

FABRICIO ANDRADE MARTINS ESTEVES

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO NOS GENES DA INTERLEUCINA-10,
INTERLEUCINA-6 E FATOR DE NECROSE TUMORAL-alfa COM A
PATOGENESE DA DOