolite Ulcerativa	29
Quadro 3 – Escore Parcial de Mayo (Clínico) para a Retocolite Ulcerativa.....	29
Quadro 4 – Escore Endoscópico de Mayo para a Retocolite Ulcerativa.....	36
Quadro 5 – Índice Endoscópico de Gravidade da Doença de Crohn (CDEIS)	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'UTR	Região não traduzida 5' (<i>5' Untranslated region</i>)
AEHU	Ambulatório de Especialidades do Hospital Universitário
ANCA	Autoanticorpos Contra o Citoplasma de Neutrófilos (<i>anti-neutrophil cytoplasmic antibodies</i>)
ASCA	Anticorpos Contra a Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies</i>)
AP1	Ativador de proteína 1 (<i>Activator protein 1</i>)
CCL	Quimiocina ligante (<i>Ligand chemokine</i>)
CDAI	Índice de atividade da Doença de Crohn (<i>Crohn's Disease Activity Index</i>)
CDEIS	Índice Endoscópico de Gravidade da Doença de Crohn (<i>Crohn's Disease Endoscopic Index of Severity</i>)
DC	Doença de Crohn (<i>Crohn's Disease</i>)
DC	Célula Dentrítica (<i>Dendritic Cell</i>)
DII	Doenças Inflamatórias Intestinais (<i>Inflammatory Bowel Disease</i>)
FoxP3	Fator de transcrição nuclear P3 (<i>Forkhead box protein P3</i>)
GWAS	Estudo associado ao amplo-genoma (<i>Genome-wide association study</i>)
HLA	Antígeno Leucocitário Humano (<i>Human leukocyte antigen</i>)
HWE	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
<i>IBD3</i>	Doença Inflamatória Intestinal 3 (<i>Inflammatory Bowel Disease 3</i>)
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleucina (<i>Interleukin</i>)
IL-12R	Receptor de Interleucina 12 (<i>Interleukin 12 Receptor</i>)
IL-23R	Receptor de Interleucina 23 (<i>Interleukin 23 Receptor</i>)
JAK	Janus quinase (<i>Janus Kinase</i>)
LAP	Peptídeo Associado à latência (<i>Latency-associated peptide</i>)
MÊS	Escore Endoscópio Mayo (<i>Mayo Endoscopic Score</i>)
mRNA	RNA mensageiro (<i>Messenger RNA</i>)
NK	Natural <i>Killer</i>
Pb	Pares de base (<i>base pairs</i>)

PCR	Proteína C Reativa
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RCU	Retocolite ulcerativa (<i>Ulcerative Colitis</i>)
RFLP	Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
SNV	Varição de um Único Nucleotídeo (<i>Single Nucleotide Variation</i>)
STAT	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição (<i>Signal Transducer and activator of the Transcription</i>)
TGF- β	Fator Transformador de Crescimento Beta (<i>Transforming Growth Factor Beta</i>)
Th	T auxiliar (<i>T helper</i>)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (<i>Tumor Necrosis Factor</i>)
Treg	Células T regulatórias (Regulatory T cell)
Tyk	Tirosina quinase (<i>Tyrosine Kinase</i>)
UCEIS	Índice Endoscópico de Gravidade da Colite Ulcerativa (<i>Endoscopic Severity Index of Ulcerative Colitis</i>)
UEL	Universidade Estadual de Londrina
VHS	Velocidade de Hemossedimentação (<i>Erythrocyte Sedimentation Rate</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	DEFINIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO	16
1.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	18
1.3	ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E CITOCINAS	19
1.4	BIOMARCADORES LABORATORIAIS	22
1.5	VARIANTES GENÉTICAS	23
1.5.1	TGF- β	24
1.5.2	IL-10	26
1.6	DIAGNÓSTICO, ATIVIDADE DA DOENÇA E TRATAMENTO	27
2	JUSTIFICATIVA	32
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
4	SUJEITOS E MÉTODOS	34
4.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	34
4.2	DELINEAMENTO E AMOSTRAGEM	34
4.3	MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS.....	35
4.4	DIAGNÓSTICO DA RCU	35
4.5	DIAGNÓSTICO DA DC	35
4.6	EXAMES DE IMAGEM	36
4.6.1	Análise Histopatológica e Atividade da RCU	36
4.6.2	Atividade da DC.....	37
4.7	ANÁLISES LABORATORIAIS	38
4.8	VARIANTES GENÉTICAS	38
4.8.1	Variante Genética do IL10 (rs1800872).....	38
4.8.2	Variante Genética do TGFB1 (rs1800469)	39
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40

5	RESULTADOS	41
5.1	ARTIGO	42
6	CONCLUSÕES	65
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICES	71
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	71
	APÊNDICE B - FICHA DE AVALIAÇÃO.....	73
	ANEXOS	75
	ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	75

1 INTRODUÇÃO

2

3 1.1 DEFINIÇÃO E CARACTERIZAÇÃO

4 Doenças Inflamatórias Intestinais (DII) são doenças crônicas autoimunes,
5 caracterizadas por um conjunto de distúrbios que afetam o trato gastrointestinal. São
6 classificadas em Doença de Crohn (DC) e Retocolite Ulcerativa (RCU) (ENGELS, et.
7 al., 2018). A DC é caracterizada pela inflamação transmural, que pode envolver
8 qualquer parte do trato gastrointestinal, da boca ao ânus. Já a RCU apresenta
9 inflamação na camada mucosa que ocorre a partir do reto e pode estender-se
10 através do cólon (PERSAUD, et. al; 2019).

11 A inflamação da mucosa intestinal resulta em sintomas inespecíficos como
12 diarreia, dor abdominal, presença de sangue nas fezes, perda de peso. O influxo de
13 neutrófilos e macrófagos que produzem citocinas, enzimas proteolíticas e radicais
14 livres resultam na inflamação e podem causar ulceração (GUAN; 2019).

15 A inflamação da DC pode evoluir para um padrão penetrante e fistuloso ou
16 para um quadro fibrostenótico obstrutivo. As fístulas intestinais ocorrem em cerca de
17 20% a 40% dos pacientes com DC. A formação de fístula pode ocorrer em qualquer
18 estrutura adjacente, inclusive no intestino, bexiga, pele ou vagina. Essas fístulas
19 podem ser clinicamente assintomáticas, mas podem contribuir para a má absorção e
20 diarreia. Os pacientes também podem apresentar manifestações extraintestinais.
21 Entre os sintomas sistêmicos, destacam-se a fadiga, como resultado da inflamação
22 e má absorção contínuas. A febre leve também é frequentemente descrita. Febre
23 mais alta indica processo inflamatório mais grave, como formação de abscesso ou
24 perfuração (FLYNN; EISENSTEIN; 2019).

25 A inflamação na RCU é restrita à mucosa colônica, tornando os sintomas
26 mais restritos. A principal característica da RCU é a diarreia devido ao trânsito rápido
27 do conteúdo intestinal através do cólon inflamado. A gravidade da diarreia está
28 relacionada à extensão da inflamação. Manifestações extraintestinais também
29 podem ocorrer, mas são menos frequentes do que na DC. Sintomas sistêmicos de
30 fadiga, febre e perda de peso também podem estar presentes. Pacientes podem
31 desenvolver estenose colônica, ocorrendo em cerca de 5% a 10% dos pacientes, o
32 que pode levar a obstrução e dor. Em caso de estenoses, é necessário suspeitar de
33 malignidade subjacente (FLYNN; EISENSTEIN; 2019).

1 A etiologia das DII é desconhecida, porém sugere-se que fatores genéticos,
2 ambientais e imunológicos estejam envolvidos, resultando em uma resposta imune
3 excessiva contra a microbiota intestinal em indivíduos geneticamente susceptíveis
4 (WALLACE, et. al., 2014).

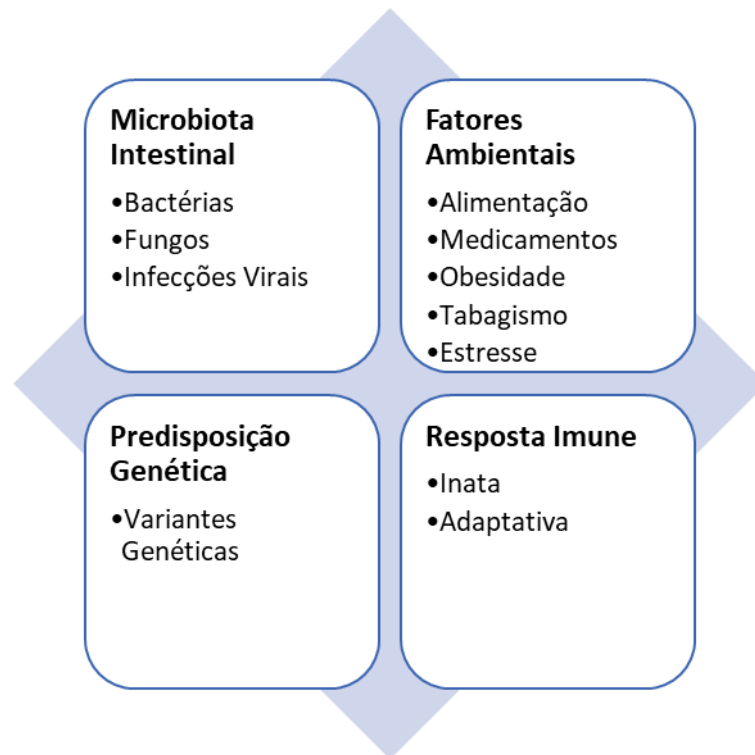
5 A alteração da microbiota intestinal tem sido relacionada aos fatores de
6 predisposição às DII. A hipótese de higiene sustenta que a falta de exposição a uma
7 variedade de microrganismos na infância pode ter efeito negativo sobre o
8 desenvolvimento da resposta imune inata. Outros fatores relacionados à hipótese da
9 higiene incluem exposição a gastroenterite, amamentação, uso precoce de
10 antibióticos, dieta e tabagismo (GLASSNER; ABRAHAM; QUIGLEY; 2020).

11 A redução da diversidade na microbiota com o aumento de microrganismos
12 próinflamatórios e a depleção de bactérias anti-inflamatórias tem sido associada às
13 DII. A diversidade de microrganismos e os metabólitos microbianos são importantes
14 para a homeostase intestinal. A disbiose pode resultar na perda de vias funcionais
15 importantes na produção de metabólitos microbianos, como o triptofano, ácidos
16 graxos de cadeia curta e outros compostos com atividade anti-inflamatória que
17 regulam a inflamação intestinal pode resultar em perda de vias funcionais
18 microbianas (CHU; 2017).

19 Talha (2015) revisou alguns fatores ambientais relacionados às doenças
20 (Figura 1). Entre eles, a alimentação rica em carne e carboidratos e o baixo
21 consumo de fibras e vegetais têm sido relatados. Outro fator descrito é o
22 envolvimento da obesidade na progressão das DII, considerando a função endócrina
23 do tecido adiposo como mediador da inflamação. Existem, também, evidências
24 observacionais de associação entre estresse, ansiedade e depressão e o
25 desenvolvimento de DII. Alguns medicamentos, como os contraceptivos orais,
26 terapia de reposição hormonal, fármacos anti-inflamatórios e antibióticos, também
27 são descritos como fatores de risco para DII.

28 O tabagismo tem sido associado à exacerbação da DC, maior necessidade de
29 imunossupressão e aumento na necessidade de cirurgia e fraca resposta à terapia
30 médica. Os efeitos prejudiciais do tabagismo são atribuídos aos danos causados à
31 mucosa intestinal. Por outro lado, fumantes com RCU apresentam curso mais leve
32 da doença, são menos propensos a necessitar de hospitalização e cirurgias
33 (VRABLICOVA, et. al.; 2019). Esses efeitos divergentes podem ser explicados pelo
34 mecanismo de resposta imunológica diferente em cada doença.

1 **Figura 1-** Fatores relacionados à patogênese das Doenças Inflamatórias Intestinais
 2



3

Fonte: adaptado de TALHA (2015).

4

5 1.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

6 As DII foram inicialmente descritas na Europa Ocidental, durante a revolução
 7 industrial. É mais comum em países industrializados, como países da América do
 8 Norte e Europa Ocidental. Estudos epidemiológicos sugerem um aumento
 9 significativo da incidência e prevalência dessas doenças em países da Ásia, África e
 10 Europa Oriental. O aumento da incidência nos países em desenvolvimento
 11 demonstra o impacto de fatores ambientais na patogênese da DII (FEUERSTEIN, et.
 12 al., 2017; SELVARATNAM, et. al., 2019). A incidência geográfica de DII é paralela à
 13 industrialização e urbanização das sociedades, sustentando a hipótese da higiene. A
 14 mudança na exposição a microrganismos é atribuída à alteração nas condições de
 15 higiene e saneamento (GLASSNER, ABRAHAM, QUIGLEY, 2020).

16 Uma revisão feita com países da América do Sul descreveu maior frequência
 17 de RCU comparada à DC. Com relação à etnia, foi mais frequente em caucasianos
 18 do que em indivíduos com ascendência africana ou asiática. As DII são mais
 19 comuns em judeus Ashkenazi. Com relação ao sexo apenas um estudo demonstrou

1 predominância no sexo feminino (FEUERSTEIN, et. al., 2017; SELVARATNAM, et.
2 al., 2019)

3 O Brasil é considerado um país de baixa incidência e prevalência de DII.
4 Existem dados que demonstram tendência crescente da RCU e da DC no país,
5 embora as bases de dados nacionais sejam deficientes quanto a incidência e
6 prevalência dessas doenças (GASPARINI, et. al., 2018). Dados epidemiológicos
7 geralmente se referem ao sistema público de saúde, com base em registros de
8 hospitalização ou de pacientes que adquirem medicamentos de alto custo através do
9 governo. Em certas regiões do país, a DII têm sido um dos principais motivos da
10 falta no trabalho ou na escola (CURY; OLIVEIRA; CURY; 2019).

11 Um estudo realizado no Estado de São Paulo, entre 2012 e 2015, demonstrou
12 a incidência média anual de DII de 13,30 novos casos/ 100.000 habitantes/ ano,
13 considerando a incidência média de DC de 6,14 novos casos/ 100.000 habitantes/
14 ano e de RCU de 7,16 novos casos/ 100.000 habitantes/ ano. A maioria dos
15 pacientes era do sexo feminino, com idade entre 20 e 50 anos (GASPARINI, et. al.,
16 2018).

17 As manifestações clínicas e o diagnóstico das DII geralmente surgem durante
18 a segunda ou terceira década de vida. Dessa forma, podem comprometer o
19 desempenho escolar ou levar à incapacidade no trabalho. Por serem doenças
20 inflamatórias crônicas, tanto a RCU quanto a DC afetam a qualidade de vida dos
21 pacientes e geram altos custos, pois necessitam de tratamento contínuo
22 (SPEKHORST, et. al. 2017). A maioria dos pacientes com DII no Brasil obtém seus
23 medicamentos por meio de programas governamentais de fornecimento gratuito de
24 medicamentos (GASPARINI, et. al., 2018).

25

26 1.3 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E CITOCINAS

27 A DII é caracterizada por uma falha na regulação imune do processo de
28 resposta inflamatória, em consequência do dano epitelial, aumento da inflamação
29 causado pela microbiota intestinal e um grande número de células que infiltram a
30 lâmina própria, incluindo células T e B, macrófagos, células dendríticas e neutrófilos
31 (GUAN, 2019).

32 A resposta imune no trato gastrointestinal é dividida em imunidade inata e
33 adaptativa. A imunidade inata inclui a função de barreira da mucosa intestinal,

1 proteínas antibacterianas, como o sistema complemento e defensinas, o pH ácido do
2 estômago, que limita o crescimento bacteriano, células da imunidade inata
3 (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células *natural killer* (NK), citocinas e
4 moléculas inatas (interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e
5 defensinas). A imunidade adaptativa é específica para patógenos, geralmente
6 ativada quando as respostas imunes inatas não contornam a estimulação do
7 patógeno, tornando necessária a ativação de células B e T. O início da resposta
8 imune à microbiota intestinal depende da regulação entre a tolerância imunológica e
9 uma resposta inflamatória defensiva. O desequilíbrio dessas respostas pode causar
10 DII (GUAN, 2019).

11 Em condições de homeostase, existe um equilíbrio entre a microbiota
12 intestinal e as células imunológicas. A mucosa intestinal forma uma barreira que
13 impede a aderência de microrganismos no tecido do hospedeiro, prevenindo a
14 inflamação descontrolada. A patogênese da DII está relacionada à alteração de
15 função da barreira intestinal e alterações estruturais das células do epitélio intestinal.
16 A resposta imune inicial envolve a ativação de células imunes, como macrófagos,
17 células dendríticas, neutrófilos, células NK em resposta aos antígenos microbianos.
18 A apresentação de antígeno aos linfócitos T estimula a resposta imune adaptativa,
19 que varia entre RCU e DC, de acordo com o perfil celular prevalente em cada
20 doença (DANESE, et. al.; 2015).

21 O mecanismo de autofagia controla a quebra de componentes intracelulares
22 em resposta ao estresse ou infecção. Esses mecanismos de conservação
23 intracelular garantem o funcionamento correto de células intestinais altamente
24 secretoras, como células de Paneth e células fagocíticas, como os macrófagos
25 (FRIEDRICH; POHIN; POWRIRE, 2019).

26 As células T auxiliares, do inglês T *helper* 17 (Th17) são células efetoras que
27 medeiam a resposta inflamatória na DII. Elas estão envolvidas na produção de
28 citocinas próinflamatórias como a interleucina 17 (IL-17) e também exibem fenótipo
29 regulador Th17/Th1, em que a produção de IL-17 é suprimida e o interferon gama
30 (IFN- γ) é secretado. Assim, há um equilíbrio entre resposta pró-inflamatória Th17 e
31 anti-inflamatória regulatória, que pode ser importante ao considerar o tratamento
32 com agentes supressores de IL-17. A continuação da resposta imune contra
33 microrganismos comensais resulta na inflamação crônica. O acúmulo contínuo de

1 miofibroblastos em locais onde a função da barreira foi comprometida pode levar à
2 fibrose intestinal e à formação de fístulas (DANESE, et. al.; 2015).

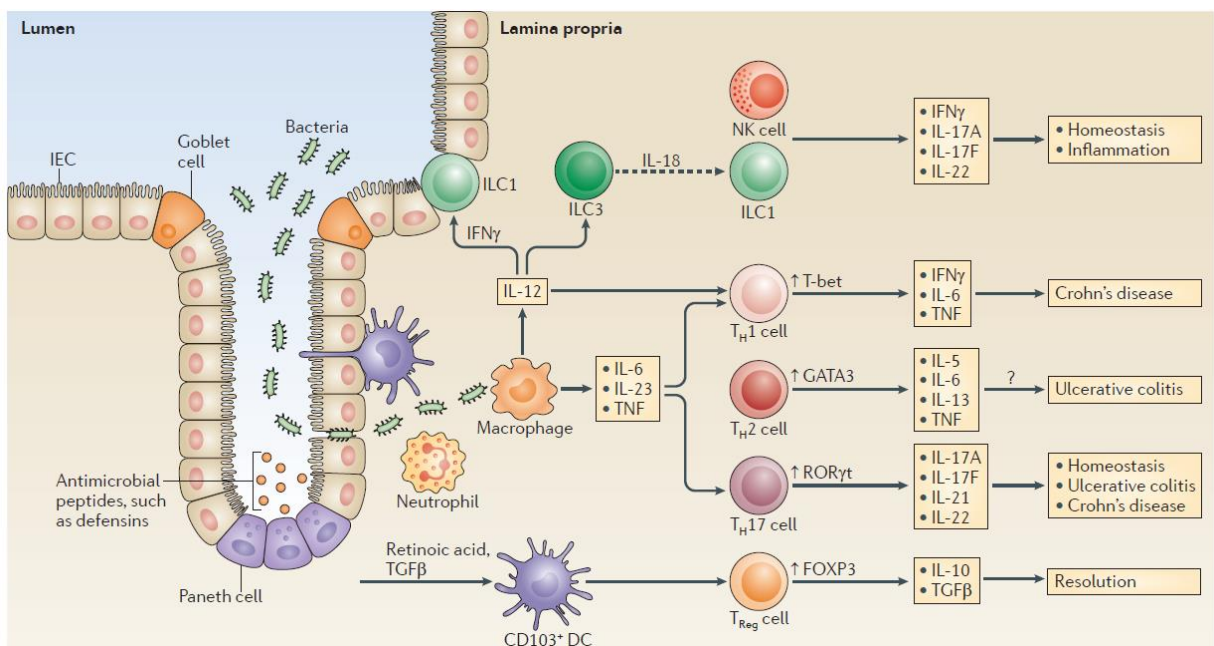
3 Estudos de associação em todo o genoma, do inglês *Genome-wide*
4 *association study* (GWAS) identificaram vários *loci* de genes que codificam proteínas
5 envolvidas na sinalização dos receptores de citocinas e quimiocinas e na resposta
6 imune, entre eles o transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT1), STAT3,
7 STAT4, receptor de quimiocina 6, do inglês *chemokine receptor type 6* (CCR6),
8 quimiocina ligante 2 (CCL2), CCL13, receptor de IL-12 (IL-12R), IL-23R e Janus
9 kinase (JAK2). Foram identificados também *loci* de genes que codificam citocinas,
10 como IL-2, IL-21, interferon- γ (IFN γ), IL-10 e IL-27 (figura 2) (NEURATH; 2014).

11 Citocinas chave na resposta imune incluem TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-12, IL-
12 13, IL-17, IL-2 e IL-15 (DANESE, et. al.; 2015). As citocinas pró-inflamatórias
13 desempenham um papel importante na resposta imune da DII. Existem vários
14 processos na patogênese da doença, como a regulação das funções da barreira
15 intestinal e atividade antimicrobiana, autofagia, desenvolvimento de células Th. As
16 citocinas são responsáveis por regular essas vias. Portanto, os genes dos
17 receptores de citocinas e reguladores da sinalização delas estão entre os mais
18 estudados nas DII (NOROUZINIA, et. al.; 2017).

19

20 **Figura 2 - Citocinas na Patogênese das Doenças Inflamatórias Intestinais**

21



22

1 ILC: célula linfóide inata; NK: células exterminadoras naturais (*Natural killer*); Th: células t auxiliares (t
2 *helper*); IL: interleucina; IFN- γ : interferon gama; TNF- α : fator de necrose tumoral alfa; DC: célula
3 dendrítica; TGF- β : fator transformador do crescimento beta;

4 **Fonte:** NEURATH; 2014

5 Os estudos dos níveis de citocinas nas DIIs demonstram que a RCU é uma
6 doença associada à resposta Th2, enquanto que na DC as citocinas Th1/Th17
7 desempenham um papel importante na resposta inflamatória, conforme
8 demonstrado na figura 2 (NEURATH; 2014). Muitas das citocinas clássicas da
9 imunidade inata e adaptativa não podem ser detectadas no soro de pacientes com
10 DII. É possível que essas citocinas sejam restritas nos locais de inflamação dos
11 tecidos, que apresentam tempo de meia vida relativamente curtas e são encontradas
12 em circulação apenas em condições avançadas (KOROLKOVA, et. al., 2015). Com
13 a compreensão da atividade biológica dessas citocinas é possível implementar
14 novos recursos terapêuticos para atender a necessidades dos pacientes com DII.

15

16 1.4 BIOMARCADORES LABORATORIAIS

17 Alguns biomarcadores foram identificados para monitorar o processo
18 inflamatório. Esses biomarcadores geralmente não são específicos, sendo úteis para
19 auxiliar na determinação da atividade da doença e resposta terapêutica, mas não
20 são adequados para o diagnóstico (FLYNN; EISENSTEIN; 2019).

21 A proteína C reativa (PCR) é uma das proteínas de fase aguda mais
22 importantes na inflamação. Pode ser utilizada para auxiliar na avaliação por
23 endoscopia ou radiologia como preditor de atividade da doença, porém não pode ser
24 utilizada isoladamente no diagnóstico das DII. Níveis séricos elevados de PCR
25 sugerem resposta ao TNF- α e nível normal de PCR sérico podem ser associados à
26 remissão clínica e endoscópica. Na RCU, a PCR pode ser adjuvante na avaliação da
27 atividade da doença. O nível normal no soro está associado à remissão clínica e
28 cicatrização da mucosa. Na DC, a PCR é mais elevada em indivíduos com
29 envolvimento do cólon (NOROUZINIA, et. al.; 2017).

30 A pesquisa de anticorpos contra a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ASCA)
31 e a pesquisa de autoanticorpos contra o citoplasma de neutrófilos (ANCA) embora
32 sejam de baixa sensibilidade, auxiliam na diferenciação das DII. ANCA apresenta-se
33 elevada na RCU, enquanto que a ASCA é principalmente relacionada à DC
34 (NOROUZINIA, et. al.; 2017).

1 A velocidade de hemossedimentação (VHS), assim como a PCR, é o
2 biomarcador inespecífico de inflamação, que também pode estar alterado nas DII;
3 porém, não pode ser avaliado isoladamente. A contagem de plaquetas aumenta em
4 pacientes com DII, o que contribui com a formação de microtrombos (NOROUZINIA,
5 et. al.; 2017). Existem outros marcadores inflamatórios inespecíficos úteis no
6 diagnóstico de inflamação ativa na DC, como a calprotectina fecal e a lactoferrina,
7 porém seu uso é pouco frequente (GOMOLLÓN, et. al.; 2017).

9 1.5 VARIANTES GENÉTICAS

10 A predisposição genética pode influenciar tanto na atividade das DII, quanto
11 na resposta ao tratamento, em razão da alteração das funções celulares e da
12 resposta imune (NUIJ, et. al., 2017). Variantes em genes envolvidos nas vias
13 inflamatórias podem explicar a predisposição genética para DII (BANK, et. al.; 2014).

14 O sequenciamento do genoma humano e a descoberta de Variantes de um
15 Único Nucleotídeo (SNVs) permitiram os GWAS, demonstrando que diferente de
16 algumas doenças que são causadas por apenas uma mutação, as DII são resultado
17 da combinação de variantes em diversos *loci*. GWAS identificaram que setenta por
18 cento dos *loci* da DII são compartilhados com outras doenças. Dentre 154 *loci*
19 associados com doenças imunomediadas, 66 são compartilhados com as DII
20 (JOSTINS et. al., 2012). Foi demonstrada a sobreposição nos *loci* de suscetibilidade
21 entre DII e outras doenças, como a espondilite anquilosante, psoríase, lúpus
22 eritematoso sistêmico, artrite reumatoide, asma, dermatite atópica, doença celíaca,
23 diabetes mellitus tipo I e II, esclerose múltipla e hanseníase (LEES et. al., 2011).

24 Diversos genes de susceptibilidades cromossômicas foram estudados
25 (LÓPEZ-HERNÁNDEZ et al, 2014). Estudos genômicos identificaram mais de 240
26 *loci* de risco genético, dos quais cerca de 30 *loci* são compartilhados na RCU e DC.
27 Os fatores genéticos identificados indicam que várias vias desempenham papéis na
28 manutenção da homeostase intestinal. Dentre elas se destacam a função da barreira
29 epitelial na defesa inata da mucosa, regulação imune, migração celular, autofagia,
30 imunidade adaptativa e vias metabólicas associadas a homeostase celular. As
31 células da lâmina própria ativadas produzem altos níveis de citocinas pró-
32 inflamatórias no local, incluindo TNF- α , IL-1 β , IFN- γ e citocinas das vias IL-23/Th17
33 (GUAN, 2019).

1 O complexo Antígeno Leucocitário Humano (HLA) codifica mais de 225
2 genes. GWAS demonstraram ligação à região *Inflammatory Bowel Disease 3 (IBD3)*,
3 que sugerem que a associação do *locus* HLA é melhor elucidada na UC do que na
4 DC (MURO; LÓPEZ-HERNÁNDEZ; MROWIEC; 2014).

5 No Brasil, foi realizado um estudo de variantes dos genes *IL10* e *TGFB1* na
6 DC. Foi demonstrado que variantes no gene *TGFB1* podem estar relacionadas ao
7 surgimento na DC e que variantes do gene *IL10* podem influenciar nos fenótipos da
8 DC (ALMEIDA et. al., 2013).

9 Embora os *loci* de suscetibilidade nos genes de vias funcionais nas DII
10 tenham sido relatados, são escassos os estudos de associação desses *loci* de risco
11 à expressão fenotípica. Esses *loci* identificados pelos GWAS normalmente se
12 localizam em regiões não codificadoras do genoma. A interpretação causal é um
13 desafio nos estudos genômicos (MOHAMMADI, et. al.; 2018).

14 Estudos de variantes genéticas associados à farmacocinética e
15 farmacodinâmica podem sugerir se o tratamento será efetivo ou não, pela
16 identificação dos perfis genéticos que não respondem ao tratamento (BEK, et. al;
17 2016). Sendo assim, esses estudos podem futuramente auxiliar na compreensão
18 dos processos fisiopatológicos e na terapêutica personalizada, direcionando cada
19 paciente ao melhor tratamento (NUIJ, et. al., 2017).

21 1.5.1 TGF- β

22 O fator de transformação do crescimento beta, do inglês *Transforming Growth*
23 *Factor Beta* (TGF- β), é uma citocina produzida por muitos tipos de células, incluindo
24 células epiteliais, fibroblastos, células imunes, macrófagos e regula múltiplas
25 funções celulares como supressor da resposta imune, proliferação celular e
26 oncogênese. Está envolvido na manutenção da homeostase intestinal através da
27 modulação das funções das células imunes, do epitélio e da microbiota luminal, que
28 estão envolvidas na patogênese da DII. Na imunidade intestinal, o TGF- β suprime
29 as respostas inflamatórias à antígenos bacterianos e contribui para a indução de
30 tolerância imunológica (IHARA; HIRATA; KOIKE; 2017).

31 O TGF- β é abundante no intestino de mamíferos. Possui três isoformas: TGF-
32 β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, sendo o TGF- β 1 a isoforma mais estudada, cujo papel da
33 imunidade intestinal tem sido investigado (IHARA; HIRATA; KOIKE; 2017).

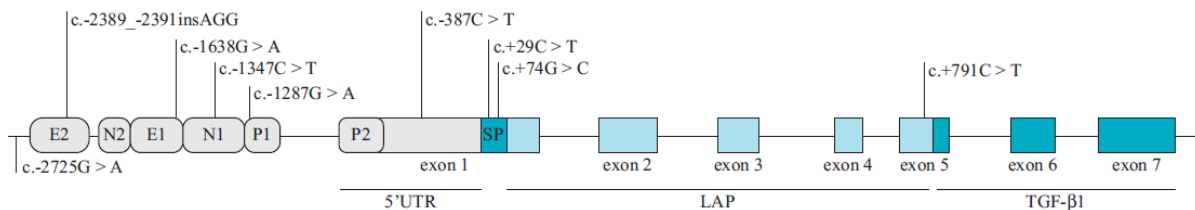
1 A principal função da sinalização de TGF- β nas células T é suprimir a
 2 proliferação e ativação de células T pela diferenciação de células T regulatórias
 3 (Treg). Foi relatado que TGF- β juntamente com IL-6 induzem a diferenciação de
 4 células Th17 a partir de células T CD4+ naive. As células Th17 produzem IL-17 e
 5 Interferon γ (IFN- γ), necessárias para a defesa da mucosa contra bactérias, mas
 6 tendem a promover inflamação intestinal (IHARA; HIRATA; KOIKE; 2017).

7 O TGF- β 1 é um regulador chave do crescimento e diferenciação celular,
 8 modulação imune, cicatrização de feridas e embriogênese. Patologicamente, a
 9 expressão de TGF- β 1 afeta fibrose em doenças autoimunes, progressão tumoral e
 10 metástase e transplante (SHAH, et. al., 2006).

11 O gene *TGFB1* está localizado na região 19q13.2 do cromossomo 19
 12 humano. É composto por 7 éxons separados por 6 íntrons muito grandes. O exon 1
 13 codifica a região não traduzida 5' (5'UTR), o peptídeo sinal e uma parte do peptídeo
 14 associado à latência (LAP) cuja codificação continua até o códon 249 no éxon 5. Do
 15 éxon 5 ao 7, o segmento formado codifica o TGFB1 maduro (CEBINELLI, et. al.;
 16 2016).

17 Variantes no gene *TGFB1* podem estar presentes em diversas regiões do
 18 gene e afetar a ligação ao fator de transcrição ou interferir no nível de produção de
 19 proteínas. Variantes funcionais têm sido associadas a doenças como câncer. No
 20 entanto a associação do SNV com a doença não pode ser considerada
 21 isoladamente um biomarcador, já que diversos SNVs podem alterar a produção de
 22 TGF- β 1 e apenas o estudo de haplótipos pode certificar a influência exata desses
 23 SNVs (CAO et al., 2011; GRAINGER et al., 1999; GUO et al., 2014).

24
 25 **Figura 3 - Estrutura do gene *TGFB1***



26
 27 Região Promotora 1 (P1); Região Negativa 1 (N1) Peptídeo Sinal (SP); Região Potenciadora 1 (E1); Região
 28 negativa 2 (N2) e Região Potenciadora 2 (E2).

29 Fonte: CEBINELLI, et. al., 2016

30

1 A regulação do gene *TGFB1* e os níveis de expressão da citocina são
2 afetados pela presença de SNVs. O SNV -509 C>T (-1347C>T) presente na região
3 reguladora negativa (figura 3) está associado a diferenças genéticas na regulação
4 dos níveis plasmáticos de TGF- β 1. Indivíduos que codificam o alelo T mostram
5 níveis plasmáticos mais altos de TGF- β 1, comparados aqueles que codificam o alelo
6 C, devido à perda da regulação negativa. A expressão do SNV -509 C>T foi
7 previamente relacionada ao aumento da suscetibilidade e gravidade da asma, risco
8 de desenvolver câncer de mama e doença de Alzheimer (SHAH, et. al., 2006).

9

10 1.5.2 IL-10

11 A família da IL-10 agrupa os mediadores imunológico IL-10, IL-19, IL-20, IL-
12 22, IL-24 e IL-26. Essas citocinas podem promover resposta imune inata para limitar
13 os danos causados por infecções, além de facilitar o processo de cicatrização de
14 tecidos causados pela inflamação (NOROUZINIA, et. al.; 2017).

15 A IL-10 é uma citocina imunorregulatória que pode ser expressa por células
16 imunes como macrófagos, células NK, eosinófilos, neutrófilos e linfócitos B e T
17 (GIUFFRIDA, et. al., 2019). Possui a função de suprimir a produção de citocinas pró
18 inflamatórias pelas células apresentadoras de antígenos e células T e induzir a
19 sinalização STAT3 nas células Treg (NEURATH; 2014).

20 O papel da IL-10 nas DII depende da sinalização em macrófagos, sendo um
21 fator importante na manutenção da tolerância da mucosa. Variantes genéticas da IL-
22 10 estão associadas ao risco de desenvolver DII (KOELINK, et. al., 2019). Koelink e
23 colaboradores (2019) sugerem que a incapacidade dos macrófagos da mucosa em
24 responder a sinalização de IL-10 pode ser um dos mecanismos que justifique que
25 alguns pacientes não respondam à terapia anti-TNF (AL-ROBAYAN, et. al.; 2016).

26 A IL-10 mantém a tolerância à microbiota intestinal, controlando os efetores
27 Th1 e Th17. A falha nas respostas à IL-10 pelas células imunes inatas está
28 envolvida no desenvolvimento da inflamação (VEENBERGEN. et. al., 2019).

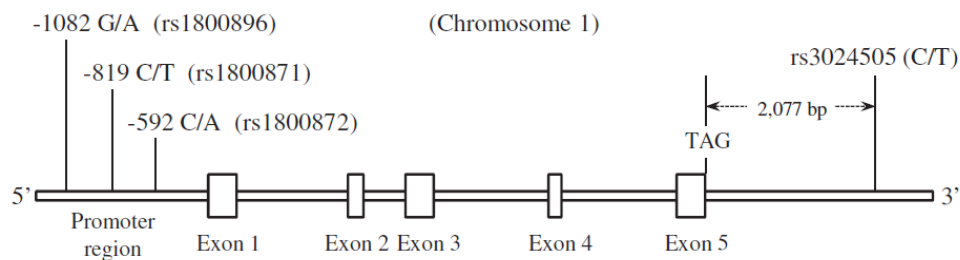
29 Pacientes com DII apresentam altos níveis de IL-10, principalmente durante o
30 período de atividade da doença, sugerindo que essa citocina seja importante como
31 alvo na terapia das DII (GIUFFRIDA, et. al., 2019).

32 O gene da IL-10 humana está localizado no cromossomo 1q32.1 e contém
33 cinco exons (figura 4). Vários SNVs foram relatados na região proximal e distal do

1 gene da IL-10. Os SNVs rs1800896 -1082A/G, rs1800871 -819T/C e rs1800872 -
 2 592A/C da região promotora estão envolvidos na taxa de transcrição de IL-10 e
 3 afetam diretamente seu nível de produção e expressão. Os alelos -1082G, -819C e -
 4 592C (GCC) foram associados a níveis elevados de produção de IL-10, enquanto os
 5 haplótipos ACC e ATA demonstraram baixa transcrição do gene e baixos níveis da
 6 citocina (AL-ROBAYAN, et. al.; 2016; ZHU, et. al.; 2013).

7 **Figura 4 - Estrutura do gene *IL10***

8



9

10 Fonte: MIJAC et al, 2016.

11

12 O gene da IL-10 codifica a citocina anti-inflamatória, que pela via de
 13 sinalização STAT3 desempenha um papel importante no controle da inflamação e
 14 proteção do tecido intestinal contra lesões. Durante a transdução de sinalização de
 15 IL-10, esta se liga aos receptores IL10RA e IL10RB e ativa Jak1 e tirosina quinase 2
 16 (Tyk2), levando à fosforilação do STAT3. Em seguida, o STAT3 ativado é
 17 translocado para núcleo e regula a transcrição de diversos genes responsáveis pela
 18 resposta anti-inflamatória (LIN, et. al.; 2017).

19

20 1.6 DIAGNÓSTICO, ATIVIDADE DA DOENÇA E TRATAMENTO

21 O diagnóstico das DII baseia-se num conjunto de sintomas clínicos da doença,
 22 associados à métodos endoscópicos, radiológicos ou histológicos. Exames
 23 laboratoriais auxiliam na determinação da gravidade da doença. Em alguns casos
 24 não é possível a diferenciação entre DC e RU, sendo denominada DII não
 25 classificada ou indeterminada (SPEKHORST; et. al., 2017).

26

27 A atividade clínica da DC é classificada em leve, moderada e grave. O critério
 28 utilizado para essa classificação é o *Crohn's Disease Activity Index* (CDAI), no qual
 29 para doença ativa é considerado CDAI >220, a remissão com CDAI <150. O CDAI
 30 possui algumas limitações, no entanto, pode ser utilizado para a avaliação de
 recidiva da doença (Quadro 1) (GOMOLLÓN, et. al.; 2017).

1
2
3
4
5
6
7

Quadro 1: Índice de Atividade da Doença de Crohn (CAI)

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% ; Mulheres:42%)	6	
Peso corporal (1-peso atual/peso habitual x 100)	1	

8 ≤150: Remissão; 151-219: Atividade Leve; 220-450: Atividade Moderada; >450: Atividade Grave

9 **Fonte:** SEHGAL; KOLTUN; 2010

10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

Existem dois sistemas de escores endoscópicos para classificar a inflamação da mucosa na RCU. O sigmoidoscópico componente do *Mayo Endoscopic Score* (MES) e o Índice Endoscópico de Gravidade da Colite Ulcerativa (UCEIS) são instrumentos confiáveis de avaliação endoscópica da atividade da doença (XIE, et. al.; 2018).

Além do MES e do UCEIS para definir gravidade e atividade da doença na RCU, frequentemente é utilizado o Escore Total de Mayo para RCU (Quadro 2) e o Escore Parcial de Mayo (Clínico) para a RCU (Quadro 3) como ferramentas que não envolvem imagem (LEWIS, 2008; SEHGAL; KOLTUN, 2010).

1
2
3
4
5
6

Quadro 2: Escore Total de Mayo para a 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

7
8
9

Remissão clínica: Mayo menor ou igual a 2. Doença leve: Mayo 2 a 5. Doença moderada a grave: Mayo 6 a 12.
Fonte: LEWIS, et; al.; 2008.

10 **Quadro 3:** Escore Parcial de Mayo (Clínico) para a Retocolite Ulcerativa

DESCRIPTOR	DESCRIÇÃO	ESCORE
Frequência das evacuações	Número habitual	0
	1-2x a mais do habitual	1
	3-4x a mais do habitual	2
	5 ou mais a mais do habitual	3
Sangramento retal	Ausência	0
	Evacuações apenas com sangue	1
	Raias de sangue - menos da metade da evacuações	2
	Sangue vivo na maioria das evacuações	3
Avaliação Global	Normal	0
	Doença leve	1
	Doença moderada	2
	Doença grave	3
Total (de 9)		

11
12

<2 : Remissão; 2-4: Atividade Leve; 5-7: Atividade Moderada; >7: Atividade Grave

Fonte: SEHGAL; KOLTUN; 2010

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

O tratamento com fármacos inibidores de TNF- α expandiu a remissão dessas doenças; no entanto, este tratamento não é efetivo em 20 a 40% dos pacientes com DII (NUIJ, et. al., 2017). Diferentes fármacos bloqueadores do TNF- α foram desenvolvidos, sendo os principais conhecidos, os anticorpos monoclonais. No entanto, o bloqueio do TNF- α nas DIIs nem sempre é eficaz, o que demonstra que o TNF- α participa apenas de parte dos mecanismos fisiopatológicos da doença, tornando necessário o estudo de outras citocinas na fisiopatologia das DII (BLOEMENDAAL et. al.; 2017).

A maioria dos pacientes com RCU responde ao tratamento com aminossalicilatos, considerados agentes de primeira linha. O ácido fólico deve ser utilizado em conjunto para evitar a anemia. Pode ser utilizada a associação de enemas e supositórios. Na ausência de resposta terapêutica aos aminossalicilatos, é utilizada a combinação com corticoides orais. A azatioprina e a 6-mercaptopurina são imunossupressores muitas vezes iniciados junto ao ciclo de corticoides. Em caso de contra indicações pode ser utilizado o metotrexato (FROÉS; 2012).

Os medicamentos utilizados para a remissão da DC incluem azatioprina (antagonista das purinas), e fármacos inibidores do TNF- α , como infliximabe, adalimumabe e vedolizumabe. Podem também ser utilizados ustekinumabe (bloqueadores da IL-23 e IL-12), metotrexato (antimetabólito análogo do ácido fólico), certolizumabe (anti TNF- α) e natalizumabe (inibidor seletivo da molécula de adesão linfocitária integrina α 4B1). A eficácia de mesalazina (aminossalicilato) e ácidos graxos ômega 3 é controversa (GOMOLLÓN,et. al.; 2017).

Na figura 5 é demonstrada a abordagem tradicional de tratamento na DII, que é baseada na estratégia de expansão “step up”, baseada numa escala progressiva para terapias mais poderosas, porém mais prejudiciais, de acordo com a gravidade da doença e resposta a medicamentos prescritos anteriormente. Na base dessa pirâmide terapêutica estão os medicamentos mais tolerados em pacientes com DII leve a moderada. Incluem os aminossalicilatos, corticosteroides tópicos e antibióticos. No próximo estágio estão os corticosteroides sistêmicos. Pacientes que desenvolvem resistência aos esteroides são escalados para imunossupressores tradicionais, como azatioprina e metotrexato. A posição superior da pirâmide é ocupada por imunobiológicos e ciclosporina e são reservados para a doença grave e aguda (CURRO; PUGLIESE; ARMUZZI; 2017). Outra conduta utilizada na DC é a

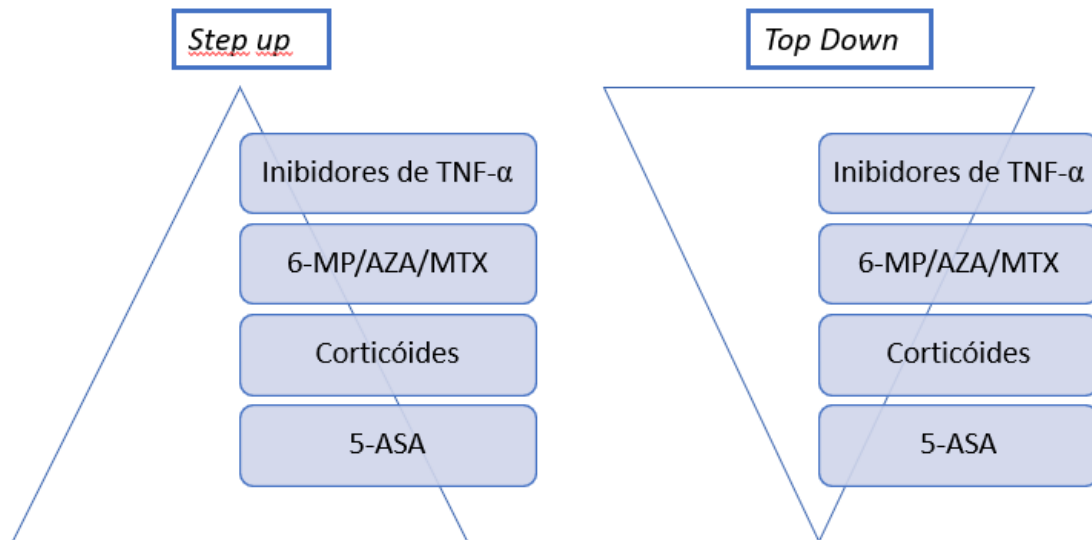
1 “top down”, com a utilização da terapia biológica desde o início do tratamento, sendo
2 utilizada em casos mais graves (FROÉS; 2012).

3

4

5

6 **Figura 5:** Estratégias de tratamento para doenças inflamatórias intestinais



7

8 6-MP: 6-mercaptopurina; AZA: azatioprina; MTX: metotrexato; 5-ASA- Aminosalicilatos

9 **Fonte:** Adaptado de FROÉS; 2012.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

1
2
3
4
5

6 **2 JUSTIFICATIVA**

7

8 DIIs são doenças que não apresentam cura e podem comprometer o paciente
9 com graus variados de dano e incapacidade, sendo responsáveis por altos custos
10 aos serviços de saúde. A etiologia e fisiopatologia das DII ainda não são totalmente
11 esclarecidas. Além disso, os dados referentes às alterações genéticas que podem
12 ser responsáveis por desencadear ou prevenir o surgimento dessas doenças, e que
13 possam explicar as diferenças na gravidade, ainda são escassos e inexistentes na
14 população brasileira.

15 Tendo em vista que o estudo de marcadores genéticos e sua correlação com
16 a fisiopatologia da doença pode auxiliar no desenvolvimento de novos
17 biomarcadores e estratégias terapêuticas e que até o presente momento, não
18 encontramos estudos que relacionem as variantes genéticas rs1800872 -592C>A do
19 gene *IL10* e rs1800469 -509 C>T, C509T ou -1347 C>T do *TGFB1* e o perfil de
20 citocinas em pacientes com DII na população brasileira. Assim, este estudo objetivou
21 avaliar estas variantes e o perfil de citocinas em pacientes com DII.

22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as variantes genéticas rs1800872 -592 C>A do gene *IL10* e rs1800469 -509 C>T, C509T ou -1347 C>T do *TGFB1* e o perfil de citocinas em pacientes com DII e verificar se estes fatores estão associados com a atividade da doença.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as concentrações plasmáticas da IL-10 e do TGF- β 1 em pacientes com DII e indivíduos controles;
- Avaliar o genótipo e distribuição alélica da variante *IL10* -592C>A (rs1800872) em pacientes com DII e indivíduos controles;
- Avaliar o genótipo e distribuição alélica da variante *TGFB1* -509 C>T, C509T ou -1347 C>T (rs1800469) em pacientes com DII e indivíduos controles;
- Avaliar os níveis das citocinas e sua relação à presença/ausência das variantes genéticas;
- Verificar se há associação entre os níveis de citocinas e a atividade da doença.

1
2
3
4
5

6 **4 SUJEITOS E MÉTODOS**

7

8 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

9 O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres
10 Humanos da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (CAAE
11 91833018.2.0000.5231), Parecer CEP/UEL nº 2.767.257 (ANEXO A). Os indivíduos
12 foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa através de um termo de
13 consentimento livre e esclarecido (APÊNDICE A).

14

15 4.2 DELINEAMENTO E AMOSTRAGEM

16 Este é um estudo do tipo caso-controle em que foram selecionados 178
17 pacientes com DII, sendo 89 DC e 89 RCU, de ambos os sexos e com idade entre
18 18 a 70 anos, atendidos pelo ambulatório de gastroenterologia do Ambulatório de
19 Especialidades do Hospital Universitário (AEHU), no período entre julho de 2018 e
20 junho de 2019. O grupo controle foi composto por 171 indivíduos, contendo
21 participantes avaliados em outro projeto de pesquisa, pacientes avaliados em
22 ambulatório de Clínica Urológica em Londrina, além de pacientes atendidos no
23 Hemocentro Regional de Londrina.

24 Os critérios de exclusão em ambos os grupos foram: presença de outras
25 doenças autoimunes, doenças cardiovasculares, doença renal crônica, cirrose,
26 doenças infecciosas agudas ou crônicas. Informações referentes ao histórico médico
27 foram obtidas após a avaliação clínica de cada paciente (APÊNDICE B). Dados do
28 uso de medicamentos foram obtidos do prontuário, considerando os medicamentos
29 em uso na data da coleta.

1

2 4.3 MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

3 O peso corporal foi medido anteriormente à coleta de sangue, usando uma
4 balança eletrônica com acurácia de 0,1 kg, na qual os pacientes usavam roupas
5 leves e estavam descalços; altura foi medida com um estadiômetro de precisão de
6 0,1 cm. Índice de massa corporal (IMC) foi calculado como peso (kg) dividido pela
7 altura (m) ao quadrado.

8

9 4.4 DIAGNÓSTICO DA RCU

10 O diagnóstico de RCU foi realizado de acordo com a avaliação clínica e
11 combinação de investigações endoscópica, histológica e bioquímicas conforme
12 proposto no terceiro consenso europeu baseado em evidências sobre diagnóstico e
13 manejo da colite ulcerativa (MAGRO, et. al., 2017).

14 A avaliação clínica foi feita considerando a presença de sintomas como aumento
15 da frequência e diminuição da consistência das fezes, presença de diarreia
16 mucossanguinolenta, dor abdominal, tenesmo, urgência fecal, febre, fadiga e
17 anorexia; avaliação de uso prévio de medicamentos (anti-inflamatórios não-
18 esteroidais, antibióticos), de possível contato com doenças infecciosas entéricas,
19 história familiar de DC ou RCU e de câncer colorretal. Avaliação de presença de
20 manifestações extra intestinais (reumatológicas, dermatológicas, oftálmicas, e outras)
21 (MAGRO et al ; 2017).

22 Foram avaliados exames laboratoriais como hemograma, eletrólitos, função
23 hepática e renal, perfil de ferro e provas inflamatórias como PCR e VHS. Exames
24 fecais como parasitológico de fezes e coproculturas para exclusão de diarreias
25 infecciosas (TRAVIS et al., 2003).

26

27 4.5 DIAGNÓSTICO DA DC

28 O diagnóstico de DC foi realizado de acordo com a avaliação clínica e
29 combinação de investigações endoscópica, histológica, radiológica e bioquímicas
30 conforme proposto no terceiro consenso europeu baseado em evidências sobre
31 diagnóstico e manejo da doença de Crohn (GOMOLLÓN, et al., 2017).

32 A avaliação clínica e laboratorial foi realizada conforme descrito previamente
33 no diagnóstico da RCU.

1 Na análise histopatológica a inflamação crônica (linfócitos e plasmócitos) focal
2 (descontínua), irregularidade focal de criptas (distorção de criptas descontínuas) e
3 granulomas (não relacionado a lesão de criptas) são características microscópicas
4 que permitem o diagnóstico de DC. As mesmas características em adição com
5 irregularidade arquitetural vilosa podem ser utilizadas para as amostras do íleo
6 terminal (GOMOLLÓN et al., 2016).

7 Foi realizada a avaliação da extensão e localização da DC no intestino
8 delgado através de radiografia contrastada de morfologia de intestino delgado ou por
9 meio de enterografia por tomografia computadorizada.

10

11 4.6 EXAMES DE IMAGEM

12 Foi realizada a videocolonosopia com ileoscopia ou
13 videorretosigmoidoscopia (videocolonoscópio EC-250HL5-sistema EPX 2500
14 Fujinon, Tóquio, Japão) dos pacientes para a avaliação da atividade endoscópica
15 das DII, com avaliação do aspecto macroscópico das lesões colônicas e realização
16 de biópsias para análise histopatológica. Foram coletados para a biópsia no mínimo
17 dois fragmentos em, pelo menos, cinco locais diferentes do cólon e reto, incluindo
18 fragmentos da mucosa de íleo terminal (MOWAT et al., 2011). O preparo prévio foi
19 feito com manitol 20%, conforme o protocolo de serviço do ambulatório de
20 Gastroenterologia do AEHU.

21

22 4.6.1 Análise Histopatológica e Atividade da RCU

23 Na análise histopatológica o diagnóstico microscópico da RCU foi baseado na
24 combinação de distorção arquitetural e criptas e atrofia mucosa e um infiltrado
25 inflamatório transmucoso difuso com plasmocitose basal, com inflamação ativa
26 causando criptite e abscessos de criptas (MAGRO et al.; 2017).

27 Para a atividade endoscópica foi utilizado o Escore endoscópico de Mayo
28 (FAUSEL et al., 2016), em que classifica-se a gravidade do padrão macroscópico
29 das lesões colônicas pelo escore de Mayo (0- normal, 1- friabilidade leve, 2-
30 friabilidade moderada e 3- sangramento espontâneo) (Quadro 4).

31

32 **Quadro 4:** Escore Endoscópico de Mayo para a Retocolite Ulcerativa

SUBESCORE ENDOSCÓPICO DE MAYO

0=Mucosa normal ou doença inativa
1=Doença leve (enanterna, diminuição do padrão vascular, friabilidade leve)
2=Doença moderada (enanterna evidente, perda do padrão vascular, friabilidade, erosões)
3=Doença grave (sangramento espontâneo, e ulcerações)

1

2 MAYO 0: Doença Inativa; MAYO 1: Atividade Leve; MAYO 2: Atividade Moderada; MAYO 3: Atividade Grave

3 Fonte: FAUSEL et al., 2016

4 4.6.2 Atividade da DC

5 Na avaliação da atividade da doença foi utilizado o índice de atividade da
6 doença de Crohn (CDAI) para avaliar a atividade clínica (BEST et al., 1976) e para
7 avaliação endoscópica de atividade da doença foi utilizado o escore endoscópico
8 simples para doença de Crohn (CDEIS) (Quadro 5) (FAUSEL et al., 2016).

9

10 **Quadro 5:** Índice Endoscópico de Gravidade da Doença de Crohn (CDEIS)

Índice de gravidade endoscópica da doença de Crohn (CDEIS)						
	Íleo	Cólon direito	Tranverso	Cólon esquerdo e sigmóide	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						D

adicionar +3	
--------------	--

Total B+C+D= escore CDEIS

1 <3: REMISSÃO; 3-8: ATIVIDADE LEVE; 9-12: ATIVIDADE MODERADA; >12: ATIVIDADE GRAVE

2 **Fonte:** MARTEAU; 2013.

3

4 4.7 ANÁLISES LABORATORIAIS

5 As amostras de sangue foram coletadas após 12h de jejum. As amostras de
6 sangue total, soro e plasma foram obtidas. O soro, plasma e *buffy coat* foram
7 separados após centrifugação de sangue do paciente, obtido em tubo de coleta sem
8 anticoagulante ou com anticoagulante EDTA, respectivamente, por 15 minutos a
9 3.000 rpm para separação e foram aliquotadas e armazenadas a -80°C até a
10 realização dos testes.

11 Os níveis de proteína C reativa foram determinados por turbidimetria
12 utilizando o equipamento C 8000 (ABBOTT Laboratory).

13 Os níveis plasmáticos de citocinas (TGF-β1 e IL-10) foram avaliados
14 utilizando um sistema de detecção baseado em fluorescência realizado pela
15 plataforma luminex MAGPIX® (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA).

16

17 4.8 VARIANTES GENÉTICAS

18 O DNA foi extraído das amostras de sangue periférico utilizando o kit de
19 extração Biopur Mini Spin Plus Kit (Biometrix, Curitiba, Paraná, Brazil), de acordo
20 com a instrução do fabricante e armazenado a -20°C até o uso. A concentração de
21 DNA foi medida a 260 nm em um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo
22 Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

23

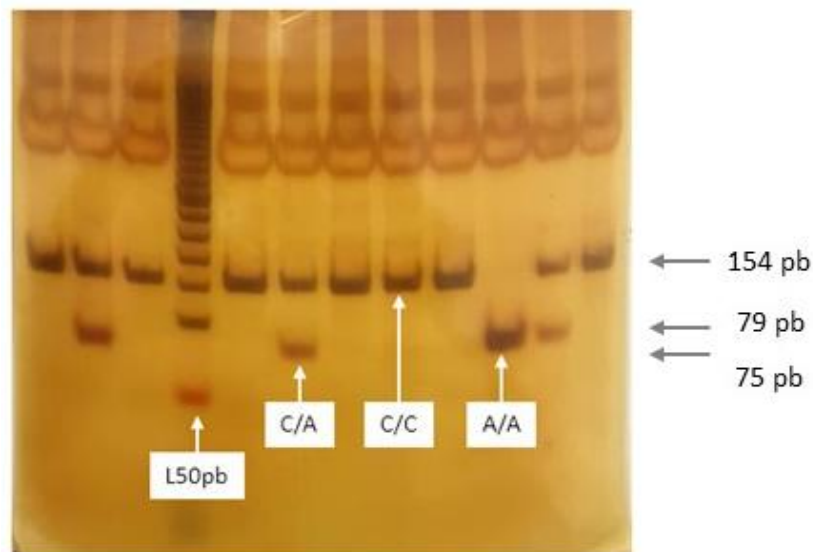
24 4.8.1 Variante Genética do *IL10* (rs1800872)

25 Foram utilizados aproximadamente 100 ng de DNA para amplificar a variante
26 do gene *IL10* -592 C>A (rs1800872), utilizando *primers* sintetizados de acordo com a
27 sequência depositada no *GenBank* sob o número de acesso NG_012088.1. O *primer*
28 *forward* é formado pela sequência 5'GTG GAA ACA TGT GCC TGA GA 3' e o
29 *primer reverse* é formado pela sequência 5'ATG AGG GGG TGG GCT AAA TA 3'.
30 Após a amplificação de um fragmento de 154 pares de base (pb) do gene da *IL10*, o
31 mesmo foi submetido à digestão com a enzima de restrição *RsaI*. Os produtos de
32 digestão foram analisados segundo o Polimorfismo do Comprimento dos

1 Fragmentos de Restrição, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*
 2 (RFLP) pela eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata.
 3 O alelo A foi definido com fragmentos de 79 e 75 pb, enquanto que o alelo C não
 4 sofre clivagem permanecendo com 154 pb (CAPASSO, et. al., 2007).

5 **Figura 6:** Gel em acrilamida 10% da digestão com a enzima de restrição *RsaI*,
 6 corado com nitrato de prata, após a amplificação de um fragmento de 154 pares de
 7 base do gene *IL10*

8



9

10 pb: pares de base; L: Ladder 50 pb; A: fragmentos de 79pb e 75 pb; C: fragmento de 154 pb; pb:
 11 pares de base

12 **Fonte:** o próprio autor

13

14 4.8.2 Variante Genética do *TGFB1* (rs1800469)

15 A variante -509 C>T, C509T ou -1347 C>T (rs1800469) do gene *TGFB1* foi
 16 avaliada por reação em cadeia da Polimerase (PCR) qualitativa (qPCR) pelo método
 17 de TaqMan®. Foi utilizado um ensaio validado (C__8708473_10, Life Technologies
 18 Corporation, Carlsbad, CA, USA) com *primers* específicos e sondas fluorescentes
 19 para determinação dos possíveis genótipos ([**VIC/FAM**] GAG GAG GGG GCA ACA
 20 GGA CAC CTG A[A/G]G GAT GGA AGG GTC AGG AGG CAG ACA). Os níveis de
 21 fluorescência dos produtos de PCR foram avaliados pelo termociclador StepOne
 22 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

23

1 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

2 As variáveis categóricas foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado. Os
3 dados foram expressos em número absoluto e porcentagem (%). Para verificar a
4 distribuição dos dados, foi utilizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para
5 avaliar a homogeneidade de variância foi utilizado o teste de Levene. Os dados que
6 não demonstraram distribuição normal ou homogeneidade de variâncias foram
7 transformados em logaritmo natural (Ln) e testados novamente para normalidade.
8 Dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann Whitney. Os dados
9 foram expressos em mediana e percentis (25-75%). As variáveis que apresentaram
10 $p < 0,10$ na análise univariada foram incluídas no modelo de regressão logística
11 múltipla. A análise de regressão logística binária foi realizada para avaliar o efeito
12 das variantes genéticas no grupo de estudo e foram determinados *odds ratio* (OR) e
13 intervalo de confiança (IC) de 95%. A associação entre a variante genética de *IL10* e
14 *TGFB1* foram analisadas em modelos diferentes: alélico, dominante, codominante e
15 recessivo. A distribuição das variantes de *TGFB1* e *IL10* entre DII foram avaliadas
16 pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para os grupos DII, RCU, DC e controles.
17 Para todos os testes estatísticos, foi considerado o nível de significância de $p < 0,05$.
18 As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico SPSS versão 20.0
19 para windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA).

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

5 RESULTADOS

Os resultados desta dissertação foram apresentados e discutidos no artigo científico intitulado “*IL10* (rs1800872) and *TGFB1* (rs1800469) genetic variants in Patients With Inflammatory Bowel Disease”.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

5.1 ARTIGO

Title: “*IL10* (rs1800872) and *TGFB1* (rs1800469) genetic variants in Patients With Inflammatory Bowel Disease”

Abstract

Objective: To evaluate the association between Inflammatory Bowel Disease (IBD), Ulcerative Colitis (UC) and Crohn Disease (CD) and the *TGFB1* -509 C>T (rs1800469) and *IL10* -592 C>A (rs1800872) gene variants and to examine the association between these ,variances and the cytokines levels present in IBD, as well as to verify the association with disease activity. **Subjects and Methods:** The study included 178 IBD patients, 89 with UC and with 89 CD and 171 healthy control individuals. **Results:** DII did not differ in age, sex, ethnicity and BMI between patients and controls ($p > 0.05$). IL-10 and TGF- β 1 levels increased significantly in IBD compared to the control group ($p < 0.001$). The *IL10* -592 C>A variant (rs1800872) was not associated with patients with IBD, UC or CD. *TGFB1* -509 C> T (rs1800469) did not show significant difference in IBD, UC and CD in patients when compared to controls in the allelic model ($p = 0.418$; $p = 0.653$; $p = 0.381$, respectively). Plasma levels of IL-10 and TGF- β 1 did not differ between patients with UC ($p = 0.553$; $p = 0.510$, respectively) in relation to disease remission assessed by the total MAYO score. There was no association between the total MAYO score and *IL10* -592 C> A, and in the *TGFB1* -509 C>T genotype model. Regarding patients with CD, IL-10 levels were higher in patients with CDEIS > 8 when compared to CDEIS \leq 8 ($p = 0.046$). TGF- β 1 levels did not differ between groups in relation to CDEIS ($p = 0.362$). The genetic variant of *IL10* and *TGFB1* showed no significant difference in CD patients compared to CDEIS in any genotype model. **Conclusion:** IBD patients shows higher levels of IL-10 and TGF- β 1, both in CD and UC, when compared to controls. The genotype *IL10* CC of the variant -592 C>A and genotype *TGFB1* TT of the variant -509 C>T were associated to higher plasmatic levels of TGF- β 1. Regarding the disease activity, plasma levels of IL-10 were associated with a CDEIS score greater than 8 on the CD.

1 **Key Words:** Crohn's Disease, Ulcerative Colitis, *IL-10* -592 C>A, *TGFB1* -509 C>T,
2 Polymorphism

4 INTRODUCTION

5
6 Inflammatory bowel disease (IBD) is a chronic immunomediated disease
7 affecting the gastrointestinal tract. IBD consists of two subtypes: ulcerative colitis (UC)
8 and Crohn's disease (CD) (GLASSNER et al., 2019).

9 UC usually involves the rectum and can affect part or the entire colon in a
10 continuous pattern. In contrast, CD involves the terminal ileum, cecum, perianal area,
11 and colon, but it can affect any region of the intestine in a discontinuous pattern. CD
12 exhibits histologically a thickened submucosa, transmural inflammation, fissuring
13 ulceration, and granulomas, whereas the inflammation in UC is limited to the mucosa
14 and submucosa with cryptitis and crypt abscesses (QINGDONG; 2019).

15 IBD is thought to develop as a result of interactions between environmental,
16 microbial, and immune-mediated factors in a genetically susceptible host. Although
17 the cause of IBD remains unknown, considerable progress has been made in recent
18 years to unravel the pathogenesis of this disease (GLASSNER et al., 2019).

19 As a result of an inappropriate activation, the mucosal immune system
20 becomes compromised and inflammatory reactions are initiated, involving many cells
21 and mediators of immunity. Cytokines, chemokines, and growth factors (which are
22 soluble signaling molecules of the immune system) play important roles in the
23 pathophysiology of IBD (SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-
24 FURUSHO; 2008; STROBER; FUSS; 2011).

25 Overall, anti-inflammatory cytokines that play a role in IBD include IL-10 and
26 TGF- β 1. IL-10 is an anti-inflammatory cytokine that inhibits both antigen presentation
27 and subsequent release of proinflammatory cytokines, thereby attenuating mucosal
28 inflammation. Similarly, TGF- β 1 is an inhibitory cytokine recognized as a key
29 regulator of immunological homeostasis and inflammatory responses. Evidences
30 suggest that TGF- β 1 can act in concert with epidermal, insulin-like, fibroblast growth
31 factors, as well as vascular endothelial growth factor (VEGF) to protect host tissue
32 from luminal challenges and facilitate repair of mucosal injury in IBD (SANCHEZ-
33 MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ; YAMAMOTO-FURUSHO; 2008).

1 Differences in TGF- β 1 production have been linked to variants in gene
2 promoter regions (AWAD et al. 1998; GRAINGER et al. 1999; TAGORE et al. 1999;
3 KOSS et al, 2000; WANG et al. 2011).

4 Individual differences in cytokine synthesis could explain the susceptibility to
5 IBD and its phenotypic heterogeneity. Studies about the influence of *TGFB1* and *IL10*
6 genetic variances on the IBD pathogenesis have been published with controversial
7 results (BANK et. al., 2014; GIUFFRIDA et. al., 2019; KOELINK et. al., 2019; ZHU et
8 al., 2013). However, until now, there is no study that assessed *TGFB1* -509 C>T
9 variant in IBD and few studies evaluated *IL10* -592 C>A genetic variant in this
10 disease.

11 Therefore, the aim of this study was to analyze the association between IBD,
12 UC and CD and the *TGFB1* -509 C>T and *IL10* -592 C>A variants and to examine
13 the association between these variants and cytokines present in IBD in a mixed-race
14 population.

15

16 **SUBJECTS AND METHODS**

17 *Subjects*

18 The study included 178 IBD patients, 89 with UC and 89 with CD, of both
19 sexes aged between 18 and 70 years old, consecutively recruited from the
20 Gastroenterology Outpatient of the State University of Londrina, Londrina, Paraná,
21 South Brazil. The diagnosis was established according to clinical evaluation and
22 combination of endoscopic, histological, radiological and biochemical investigations
23 as proposed in the 3rd European Evidence-based Consensus on the Diagnosis and
24 Management of UC (MAGRO et al., 2017) and CD (GOMOLLÓN et al., 2017). As
25 controls, 171 healthy individuals were selected among blood donors of the Regional
26 Blood Bank of Londrina and individuals recruited at the urology outpatient clinic, from
27 the same geographic region of the IBD patients.

28 Demographic, epidemiological and anthropometric data (for patients and
29 controls), as well as clinical history, symptoms, and the treatment before the inclusion
30 in this study (for patients) were obtained using a standard questionnaire at the
31 individuals admission. Briefly, body mass index (BMI) was calculated as weight (kg)
32 divided by height (m) squared and the ethnicity was self-reported as Caucasian and
33 non-Caucasian (IBGE, 2011; SUAREZ-KURTZ et al., 2012).

1 This study was conducted after approval by the Institutional Research Ethics
2 Committee of the University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE:
3 91833018.2.0000.5231) and all the invited individuals were informed in detail about
4 the research and gave written informed consent.

6 *Clinical and endoscopic examinations*

7 Clinical activity in UC patients was evaluated by Partial Mayo Index Score:
8 remission (<2), mild (2-4), moderate (5-7), and severe (>7) activity (FAUSEL;
9 KORNBLUTH; DUBINSKI, 2016). In CD patients, clinical activity was assessed by
10 Crohn's Disease Activity Index (CDAI) and the results were classified according to
11 the activity status: remission (≤ 150), mild (151-219), moderate (220-450), and severe
12 or very severe activity (>450) (BEST et al., 1976).

13 The colonoscopies were performed by an experienced gastroenterologist with
14 Fujifilm endoscope (EC-250HL5-system EPX 2500 Fujinon, Minato-Ku, Tokyo, Japan)
15 and immediately after the procedure, the findings were graded according to both
16 Mayo endoscopic score for UC and Crohn's disease endoscopic index of severity
17 (CDEIS) for CD. The inflammatory severity within the intestine determined by Mayo
18 was classified in remission (0), mild (1), moderate (2), and severe activity (3)
19 (FAUSEL; KORNBLUTH; DUBINSKI, 2016) and, according to CDEIS values, as
20 remission (<3), mild (3-8), moderate (9-12), and severe activity (>12) (MARY;
21 MODIGLIANI, 1989). Based on their MAYO and CDEIS values, patients were divided
22 into two groups of endoscopic activity: remission/mild (MAYO ≤ 1 or CDEIS ≤ 8) and
23 moderate/severe (MAYO >1 and CDEIS >8) for statistical analysis (GOMOLLÓN et
24 al., 2017).

25 *Blood collection, IL10 and TGFB1 genetic variants genotyping*

26 After fasting for 12 h, venous blood samples were obtained with anticoagulant
27 ethylene diaminetetracetic acid (EDTA), centrifuged at 3000 rpm for 15 min; further,
28 buffy-coat was separated, divided into aliquots and stored at -80°C until use.

29 One single nucleotide variant in the promoter region of the *IL10* gene located
30 on chromosome 1 was genotyped: -592 A>C (rs1800872) at position 206773062 and
31 one single nucleotide variant in the regulatory region of the *TGFB1* gene located on
32 chromosome 19 was genotyped: -509 C>T or -1347 C>T (rs1800469) at position
33 41354391 according to the international single nucleotide polymorphism database
34 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Genomic DNA was extracted from peripheral

1 blood cells using the Biopur Mini Spin Plus Kit extraction kit (Biometrix, Curitiba,
2 Paraná, Brazil), according to the manufacturer's instructions and stored at -20°C until
3 use. DNA concentration was measured at 260 nm using a NanoDrop 2000c™
4 spectrophotometer (ThermoScientific, Waltman, MA, USA) at 260nm. To genotype
5 the *IL10* -592 A>C variant approximately 100 ng of DNA was used in the PCR, using
6 primers synthesized according to the sequence deposited in the GenBank under the
7 accession number NG_012088.1. The forward primer is formed by the sequence
8 5'GTG GAA ACA TGT GCC TGA GA 3' and the reverse primer is by the sequence
9 5'ATG AGG GGG TGG GCT AAA TA 3'. After the amplification of a 154 bp fragment
10 of the *IL10* gene, it was submitted to digestion with the restriction enzyme *RsaI*. The
11 digestion products were analyzed according to Restriction Fragment Length
12 Polymorphism (RFLP) by electrophoreses in 10% polyacrylamide gel silver nitrate
13 stained. The A allele was defined with fragments of 79 and 75 bp, while the C allele
14 does not undergo cleavage remaining at 154 bp (CAPASSO, et. al., 2007). The -509
15 C>T *TGFB1* variant was genotyped by TaqMan allelic discrimination assay on real-
16 time polymerase chain reaction (qPCR) system (StepOne, Applied Biosystems by
17 Life Techonologies, Carlsbad, CA, USA) and performed using 0.5 µL TaqMan SNP
18 Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) containing two
19 sequence-specific primes and two allele-specific TaqMan® MGB probes with a
20 reporter dye at its 5' end (VIC® or FAM™), 5 µL TaqMan Universal Genotyping Master
21 Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and 5 ng of genomic DNA.

22 *Cytokine plasma levels*

23 Plasma levels of TGF-β1 e IL-10 were evaluated using a fluorescence-based
24 detection system performed by the luminex MAGPIX® platform (Luminex Corporation,
25 Austin, Texas, USA).

26 *Statistical Analysis*

27 Analysis of contingency tables (qui square test) was employed to check the
28 associations between categorical variables and diagnostic groups. We assessed the
29 differences in continuous variables between groups using the Mann-Whitney test.
30 Categorical variables were expressed as absolute number (n) and percentage (%)
31 and continuous variables were expressed as median and interquartile range 25%-
32 75% (IQR). The association between the genetic variant of *IL10* and *TFGB1* was
33 analyzed in allelic, dominant, codominant, and recessive models. Binary or
34 multinomial logistic regression analysis was performed to assess the effect of the

1 genetic variants in the study group and related odds ratio (OR) and 95% confidence
2 interval (CI) were determined. The distribution of *TGFB1* and *IL10* variants among
3 CD and UC patients was evaluated according to the HWE in IBD, UC, CD and control
4 groups. For all statistical tests $p < 0.05$ was considered for significance level.
5 Statistical analyses were performed using IBM SPSS windows version 20 (SPSS,
6 Inc., Chicago, IL, USA).

7

8 **RESULTS**

9

10 There were 110 female patients (61.8%) and 68 male (38.2%) IBD patients;
11 129 (74.1%) were caucasian and 55 (30.9%) were non-caucasian individuals. The
12 median age (IQR) of IBD patients was 47 years (33 – 56), and the median (IQR) BMI
13 of IBD was 26.30 (22.7-29.1) kg/m^2 (Table 1). The comparison of median age, sex,
14 ethnicity and BMI between IBD patients and healthy controls was not significant
15 (Table2).

16 Clinical and endoscopic characteristics of patients with IBD are shown in Table
17 1. According to endoscopic activity evaluated by MAYO in UC patients ($n=89$), 34
18 (38.2%) were in remission, 18 (20.2%) presented mild, 26 (29.2%) moderate, and 11
19 (12.4%) severe endoscopic activity. The median of the Partial Mayo Index Score was
20 1 (IQR 0 – 2) and 53 (59.6%) UC patients were in remission, 32 (36.0%) had mild, 3
21 (3.4%) moderate, and 1 (1.1%) severe clinical activity. The median of endoscopic
22 activity score evaluated by CDEIS in CD patients ($n=89$) was 2 (IQR 1 – 6) and most
23 of the patients, 52 (58.4%), were in remission, while 21 (23.6%) had mild, 7 (7.9%)
24 moderate, and 9 (10.1%) severe activity. According to the clinical disease activity, the
25 median of CDAI was 140.2 (IQR 120 – 170.2) and 55 (61.8%) were in remission, 33
26 (37.1%) had mild activity, 1 (1.1%) moderate, and none of the CD patients had
27 severe or very severe clinical activity (CDAI >450).

28 Regarding the treatment, 92 (52.6%) IBD patients used aminosalicylates
29 (mesalazine and sulfasalazine), 22 (12.5%) corticosteroids, 66 (37.5%) TNF- α
30 inhibitors, and 89 (50.6%) other immune suppressors (azathioprine and
31 methotrexate).

32 *Comparison of cytokines in plasma of IBD patients and controls*

33 The cytokine concentration in plasma is presented in Table 2. The levels of IL-
34 10 and TGF- β 1 were significantly increased in the IBD group compared to the control

1 group ($p < 0.001$). When we analyze according to disease, it was found that IL-10 was
2 increased in both UC ($p < 0.001$) and CD ($p < 0.001$), and TGF- β 1 was expressed at
3 significantly higher levels UC ($p < 0.001$) and CD ($p < 0.001$) patients.

4 5 *Single nucleotide variations in IL10 and TGFB1 genes*

6 Table 3 shows the allelic and genotype frequency of *IL10* -592 C>A and
7 *TGFB1* -509 C>T genetic variants. Associations were tested in four different models:
8 the allelic, codominant (heterozygotes or variant homozygotes *versus* major allele
9 homozygotes), dominant (heterozygotes and variant homozygotes *versus* major
10 allele homozygotes), and recessive model (variant homozygotes *versus* major allele
11 homozygotes and heterozygotes).

12 The *IL10* -592 C>A variant was not associated with IBD, UC or CD patients. In
13 the allelic, the presence of C allele was not associated with IBD ($p = 0.890$), UC
14 ($p = 0.408$), and CD ($p = 0.555$). Moreover, in codominant model, the results
15 demonstrated that the frequency of the CC, CA and AA genotypes did not differ
16 between IBD patients and controls. There was no association regarding genotypes
17 from dominant and recessive model in patients with IBD (Table 3).

18 The *TGFB1* -509 C>T did not show any significative difference in IBD, UC and
19 CD and patients when compared to controls in allelic model ($p = 0.418$; $p = 0.653$;
20 $p = 0.381$, respectively). There was also no significant difference among codominant
21 model, dominant model or recessive model in IBD in relation to controls (Table 3).

22 23 *IL10 and TGFB1 genetic variant and cytokines*

24 Table 4 shows the cytokines in relation to *IL10* -592 C>A among Brazilian
25 patients with IBD, divided in UC and CD and controls. We found a trend of
26 association between dominant model and TGF- β 1 ($p = 0.066$) in IBD patients. When
27 we analyzed according to disease, it shows an association between the TGF- β 1 and
28 dominant models in UC patients was observed. However, this association was not
29 found in CD patients ($p = 0.156$). There was no association between IL-10 levels and
30 *IL10* -592 C>A in both dominant or recessive models in IBD patients when compared
31 to controls. The cytokines levels were measured in relation to *TGFB1* -509 C>T
32 variant among Brazilian patients with IBD, divided in UC and CD and controls. We
33 showed that there was a significant difference between TGF- β 1 in recessive model in
34 patients with UC (OR 0.999, 95% CI: 0.998-1.000, $p = 0.021$) but not in dominant

1 model ($p=0.352$). This association was not found in CD patients in recessive model
2 ($p=0.137$), neither in dominant model ($p=0.606$). We found no significant association
3 between the *IL10* and *TGFB1* in dominant ($p=0.826$, $p=0.642$, respectively) and
4 recessive model ($p=0.815$, $p=0.075$, respectively) for patients with IBD. Besides that,
5 there was no association between IL-10 and dominant or recessive model when we
6 divided according to disease.

7 8 9 10 11 *IL10 and TGFB1 genetic variant, cytokines and disease activity*

12 Table 5 shows plasma levels of IL-10, TGF- β and SNVs of *IL10* -592 C>A and
13 *TGFB1* -509 C>T in relation to disease activity, both UC patients according to MAYO
14 total score and for CD patients expressed by CDEIS.

15 The plasma levels of IL-10 and TGF- β 1 did not differ between UC patients
16 ($p=0.553$; $p=0.510$, respectively) in relation to disease remission evaluated by MAYO
17 total score. And there was no association between MAYO total score and *IL10* -592
18 C>A in codominant, dominant or recessive model in UC patients. These data were
19 adjusted by BMI.

20 Regarding CD patients, the levels of IL-10 were higher in patients with
21 CDEIS >8 when compared to CDEIS \leq 8 ($p=0.046$), independently of age. However,
22 levels of TGF- β 1 did not differ between groups in relation to CDEIS ($p=0.362$). The
23 genetic variants of *IL10* and *TGFB1* did not show significant differences in CD
24 patients in relation to CDEIS in any of the genotype model. These data were adjusted
25 by age.

26 27 **DISCUSSION**

28 In this study, we analyzed the effect of SNVs in *IL10* and *TGFB1* genes in
29 modifying the susceptibility for IBD, both in UC and in CD patients and the influence
30 of these in IL-10 and TGF- β 1 cytokine plasma levels. Besides that, we evaluated the
31 profile of IL-10 and TGF- β 1 in IBD patients, divided according to UC and CD. The
32 main findings of the present study are that the TGF- β 1 levels are associated with
33 *IL10* -592 C>A variant in dominant model and with *TGFB1* -509 C>T variant in
34 recessive model in UC patients.

1 In the present study we investigated the plasma concentration of IL-10 and
2 TGF- β 1 by applying a high sensitivity fluorescence-based detection system. The
3 selected cytokines have been shown to have pathophysiological associations in both
4 experimental models and human IBD (SANCHEZ-MUÑOZ; DOMINGUEZ-LOPEZ;
5 YAMAMOTO-FURUSHO, 2008).

6 IL-10 is a Th2 cytokine with marked anti-inflammatory effects (it inhibits
7 macrophage and lymphocyte function while decreasing the production of several
8 proinflammatory cytokines and nitric oxide) therefore, its overexpression in IBD
9 patients might seem paradoxical. The most accepted hypothesis argues that
10 although the biological activity of IL-10 is intact, its overexpression is not sufficient to
11 counteract the proinflammatory mechanisms (RODRÍGUEZ-PERÁLVAREZ, et al.,
12 2012). On the other hand, high levels of IL-10 have been described and may play a
13 role in the pathogenesis of IBD (KUCCHARZIK et. al, 1995). Similarly, there is a high
14 expression of TGF- β 1 in IBD patients. The TGF- β 1 is an inhibitory cytokine
15 recognized as a key regulator of immunological homeostasis and inflammatory
16 responses. Some studies performed in mucosa of IBD patients have reported that
17 TGF- β 1 expression was elevated in active IBD patients, especially in lamina propria
18 lymphocytes (MCCABE, et al. 1993; BABYATSKY; ROSSITER; PODOLSKY, 1996;
19 DELL ZOTTO, 2003) in the intestinal mucosa overlying structures in CD patients (DI
20 SABATINO et al.,2008) and in structured intestinal muscle obtained from surgically
21 resected ilea of CD patients (LI et al, 2013). Serum TGF- β 1 levels in IBD patients
22 have also been evaluated by Sambuelli et al. (2000), which reported that the serum
23 TGF- β 1 levels was higher in active UC patients compared to healthy controls, and
24 Kiernan et al. (2019), showed that TGF- β 1 was also increased in patients with CD
25 but not UC. Therefore, TGF- β 1 levels are increased in IBD tissues, but this may not
26 be sufficient to counteract the ongoing inflammation (IHARA; HIRATA; KOIKE, 2017).

27 In relation to disease susceptibility, the results of this study do not support that
28 IBD, CD or UC susceptibility are related to the specific variants of the cytokine genes
29 evaluated. The allelic and genotype frequencies of *IL10* -592 C>A or *TGF β 1* -509C >
30 T were not significantly different among all IBD patients, CD or UC patients compared
31 to controls. These data are supported by other studies, which found no association
32 between *IL10* -592 C>A gene variants, and CD or UC susceptibility (KLEIN et al,
33 2000; KIM et al 2003; CANTOR et al 2005; HONG, et al 2008; WANG et al 2011,

1 ALMEIDA et al 2013; BANK et. al., 2014). These findings can be explained for the
2 existence of other genetic variations (LÓPEZ-HERNÁNDEZ et. al., 2014).

3 Other studies, however, provide conflicting results. Garcia-Gonzalez and
4 collaborators (2000) identified that individuals homozygous for *IL10* -592 C>A
5 genotypes show significantly lower occurrence of IBD in Mexican population than
6 those other genotypes. Lin and collaborators (2017) studied *IL10* association with
7 adult IBD and healthy controls from Pennsylvania and results indicated that *IL10*
8 SNVs rs1800872 and rs3024498 are significantly associated with IBD in adult but not
9 in pediatric patients.

10 The possible explanations to account for these discrepant results include
11 differing sample sizes, ethnicities, and methodologies. However, another variable,
12 perhaps the most important to consider is disease heterogeneity. Many of our
13 patients are non caucasians. Furthermore, most are in the remission of the disease.

14 The effect of the *IL10* -592 C>A variant on IBD has been documented in some
15 studies, whereas only a limited number of studies have investigated associations with
16 the *TGFβ* -509 C>T variants.

17 Until the present data, there are no study that evaluated the association
18 between *TGFB1* -509 C>T and susceptibility of IBD, in UC or CD patients. A Brazilian
19 study showed that the *TGFB1* gene variants may be associated to the development
20 of CD, but they didn't evaluate the *TGFβ1* -509 C>T variant (ALMEIDA et al, 2013).
21 Some studies just suggested this variant might contribute to a decreased risk on
22 colorectal cancer susceptibility (LIU et. al., 2012), or just association with colon
23 cancer (SLATTERY et al. 2011), or yet association (JIN et al., 2008) or no significant
24 difference in esophageal squamous cell carcinoma (WEI et. al. 2007).

25 In relation to association between cytokines concentration and genetic variants,
26 we did not found significant difference between *IL10* -592 C>A and *TGFB1* -509 C>T
27 and plasma levels of IL-10 in IBD, UC or CD patients. Few studies evaluated the
28 association between IL-10 and TGF-β1 plasma levels in these variants (ALMEIDA et.
29 al., 2013; DARYANI et al.,2017). Koss and collaborators (2000), also did not find
30 association between plasma levels of IL-10 and *IL10* -592 C>A in IBD patients.
31 However, Wang and collaborators (2011) observed that the T allele of *IL10* -592 C>A
32 were associated with increased IL-10 serum levels in CD patients.

33 Other factor to be considered is that the necessity of functional IL-10 receptor
34 signaling for immune homeostasis. Variants in genes encoding the IL-10 and IL-10

1 receptor are related to cause early-onset IBD. Besides that, conformational changes
2 of the ligand binding IL-10 receptor 1 takes place due to the formation of the complex
3 between the cytokine and receptor. Different pathways and functions can be
4 activated upon the engagement of IL-10 and its receptor (SOUKOU, et. al., 2018).

5 Furthermore, we found an association between the levels of TGF- β 1 and C
6 allele carriers in *IL10* -592 C>A in UC patients, but not with IBD and CD patients.
7 Moreover, the levels of TGF- β 1 are associated to T allele carriers in *TGFB1* -509
8 C>T in UC, but not in IBD or CD patients.

9 Some studies showed that individuals who present TT genotype in *TGFB1* -
10 509 C>T show increased gene expression of TGF- β 1 in comparison to CC genotype
11 individuals. Furthermore, T allele carriers have almost double plasma levels in
12 comparison to C allele carriers, in a dose-response relationship. Corroborating with
13 these findings, in vitro studies using TGF- β 1 promoter-luciferase reporter plasmids
14 demonstrated that the T allele increases relative luciferase, compared to the C allele.
15 Taken together, this data supports an influence of -509 C>T SNP on *TGFB1* gene
16 expression and hence plasma levels. Changes in the nucleotide binding sequence of
17 transcription factors may be responsible for differential *TGFB1* gene expression
18 associated with -509 C>T SNV (CEBINELLI et al.; 2016).

19 As hypothesized by Shah and collaborators (2006), increased TGF β -1 levels
20 might result from T allele because of the loss of negative regulation. In their results it
21 was shown that Activator protein 1 (AP1) is only recruited when C allele is encoded
22 at the -509 position, and this recruitment causes the reduction in luciferase activity. In
23 addition, the transcription factor hypoxia-inducible factor 1A binds a site surrounding
24 the -509 position, and competes with AP1 when the C allele is present. Therefore,
25 our study is the first to evaluate plasma levels of TGF- β 1 in *TGFB1* -509 C>T in IBD.

26 The present study was not able to replicate the findings previously cited. We
27 showed that the presence of T allele in *TGFB1* -509 C>T decrease TGF- β 1 levels in
28 UC patients. The reason for the conflicting results from the different studies is unclear,
29 but possible explanations include differences in experimental conditions and cell
30 types and population differences and/or environmental factors that interact with these
31 SNPs. Besides that, Jostins and contributors (2012) showed that 70% of the IBD loci
32 are shared with other complex diseases. In this case others SNVs can be involved in
33 the cytokine expression.

1 We found that the plasma levels of IL-10 and TGF- β 1 are higher in IBD
2 patients, both UC and CD when compared to controls. However, previous studies
3 also find higher IL-10 plasma levels in UC than controls (SZKARADKIEWICZ et al.,
4 2009; RODRÍGUEZ-PERLVÁREZ et al 2012; KOROLKOVA et al., 2015; KIERNAN
5 et al. 2019) but not observed in CD patients (SZKARADKIEWICZ et al., 2009;
6 KOROLKOVA et al., 2015, KIERNAN et al. 2019). Rodríguez-Perlvárez and
7 collaborators (2012) showed that patients with moderate or severe clinical activity
8 had significantly higher levels of IL-10 than those with inactivity or mild disease. IL-10
9 is an anti-inflammatory cytokine produced by Treg, macrophages M2 and other cells
10 to modulate the inflammatory autoimmune responses (WAN; FLAVELL, 2007). IL-10
11 acts directly on Treg cells to maintain *Forkhead box protein P3* (FoxP3) expression
12 and suppressive capacity (MURAI et al. 2009), as well as on antigen-presenting cells
13 (FIORENTINO et al., 1991). Moreover, infliximab treatment could increase TGF- β 1
14 and IL-10 serum levels in CD patients (DI SABATINO et al., 2010). In the present
15 study, 37.5% of CD patients used TNF inhibitors. Thus, our data suggested that
16 elevated TGF- β 1 and IL-10 plasma levels could be related to inflammation activity
17 and therapy response, and represent compensatory mechanisms involved in
18 mucosal healing. We suggest that the mechanism of negative feedback plays a role
19 on this regulation. Besides that, IL-10 and TGF- β 1 contribute to the pathogenesis of
20 IBD, decreasing the inflammatory process by down-regulating pro-inflammatory
21 cytokine production (MUZES et. al., 2012)

22 Regarding to disease activity two studies reported the association between
23 cytokines and MAYO for UC patients and CDEIS for CD patients (FENG et. al, 2014;
24 LIJUCA et. al, 2010). In agreement with our results, Feng et al 2014 analyzed the
25 correlation between the cytokine's levels and disease's activity of UC patients and
26 showed that there is no direct correlation between IL-10 and TFG- β 1 and the MAYO
27 score. In 2010, Lijuca and collaborators investigated the relationship between serum
28 cytokines and endoscopic activity of CD using CDEIS as a gold standard. They
29 showed that IL-10 levels are excellent predictors of endoscopic activity in CD
30 patients, and were correlated nonlinearly (power function). IL-10 models had high
31 adjusted R2 values demonstrating diagnostic accuracy for detecting patients with
32 CDEIS.

33 This is the first study, to our knowledge, that evaluated the IBD disease activity
34 and genetic variants of *IL10* -592 C>A and *TGFB1* -509 C>T. However, we did not

1 find significant difference between disease activity in UC or CD patients
2 characterized by MAYO and CDEIS, respectively, and SNVs of *IL10* -592 C>A and
3 *TGFB1* -509 C>T.

4 Some limitations of this study should be considered. This is a case–control
5 design, which does not allow inferences on causal relationship. The second limitation
6 is the small number of participants in each group (UC and CD) what could explain
7 some contradictory results in relation to other studies, although, to our knowledge,
8 this is the first study to investigate the relationship between *TGFB1* -509 C>T and
9 TGF-β1 levels in IBD patients. However, our study has some strong points, such as
10 the statistical analysis of the data was performed with data controlled by sex, age,
11 ethnicity and BMI, these confounding variables could impair the interpretation of the
12 data obtained, and correlate clinical aspects with levels of cytokines and
13 polymorphism.

14 In conclusion, our results demonstrated that the IL-10 and TGF-β1 are higher
15 in IBD patients (both UC and CD) when compared to controls. Besides that, the *IL10*
16 CC genotype of -592 C>A was associated with high plasma levels of TGF-β1 and
17 that *TGFB1* TT genotype -509 C>T was associated with lower levels of TGF-β1 in
18 UC patients. In view of the genetic variants already described, we can see the
19 complexity between the pathophysiology of IBD. Further studies are needed to clarify
20 the mechanisms involved so that new strategies can be developed, especially when
21 with TNF-α inhibitors is not effective. The discovery of new genetic variants, as well
22 as new therapeutic targets, can personalize the treatment for patients affected with
23 these diseases.

24

25 *Conflicts of Interest*

26 The authors declare that they have no competing interests.

27

28 *Ethical approval*

29 All procedures performed in studies involving human participants were in
30 accordance with the ethical standards of the university.

31

32 *Informed consent*

33 All the participants included in this study provided written informed consent.

34

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

REFERENCES

- 18 ALMEIDA NP et al. Polymorphisms of the cytokine genes TGFB1 and IL10 in a
19 mixed-race population with Crohn's disease. **BMC Research Notes**, v. 6,p.387, 2013.
- 20 AWAD MR et al. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene:
21 association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and
22 graft fibrosis after lung transplantation. **Transplantation**, v.66, p.1014–1020, 1998.
- 23 BABYATSKY MW, ROSSITER G, PODOLSKY DK. Expression of transforming growth
24 factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease.
25 **Gastroenterology**, v.110, p.:975–84, 1996.
- 26
27 BANK, S. et. al. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4,
28 TLR9, LY96, NFKBIA,NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and
29 PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a danish
30 cohort. **Plos One**: v.9, n.6, p.1-10, 2014.
- 31
32 BEST, W.R. et al. Development of a chron's disease activity index. National
33 cooperative chron's disease study. **Gastroenterology**, v. 70, n.3, p. 439-44, 1976.
- 34 CANTOR MJ et al. The role of cytokine gene polymorphisms in determining disease
35 susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol**,
36 v.100, n.5, p.1134-42, 2005.

- 1 CEBINELLI GCM, et al. TGF- β 1 functional polymorphisms: a review. **Eur. Cytokine**
2 **Netw**, v.27, n4, p. 81-9 81, 2016.
- 3 DARYANI, N. E. et. al. Interleukin-4 and interleukin-10 gene polymorphisms in
4 patients with inflammatory bowel disease. **Immunological Investigations**: v.46, n.,
5 p.714-729, 2017.
- 6 DEL ZOTTO B et al.TGF-beta1 production in inflammatory bowel disease: differing
7 production patterns in Crohn's disease and ulcerative colitis. **Clin Exp Immunol**,
8 v.134, n.1, p.120-6, 2003.
- 9 DI SABATINO A et al. Blockade of transforming growth factor beta upregulates T-box
10 transcription factor T-bet, and increases T helper cell type 1 cytokine and matrix
11 metalloproteinase-3 production in the human gut mucosa. **Gut**. v. 57, p.605–12, 2008.
- 12 DI SABATINO A. et al. Peripheral regulatory t cells and serum transforming growth
13 factor- β : relationship with clinical response to infliximab in crohn's disease **Inflamm**
14 **Bowel Dis**, v.16, n.11, p. 1891-1897, 2010.
- 15 FAUSEL, R.A.; KORNBLUTH, A.; DUBINSKI, M. The first endoscopy in suspected
16 inflammatory bowel disease. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics**, v. 26, n. 4, p.
17 593-610, 2016.
- 18
19 FIORENTINO DF, ZLOTNIK A, VIEIRA P, et al. IL-10 acts on the antigen-presenting
20 cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **Journal of immunology**, v.146,
21 p.3444–51, 1991.
- 22
23 GARCIA-GONZALEZ M.A. et al. TGFB1 gene polymorphisms and inflammatory
24 bowel disease. **Immunogenetics**, v. 51, p.869-872, 2000.
- 25 GLASSNER K et al. The microbiome and inflammatory bowel disease. **Allergy Clin**
26 **Immunol** ,v 145, n 1, 2019.
- 27 GOMOLLÓN, F. et al. 3rd european evidence-based consensus on the diagnosis and
28 management of crohn's disease 2016: part 1: diagnosis and medical management.
29 **Journal of Crohns Colitis**., v.11, n.1, p. 3-25, 2017.
- 30 GRAINGER DJ et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming
31 growth factor type beta1. **Hum Mol Genet**. V.8, p.93–97, 1999.
- 32 HONG J et al. IL4, IL10, IL16, and TNF polymorphisms in New Zealand caucasian
33 crohn's disease patients. **Int J Colorectal Dis**, v.23, p.335–337, 2008.
- 34 IBGE. Brazilian Institute of Geography and Statistics (2011) Characteristics of the
35 population and households: results of the universe.
36 [https://ww2.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_](https://ww2.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm)
37 [populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm](https://ww2.ibge.gov.br/english/estatistica/populacao/censo2010/caracteristicas_da_populacao/default_caracteristicas_da_populacao.shtm). Accessed 3 Jul 2018.
- 38 GIUFFRIDA, P, et. al. Controlling gut inflammation by restoring anti-inflammatory
39 pathways in inflammatory bowel disease. **Cells**: v.8, n.397, p.1-14, 2019.

- 1 IHARA S, HIRATA Y, KOIKE K. TGF- β in inflammatory bowel disease: a key
2 regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. **J Gastroenterol**,
3 v.52, p. 777–787, 2017.
- 4 JIN G et al. TGF- β 1 and TGF- β 2 functional polymorphisms and risk of esophageal
5 squamous cell carcinoma: a case-control analysis in a chinese population. **J Cancer**
6 **Res Clin Oncol**, v.134, p.345-51, 2008.
- 7 JOSTINS et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of
8 inflammatory bowel disease. **Nature**: 1;491(7422): 119–124, 2012.
- 9 KIERNAN MG et al. Systemic molecular mediators of inflammation differentiate
10 between crohn’s disease and ulcerative colitis, implicating threshold levels of il-10
11 and relative ratios of pro-inflammatory cytokines in therapy. **Journal of Crohn’s and**
12 **Colitis**, v. 2020, p118–129, 2019.
- 13 KIM TH et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin-10 gene polymorphisms in
14 korean patients with inflammatory bowel disease. **Korean J Gastroenterol.**, v.42,
15 n.5, p.377-86, 2003.
- 16 KLEIN W et al. The *IL-10* gene is not involved in the predisposition to inflammatory
17 bowel disease. **Electrophoresis**, v.21, p.3578-3582, 2000.
- 18 KOELINK, P.J., et. al. Anti-TNF therapy in IBD exerts its therapeutic effect through
19 macrophage IL-10 signalling. **Gut**: v.0, p.1–11; 2019.
- 20 KOROLKOVA OY, MYERS JN, PELLOM ST, et al. Characterization of serum
21 cytokine profile in predominantly colonic inflammatory bowel disease to delineate
22 ulcerative and crohn’s colitides. Clinical medicine insights: **Gastroenterology**, v. 8,
23 p.29–44, 2015.
- 24 KOSS k et al. Cytokine (TNF α , LT α and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel
25 diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies.
26 **Genes and Immunity**, v. 1, p. 185–190, 2000.
- 27 KOSS K, SATSANGI J, FANNING GC, WELSH KI, JEWELL DP. Cytokine (TNF α ,
28 LT α and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls:
29 differential effects on production and allele frequencies. **Genes Immun**, v1, p.185–
30 190,2000.
- 31 KUCHARZIK,T et al. Circulating anti-inflammatory cytokine IL-10 in patients with
32 inflammatory bowel disease (IBD). **Clin Exp Immunol**, v.100, p.452-456, 1995.
- 33 LI C et al. Increased activation of latent TGF-b1 by aVb3 in human Crohn’s disease
34 and fibrosis in TNBS colitis can be prevented by cilengitide. **Inflamm Bowel Dis**,
35 v.19, p.2829–39, 2013.
- 36 Liu, Y., et. al. Transforming growth factor ,beta-1 C-509T polymorphism and cancer
37 risk: a meta-analysis of 55 case-control studies. **Asian Pac J Cancer Prev**: v. 13, p.
38 4683-8, 2012.

- 1 LIN Z et al. Genetic association and epistatic interaction of the interleukin-10
2 signaling pathway in pediatric inflammatory bowel disease. **World J Gastroentero**; v.
3 23, n.27, p. 4897-4909, 2017.
- 4 MAGRO, F. et al. Third european evidence-based consensus on diagnosis and
5 management of ulcerative colitis. Part 1: definitions, diagnosis, extra-intestinal
6 manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch
7 disorders. **Journal of Crohn's & Colitis**, v. 11, n. 6, p. 649-70, 2017.
- 8 MARY, J.Y.; MODIGLIANI, R. Development and validation of an endoscopic index of
9 the severity for crohn's disease: a prospective multicentre study. Groupe d'études
10 therapeutiques des affections inflammatoires du tube digestif (getaid). **Gut**, v.30, n.7,
11 p. 983–989, 1989.
- 12 MCCABE RP et al. Cytokine mRNA expression in intestine from normal and
13 inflammatory bowel disease patients. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 66, p.52–8,
14 1993.
- 15 MURAI M, TUROVSKAYA O, KIM G, et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to
16 maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in
17 mice with colitis. **Nature Immunology**, v.10, p.1178–1184, 2009.
- 18 MUZES, G. et. al. Changes of the cytokine profile in inflammatory bowel diseases.
19 *World Journal of Gastroenterology*: 18, 5848, 2012.
- 20 QINGDONG G. A comprehensive review and update on the pathogenesis of
21 inflammatory bowel disease. **Hindawi Journal of Immunology Research**, 2019.
- 22 RODRÍGUEZ-PERÁLVAREZ ML et al. Role of serum cytokine profile in ulcerative
23 colitis assessment. **Inflamm Bowel Dis**, v.18, n10, p.:1864-71, 2012.
- 24 SAMBUELLI A. et al. Serum transforming growth factor-beta1 levels increase in
25 response to successful anti-inflammatory therapy in ulcerative colitis. **Aliment**
26 **Pharmacol Ther**, v.14, p.1443–9, 2000.
- 27 SANCHEZ-MUÑOZ F, DOMINGUEZ-LOPEZ A, YAMAMOTO-FURUSHO J.K. Role
28 of cytokines in inflammatory bowel disease. **World J Gastroenterol**; v.14, n.27, p.
29 4280-4288, 2008.
- 30 SHAH R et al. Allelic diversity in the TGF- β 1 regulatory region: characterization of
31 novel functional single nucleotide polymorphisms. **Hum Genet** , v.119, p. 61-74,
32 2006.
- 33 SLATTERY ML et al. Genetic variation in the TGF- β signaling pathway and colon and
34 rectal cancer risk. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**,v.20, p.57-69, 2011.
- 35
- 36 SOUKOU, S., et. al. Role of il-10 receptor signaling in the function of cd4+ t-
37 regulatory type 1 cells: t-cell therapy in patients with inflammatory bowel disease.
38 **Critical Review in Immunology**: v.38, n.5, p.415–431, 2018.
- 39

- 1 STROBER W, FUSS I.J. Pro-inflammatory cytokines in the pathogenesis of ibd.
2 **Gastroenterology**, v. 140, n.6, p. 1756–1767, 2011.
- 3 SUAREZ-KURTZ, G. et al. Pharmacogenomic diversity among brazilians: influence
4 of ancestry, self-reported color, and geographical origin. **Frontiers in Pharmacology**,
5 v.3, p.1–7, 2012.
- 6 SZKARADKIEWICZ A et al. Proinflammatory cytokines and IL-10 in inflammatory
7 bowel disease and colorectal cancer patients. **Arch. Immunol. Ther. Exp.**, v.57,
8 p.291–294, 2009.
- 9 TAGORE A ET AL. Interleukin-10 (IL-10) genotypes in inflammatory bowel
10 disease. **Tissue Antigens**, v. 54, p.386–390, 1999.
- 11 WAN, Y.Y.; FLAVELL, R.A. ‘Yin-Yang’ functions of TGF- β and Tregs in immune
12 regulation. **Immunological Reviews**: n.220, p.199–213; 2007.
- 13 WANG AH et al. The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels
14 on Crohn’s disease susceptibility in a New Zealand population. **Hum Immunol**, v.72,
15 p.431–435, 2011.
- 16 WEI, Y.S., et al.Genetic variation in transforming growth factor-beta1 gene
17 associated with increased risk of esophageal squamous cell carcinoma. **Tissue**
18 **Antigens** , v.70, p. 464-9, 2007.
19
- 20 ZHU, H. et. al. Interleukin-10 -1082A/G polymorphism and inflammatory bowel
21 disease susceptibility: a meta-analysis based on 17,585 subjects. **Cytokine**: v.61, p.
22 146-153, 2013.

1 **Table 1** - Clinical and endoscopic parameter of patients with inflammatory bowel
 2 disease

Characteristics	Patients with IBD (n=178)
Sex (female/male)/ratio	110 (61.8)/ 68 (38.2)/1,6
Age (year)	47 (33-56)
BMI (kg/m ²)	26.29 (22.7-29.1)
Ethnicity (Caucasian/non Caucasian)	123 (69.1) / 55 (30.9)
MetS (No/Yes)	129 (74.1) / 45 (25.9)
Treatment	
Aminosalicylates (No/Yes)	83 (47.4) / 92 (52.6)
Corticosteroids (No/Yes)	154 (87.5) / 22 (12.5)
Others immune suppressors (No/Yes)	87 (49.4) / 89 (50.6)
TNF- α inhibitor	110 (62.5) / 66 (37.5)
Ulcerative Colitis (UC)	89 (50.0)
Partial MAYO Index Score	
Remission (<2)	53 (59.5)
Mild (2-4)	32 (36.0)
Moderate (5-7)	3 (3.4)
Severe (>7)	1 (1.1)
Mayo Endoscopic Score	
Remission (0)	34 (38.2)
Mild (1)	18 (20.2)
Moderate (2)	26 (29.2)
Severe (3)	11 (12.4)
Crohn's Disease	89 (50.0)
Crohn's Disease Activity Index (CDAI)	
Remission (\leq 150)	55 (61.8)
Mild (151-219)	33 (37.1)
Moderate (220-450)	1 (1.1)
Severe (>450)	0 (0.0)
Crohn's disease endoscopic index of severity (CDEIS)	
Remission (<3)	52 (58.4)
Mild (3-8)	21 (23.6)
Moderate (9-12)	7 (7.9)
Severe (>12)	9 (10.1)

3 Data were expressed as median and IQR (25-75%) and the categorical were expressed by absolute number (%).
 4 IBD: Inflammatory bowel disease

1 **Table 2** - Demographic and clinical characteristics of patients with inflammatory bowel diseases and healthy controls

Characteristics	HC (n=171)	IBD (n=178)	UC (n=89)	CD (n=89)	HC x IBD p value	HC x UC p value	HC x CD p value
Age (year) (25-75)	44 (40-51)	47 (33-56)	48 (36-56)	47 (31-56)	0.275	0.210	0.593
Sex (F/M) (%)	95 (55.6) / 76 (44.4)	110 (61.8) / 68 (38.2)	60 (67.4) / 29 (32.6)	50 (56.2) / 39 (43.8)	0.236	0.064	0.923
Ethnicity (C/NC) (%)	132 (77.2) / 39 (22.8)	123 (69.1) / 55 (30.9)	61 (68.5) / 28 (31.5)	62 (69.7) / 27 (30.3)	0.088	0.130	0.186
BMI (kg/m²) (25-75%)	25.8 (23.8-29.1)	26.3 (22.7-29.1)	26.6 (22.9-28.5)	26.2 (22.6-29.6)	0.518	0.725	0.860
IL-10 (pg/mL)	0.1 (0.1-0.8)	0.3 (0.2-0.7)	0.346 (0.2-0.7)	0.314 (0.2-0.6)	<0.001	<0.001	<0.001
TGF-β1 (pg/mL)	720.3 (301.1-1533.0)	1440.2 (1116.0-1720.4)	1432.7 (1076.1-1722.1)	1451.2 (1196.0- 1696.1)	<0.001	<0.001	<0.001

2 Qui-Square Test. Data are expressed as absolute number (%). Test t of student. Data are expressed as mean (±SD). Mann Whitney Test. Data are expressed as median (25% 75%). F: female; M:
3 male; C: Caucasian; NC: not Caucasian; IL-10: interleukin-10; TGF-β1: transforming growth factor beta; HC: healthy controls; IBD: Inflammatory bowel disease; UC: ulcerative colitis; CD: Crohn's
4 Disease; BMI: Body mass index.

5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

1 **Table 3** - *IL10* and *TGFB1* genotype and allele distribution among Brazilian patients with inflammatory bowel disease (IBD), divided
 2 in ulcerative colitis and Crohn's disease and healthy controls

Model	HC (n =171)	IBD (n=178)	UC (n=89)	CD (n=89)	HC x IBD p value	HC x UC p value	HC x CD p value
<i>IL10</i>							
rs1800872							
-592C>A							
Allelic							
C	226 (66.1)	237 (66.6)	124 (69.7)	113 (63.5)	-	-	-
A	116 (33.9)	119 (33.4)	54 (30.3)	65 (36.5)	0.890	0.408	0.555
Codominant							
CC	78 (45.6)	77 (43.3)	43 (48.3)	34 (38.2)	-	-	-
CA	70 (40.9)	83 (46.6)	38 (42.7)	45 (50.6)	0.422	0.956	0.166
AA	23 (13.5)	18 (10.1)	8 (9.0)	10 (11.2)	0.511	0.309	0.995
Dominant							
CC	78 (45.6)	77 (43.3)	43 (48.3)	34 (38.2)	-	-	-
CA+AA	93 (54.4)	101 (56.7)	46 (51.7)	55 (61.8)	0.658	0.679	0.253
Recessive							
CC+CA	148 (86.5)	160 (89.9)	81 (91.0)	79 (88.8)	-	-	-
AA	23 (13.5)	18 (10.1)	8 (9.0)	10 (11.2)	0.334	0.295	0.611
<i>TGFB1</i>							
rs1800469							
-509 C>T, C509T or -1347 C>T							
Allelic							
C	218 (63.7)	236 (66.7)	117 (65.7)	119 (67.6)	-	-	-
T	124 (36.3)	118 (33.3)	61 (34.3)	57 (32.4)	0.418	0.653	0.381
Codominant							
CC	69 (40.4)	81 (45.8)	42 (47.2)	39 (44.3)	-	-	-
CT	80 (46.8)	74 (41.8)	33 (37.1)	41 (46.6)	0.300	0.172	0.724
TT	22 (12.9)	22 (12.4)	14 (15.7)	8 (9.1)	0.640	0.910	0.336
Dominant							
CC	69 (40.4)	81 (45.8)	42 (47.2)	39 (44.3)	-	-	-
CT+TT	102 (59.6)	96 (54.2)	47 (52.8)	49 (55.7)	0.308	0.291	0.540
Recessive							
CC + CT	149 (87.1)	155 (87.6)	75 (84.3)	80 (90.9)	-	-	-
TT	22 (12.9)	22 (12.4)	14 (15.7)	8 (9.1)	0.903	0.526	0.371

The genotyping was successful in: 178 cases and 171 controls for IL-10. Bold values represent statistically significant values. Paired by age, sex, ethnicity, and body mass index. HC: healthy controls; IBD: Inflammatory bowel disease; UC: ulcerative colitis; CD: Crohn's Disease. The values were expressed as absolute number and percentage (%).

1 **Table 4 – Cytokine plasma levels in relation to *IL10* -592 C>A and to *TGFB1* -509 C>T in the dominant and recessive models for**
 2 **patients with inflammatory bowel disease, divided in ulcerative colitis and Crohn's disease and healthy controls**

3

<i>IL10</i> -592 C>A						
Characteristic	IBD		p value	IBD		p value
	CC (n=77)	CA+AA (n=101)		CC+CA (n=160)	AA (n=18)	
IL-10 (pg/mL)	0.2 (0.1-0.6)	0.2 (0.1-0.8)	0.751	0.2 (0.1-0.6)	0.3 (0.1-1.7)	0.342
TGF-β1 (pg/mL)	1344.0 (993.9-1733.4)	1204.3 (567.5-1673.6)	0.066	1263.0 (837.7-1718.7)	1272.0 (460.8-1696.1)	0.943
Characteristic	UC		p value	UC		p value
	CC (n=43)	CA+AA (n=46)		CC+CA (n=81)	AA (n=08)	
IL-10 (pg/mL)	0.2 (0.1-0.6)	0.2 (0.1-0.9)	0.503	0.2 (0.1-0.7)	0.7(0.1-2.2)	0.100
TGF-β1 (pg/mL)	1304.4 (833.2-1734.0)	969.0 (389.6-1665.1)	0.035	1171.7 (531.6-1720.4)	911.2 (420.5-1513.7)	0.469
Characteristics	CD		p value	CD		p value
	CC (n=34)	CA+AA (n=55)		CC+CA (n=79)	AA (n=10)	
IL-10 (pg/mL)	0.2 (0.1-0.7)	0.1 (0.1-0.7)	0.636	0.2 (0.1-0.6)	0.2 (0.1-2.0)	0.145
TGF-β1 (pg/mL)	1221.1 (773.5-1740.9)	1113.1 (420.5-1671.4)	0.156	1156.1 (509.6-1680.9)	1209.6 (420.5-1696.1)	0.933
<i>TGFB1</i> -509 C>T						
Characteristic	IBD		p value	IBD		p value
	CC (n=81)	CT+TT (n=96)		CC + CT (n=155)	TT (n=22)	
IL-10 (pg/mL)	0.2 (0.1-0.7)	0.2 (0.1-0.7)	0.826	0.2 (0.1-0.7)	0.2 (0.1-0.8)	0.815
TGF-β1 (pg/mL)	1257.1 (837.7-1680.9)	1272.6 (131.3-1728.2)	0.642	1273.4 (848.4-1729.0)	1169.6 (261.1-1605.2)	0.075
Characteristics	UC		p value	UC		p value
	CC (n=42)	CT+TT (n=47)		CC + CT (n=75)	TT (n=14)	
IL-10 (pg/mL)	0.2 (0.1-0.7)	0.2 (0.1-0.8)	0.877	0.1 (0.1-0.7)	0.2 (0.1-0.8)	0.944
TGF-β1 (pg/mL)	1156.1 (607.7-1718.7)	1126.4 (424.9-1722.1)	0.352	1184.5 (607.7-1734.0)	589.4 (240.2-1268.2)	0.021
Characteristics	CD		p value	CD		p value
	CC (n=39)	CT+TT (n=49)		CC + CT (n=80)	TT (n=08)	
IL-10 (pg/mL)	0.2 (0.1-0.71)	0.2 (0.1-0.7)	0.883	0.2 (0.1-0.7)	0.1 (0.1-0.8)	0.764
TGF-β1 (pg/mL)	1148.7 (1479.8-1680.9)	119.0 (441.4-1728.3)	0.606	1199.0 (538.4-1696.1)	603.7 (250.7-1674.0)	0.137

4

IL-10: Interleukin-10; TGF-β1: Transforming Growth Factor Beta1; HC: healthy controls; IBD: Inflammatory bowel disease; UC: ulcerative colitis; CD: Crohn's Disease

1 **Table 5** – Cytokine plasma levels, *IL10* -592 C>A and *TGFB1* -509 C>T genetic variants in relation to disease activity in patients
 2 with ulcerative colitis and crohn's disease

	MAYO		*p	CDEIS		**p
	REMISSION	NOT REMISSION		≤ 8	>8	
IL-10 (pg/mL)	0.2 (0.1-0.6)	0.4 (0.2-0.8)	0.533	0.2 (0.2-0.5)	0.7 (0.4-1.0)	0.046
TGF-β1 (pg/mL)	1414.7 (1126.4-1791.0)	1437.0 (977.5-1694.5)	0.510	1590.1 (1258.4-1736.3)	1253.6 (1034.5-1528.9)	0.362
<i>IL10</i> -592 C>A						
Codominant						
CC	19 (56.0)	24 (43.6)	-	24 (36.9)	8 (40.0)	
CA	14 (41.2)	24 (43.6)	0.492	32 (49.2)	11 (55.0)	0.891
AA	1 (2.9)	7 (12.7)	0.103	9 (13.8)	1 (5.0)	0.460
Dominant model						
CC	19 (55.9)	24 (43.6)	-	24 (36.9)	08 (40.0)	-
CA+AA	15 (44.1)	31 (56.4)	0.243	41 (63.1)	12 (60.0)	0.922
Recessive model						
CC+CA	33 (97.1)	48 (87.3)	-	56 (86.2)	19 (95.0)	-
AA	1 (2.9)	7 (12.7)	0.127	9 (13.8)	1 (5.0)	0.418
<i>TGFβ</i> -509C>T						
Codominant						
CC	13 (38.2)	29 (52.7)	-	29 (45.3)	08 (40.0)	-
CT	17 (50.0)	16 (29.1)	0.080	30 (46.9)	10 (50.0)	0.472
TT	4 (11.8)	10 (18.2)	0.846	5 (7.8)	2 (10.0)	0.439
Dominant model						
CC	13 (38.2)	29 (52.7)	-	29 (45.3)	08 (40.0)	-
CT+TT	21 (61.8)	26 (47.3)	0.143	35 (54.7)	12 (60.0)	0.404
Recessive model						
CC+CT	30 (88.2)	45 (81.8)	-	59 (92.2)	18 (90.0)	-
TT	4 (11.8)	10 (18.2)	0.693	5 (7.8)	2 (10.0)	0.566

3 IL-10: Interleukin-10; TGF-β1: Transforming Growth Factor beta1. Data were expressed as median and IQR (25-75%) and the categorical were expressed as absolute number (%). *p adjusted by
 4 BMI. **p adjusted by age.
 5 MAYO: Remission: 0; Not remission: 1,2 and 3 score

1 6 CONCLUSÕES

2

3 Nossos resultados demonstraram que pacientes com DII apresentam níveis
4 mais elevados de IL-10 e TGF- β 1, tanto na DC quanto na RCU, quando comparados
5 com os controles.

6 O genótipo *IL10* CC da variante -592 C>A foi associado a maiores níveis
7 plasmáticos de TGF- β 1 em pacientes com RCU.

8 O genótipo *TGFB1* TT da variante -509 C>T foi associado a níveis mais
9 baixos de TGF- β 1 em pacientes com RCU.

10 Os níveis plasmáticos de IL-10 foram maiores em pacientes com CDEIS >8
11 quando comparados com CDEIS \leq 8.

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

1 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

2

3 Este estudo apresenta algumas limitações. Uma delas é que se trata de um
4 estudo de caso-controle, o que não permite inferências sobre a relação de
5 causalidade. Outra limitação é o pequeno número de participantes em cada grupo
6 (RCU e DC), o que pode explicar algumas contradições com os resultados de outros
7 estudos.

8 Entretanto, nosso estudo apresenta alguns pontos forte, como por exemplo, a
9 análise estatística dos dados foi realizada com dados controlados por sexo, idade,
10 etnia e IMC, essas variáveis confundidoras poderiam prejudicar a interpretação dos
11 dados obtidos.

12 Este é o primeiro estudo a avaliar as variantes genéticas rs1800872 -592C>A
13 do gene *IL10* e rs1800469 -509 C>T, C509T ou -1347 C>T do *TGFB1* e o perfil de
14 citocinas em pacientes com DII na população brasileira e relacionar esses dados
15 com a atividade da doença.

16 Diante das variantes genéticas já descritas, percebe-se a complexidade entre
17 a fisiopatologia e o tratamento das DII. Mais estudos são necessários para
18 esclarecer os mecanismos envolvidos para que novas estratégias sejam
19 desenvolvidas, principalmente quando o tratamento com inibidores de TNF- α não for
20 efetivo. A descoberta de novas variantes genéticas, bem como de novos alvos
21 terapêuticos pode personalizar o tratamento dos pacientes.

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

REFERÊNCIAS

- 1
- 2
- 3 ALMEIDA NP et al. Polymorphisms of the cytokine genes TGFB1 and IL10 in a
4 mixed-race population with Crohn's disease. **BMC Research Notes**, v. 6,p.387, 2013.
- 5 AL-ROBAYAN, A., et. al. Inflammatory bowel disease: the association of
6 inflammatory cytokine gene polymorphisms. **Intech**: Chapter 2, p. 22-50, 2016.
- 7 BANK, S. et. al. Polymorphisms in the inflammatory pathway genes TLR2, TLR4,
8 TLR9, LY96, NFKBIA,NFKB1, TNFA, TNFRSF1A, IL6R, IL10, IL23R, PTPN22, and
9 PPARG are associated with susceptibility of inflammatory bowel disease in a Danish
10 Cohort. **Plos One**: v.9, n.6, p.1-10, 2014.
- 11 BEK, S.; et. al. Systematic review: genetic biomarkers associated with anti-TNF
12 treatment response in inflammatory bowel diseases. **Alimentary Pharmacology &
13 Therapeutics**: v. 44; p. 554-567; 2016.
- 14 BEST W.R., BECKEL,J.M., SINGLETON, J.W., KERN, Jr. F. Development of a
15 chron's disease activity index. National cooperative chron's disease study.
16 **Gastroenterology**: v.70, n.3, p.439-44, 1976.
- 17 BLOEMENDAAL, F.M.; et. al. Anti-tumor necrosis factor with a glyco-engineered fc-
18 region has increased efficacy in mice with colitis. **Gastroenterology**: v.153; n.5;
19 p.1351-1362; 2017.
- 20 CAO H., et al. A functional polymorphism C-509T in TGF- β -1 promoter contributes to
21 susceptibility and prognosis of lone atrial fibrillation in chinese population. **Int J
22 Immunogenet**: v.38, p. 215-24, 2011.
- 23 CAPASSO, M., et. al. Cytokine gene polymorphisms in Italian preterm infants:
24 association between interleukin-10-1082 G/A polymorphism and respiratory distress
25 syndrome. **Pediatr. Res.** 61, 313–317, 2007.
- 26 CARDOZO, W.S.; SOBRADO, C.W. **Doença Inflamatória Intestinal**. 2.ed. Barueri,
27 SP: Manole, 2015.
- 28 CHU, H. Host gene-microbiome interactions: molecular mechanisms in inflammatory
29 bowel disease. **Genome Medicine**: v.9, n.69, p.1-3, 2017.
- 30 CURRO, D; PUGLIESE, D; ARMUZZI, A. Frontiers in drug research and
31 development for inflammatory bowel disease. **Frontiers in Pharmacology**: v.8, p.1-
32 19, 2017.
- 33
- 34 CURY, D.B.; OLIVEIRA, R; CURY, M.S. Inflammatory bowel diseases: time of
35 diagnosis, environmental factors, clinical course, and management – a follow-up
36 study in a private inflammatory bowel disease center (2003–2017). **Journal of
37 Inflammation Research**: n.12, p.127–135, 2019.
- 38 ENGELS, M., et. al. Exercise in patients with inflammatory bowel diseases: current
39 perspectives. **Clinical and Experimental Gastroenterology**: v. 11; p. 1-11; 2018.

- 1 FAUSEL R.A., KORNBLUTH, A., DUBINSKI, M. The first endoscopy in suspected
2 inflammatory bowel disease. *Gastrointest. Endoscopy Clin Am.*:v.26; p.593-610,
3 2016.
- 4 FEUERSTEIN, J.D., et. al. Crohn disease: epidemiology, diagnosis, and
5 management. *Mayo Clin Proc.*: v.92, n.7, p.1088-1103, 2017.
- 6 FLYNN, S.; EISENSTEIN, S. Inflammatory bowel disease presentation and diagnosis.
7 *Surg Clin*: N.99, p.1051–1062, 2019.
- 8 FRIEDRICH, M. POHIN, M. POWIRE, F. Cytokine networks in the pathophysiology.
9 *Immunity*: v.50, n.4.p.992–1006; 2019.
- 10 FROÉS, R.S.B. Tratamento convencional na doença inflamatória intestinal. **Revista**
11 **do Hospital Universitário Pedro Ernesto**. UFRJ, 2012.
- 12 GASPARINI, R. G.; SASSAKI, L.Y.; SAAD-HOSSNE, R. Inflammatory bowel disease
13 epidemiology in São Paulo State, Brazil. **Clinical and Experimental**
14 **Gastroenterology**, v. 11, p. 423-429, 2018.
- 15
16 GIUFFRIDA, P, et. al. Controlling gut inflammation by restoring anti-inflammatory
17 pathways in inflammatory bowel disease. *Cells*: v.8, n.397, p.1-14, 2019.
- 18
19 GLASSNER, K.L.; ABRAHAM, B.P.; QUIGLEY, E.M. The microbiome and
20 inflammatory bowel disease. *Allergy Clin. Immunol.*; 2020.
- 21
22 GOMOLLÓN, F. et. al. 3rd european evidence-based consensus on the diagnosis
23 and management of crohn's disease 2016: part 1: diagnosis and medical
24 management. **Journal of Crohn's and Colitis**: p. 3–25, 2017.
- 25
26 GRAINGER DJ et al. Genetic control of the circulating concentration of transforming
27 growth factor type beta1. *Hum Mol Genet*. V.8, p.93–97, 1999.
- 28
29 GUAN, Q. A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory
30 bowel disease. **Journal of Immunology Research**: p.1-16; 2019.
- 31
32 Guo W, Dong Z, Guo Y, et al. Polymorphisms of transforming growth factor-₁
33 associated with increased risk of gastric cardia adenocarcinoma in north China.
34 **PLoS One**: v.9; 2014.
- 35
36 IHARA, S.; HIRATA, Y; KOIKE, K. TGF-B in inflammatory bowel disease: a key
37 regulator of immune cells, epithelium, and the intestinal microbiota. **J.**
38 **Gastroenterology**: v. 52, p.777–787, 2017.
- 39 JOSTINS et al. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of
40 inflammatory bowel disease. **Nature**: 1;491(7422): 119–124, 2012.
- 41 KOELINK, P.J., et. al. Anti-TNF therapy in IBD exerts its therapeutic effect through
42 macrophage IL-10 signalling. *Gut*: v.0, p.1–11; 2019.

- 1 KOROLKOVA, O. Y., et al. Characterization of serum cytokine profile in
2 predominantly colonic inflammatory bowel disease to delineate ulcerative and crohn's
3 colitides. *Clinical medicine insights: Gastroenterology*: V.82, p. 29–44, 2015.
- 4 LEES, C.W. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut*: p.1-15,
5 2011.
- 6 LEWIS, J.D, et. al. Use of the noninvasive components of the Mayo score to assess
7 clinical response in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis.*: v.14, n.12, p.1660-1666,
8 2008.
9
- 10 LIN, Z. et. al. Genetic association and epistatic interaction of the interleukin-10
11 signaling pathway in pediatric inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*:
12 v.23, n.27, p.4897-4909, 2017.
- 13 MAGRO F. et al. Third european evidence-based consensus on diagnosis and
14 management of ulcerative colitis. Part 1: definitions, diagnosis, extra-intestinal
15 manifestations, pregnancy, cancer surveillance, surgery, and ileo-anal pouch
16 disorders. *Journal of Crohn's and Colitis*: v. 11, n. 7, p. 649-670, 2017.
17
- 18 MARTEAU P. Evaluation of disease extent with the Crohn's disease endoscopic
19 index of severity, *Gut.*, v.62, n.12, p.1819-1820, 2013.
20
- 21 MOHAMMADI, et. al. Differential expression of micromas in peripheral blood
22 mononuclear cells identifies autophagy and TGF-beta-related signatures aberrantly
23 expressed in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*: p.568–
24 581, 2018.
- 25 MIJAC, D. et. al. The polymorphism rs3024505 (C/T) downstream of the *il10*
26 Gene is associated with crohn's disease in serbian patients with
27 Inflammatory bowel disease. *Tohoku J. Exp. Med.*, v. 240, p.15-24, 2016.
- 28 MOWAT C., COLE A., WINDSOR A., et al. Guidelines for the management of
29 inflammatory bowel disease in adults. *Gut*: v.60; p.571-607, 2011.
30
- 31 MURO, M.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, R.; MROWIEC, A. Immunogenetic biomarkers in
32 inflammatory bowel diseases: role of the IBD3 region. *World Journal of*
33 *Gastroenterology*: v.20; n.41; p. 15037-15048, 2014.
- 34 NEURATH, M. F. Cytokines in inflammatory bowel disease. *Nature Reviews*: v. 14,
35 p.329-342; 2014.
- 36 NUIJ, V.J.A.A., et. al. Genetic polymorphism in ATG16L1 gene is associated with
37 adalimumab use in inflammatory bowel disease. *Journal of Translational Medicine*:
38 15:248, 2017.
- 39 PERSAUD, A., et. al. A comparison of diverticulitis in Crohn's disease versus
40 ulcerative colitis. *Journal of gastroenterology and hepatology*: v.3; p. 508–512,
41 2019.

- 1 SEHGAL R., KOLTUN W. A. Scoring systems in inflammatory bowel disease. **Expert**
2 **Rev. Gastroenterol. Hepatol.**, v.4(4), p. 513–521,2010.
- 3 SELVARATNAM, S. et. al. Epidemiology of inflammatory bowel disease in South
4 America: a systematic review. **World Journal of Gastroenterology**: v.21; n.25(47);
5 p. 6866-6875, 2019.
- 6 SPEKHORST, L.M., et. al. Prevalence of- and risk factors for work disability in dutch
7 patients with inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**: 14;
8 23(46): 8182-8192, 2017.
- 9 TALHA,A.M. Inflammatory bowel disease- historical perspective, epidemiology, and
10 risk factors. **Surgical Clinics of North America**: v.95, p. 1105-1122, 2015.
- 11 TRAVIS, S. P.; JEWEL, D. P. Ulcerative colitis clinical presentation and diagnosis. In:
12 SATSANGI, J.; SUTHERLAND, L.R. **Inflammatory Bowel Diseases**: London:
13 Churchill Livingstone, p.169-81, 2003.
- 14
15 VEENBERGEN, S. IL-10 signaling in dendritic cells controls IL-1 β -mediated IFN γ
16 secretion by human CD4+ T cells: relevance to inflammatory bowel disease.
17 **Mucosal immunology**: 2019.
- 18 VRABLICOVA, Z. et. al. Impact of smoking cigarette on the mrna expression of
19 cytokines in mucosa of inflammatory bowel disease. **Physiol. Res.**: v. 68, n.2, p.183-
20 S192, 2019.
- 21 WALLACE, K.L., et. al. Immunopathology of inflammatory bowel disease. **World**
22 **Journal of Gastroenterology**: v.20, n.1, p.6-21, 2014.
- 23 XIE, T., et. al. Ulcerative colitis endoscopic index of severity (UCEIS) versus mayo
24 endoscopic score (MES) in guiding the need for colectomy in patients with acute
25 severe colitis. **Gastroenterology Report**: v.6, n.1, p.38–44, 2018.
- 26 ZHU, H. et. al. Interleukin-10 -1082A/G polymorphism and inflammatory bowel
27 disease susceptibility: a meta-analysis based on 17,585 subjects. **Cytokine**: v.61, p.
28 146-153, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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.

*Termo de Consentimento Livre Esclarecido apresentado, atendendo, conforme normas da Resolução 466/2012 de 12 de dezembro de 2012.

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

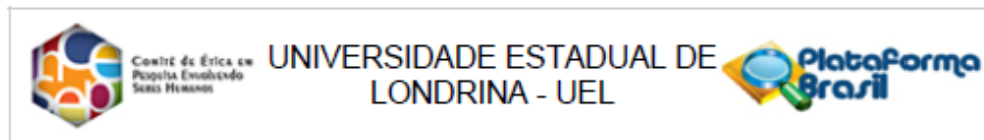
<p>_____ tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.</p> <p>Assinatura : _____</p> <p>Data: _____</p>

*Termo de Consentimento Livre Esclarecido apresentado, atendendo, conforme normas da Resolução 466/2012 de 12 de dezembro de 2012.

Rutgeers: CDEIS:
Outras doenças:

ANEXOS

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



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: 01833018.2.0000.5231

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



Centro de Ética em
Populações Evoluídas
Serres Humanas

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 2.767.257

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar o polimorfismo genético (PCR, TNF-, CCR5, FOXP3); o perfil de citocinas, e o estado redox em pacientes com DII e verificar se estes fatores estão associados com a atividade da doença.

Objetivo Secundário:

- Determinar a frequência dos polimorfismos da PCR em pacientes com DII e indivíduos controles;
- Avaliar a associação entre os polimorfismos da PCR e as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com DII;
- Determinar a frequência do polimorfismo do gene do TNF em pacientes com DII e indivíduos controles;
- Avaliar a associação entre o polimorfismo do gene do TNF e as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com DII;
- Determinar a frequência do polimorfismo genético CCR532 em pacientes com DII e indivíduos controles;
- Avaliar a associação entre o polimorfismo genético CCR532 e as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com DII;
- Determinar a frequência dos polimorfismos da FOXP3 em pacientes com DII e indivíduos controles;
- Avaliar a associação entre os polimorfismos da FOXP3 e as características clínicas e laboratoriais dos pacientes com DII;
- Comparar os níveis plasmáticos dos marcadores de EO em indivíduos controles (saudáveis) e pacientes com DII;
- Verificar se há associação entre os marcadores de EO e a atividade da doença; - Estabelecer o perfil de resposta imunológica em indivíduos controles (saudáveis) e em pacientes com DII;
- Verificar se há associação entre os níveis de citocinas e a atividade da doença;
- Propor preditores genéticos, imunológicos e de estresse oxidativos para diagnóstico, atividade e progressão da doença.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora 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. Os benefícios do estudo será a contribuição para o

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

CEP: 86.057-970

E-mail: cep268@uel.br



Conselho de Ética em
Pesquisa Envolvendo
Serres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 2.767.257

conhecimento das frequências de vários polimorfismos genéticos em pacientes brasileiros com DII e o seu possível envolvimento com a susceptibilidade a RCU e DC. Espera-se com este estudo contribuir para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no desenvolvimento e atividade da doença, assim como propor preditores de diagnóstico, atividade e progressão da doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora apresentou folha de rosta assinada pela vice chefe do Departamento de Análises Clínicas e autorização da Instituição coparticipante. O TCLE foi apresentado em forma de convite e está adequado, o orçamento é de R\$ 26.000,00 referente aos kits de reagentes químicos e a pesquisadora esclarece que os mesmos foram adquiridos com verbas de projetos anteriores e que todos os outros custos referentes ao projeto de pesquisa serão de responsabilidade dos pesquisadores envolvidos. O cronograma prevê o início da pesquisa em agosto/2018. Os riscos foram previstos e constam no TCLE e nas informações básicas do Projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências ou inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1130772.pdf	18/06/2018 21:18:20		Aceito
Outros	material_biologico.pdf	18/06/2018 21:09:08	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Outros	confidenciabilidade_sigilo.pdf	18/06/2018 21:08:42	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termo_sigilocoletadados.pdf	18/06/2018 21:07:50	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Declaração de Instituição e	ParecerHU.pdf	18/06/2018 21:07:29	Andréa Name Colado Simão	Aceito

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

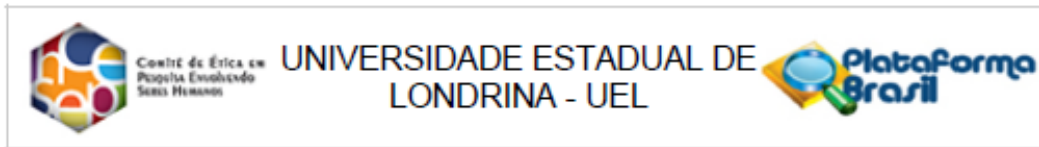
CEP: 86.057-970

UF: PR

Município: LONDRINA

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Continuação do Parecer: 2.767.257

Infraestrutura	ParecerHU.pdf	18/06/2018 21:07:29	Andréa Name Colado Simão	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	18/06/2018 21:07:11	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoDII.docx	18/06/2018 21:07:00	Andréa Name Colado Simão	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto.pdf	18/06/2018 21:05:39	Andréa Name Colado Simão	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

LONDRINA, 11 de Julho de 2018

Assinado por:
Adriana Lourenço Soares
(Coordenador)

Endereço: LABESC - Sala 14
 Bairro: Campus Universitário CEP: 86.057-970
 UF: PR Município: LONDRINA
 Telefone: (43)3371-5455 E-mail: cep268@uel.br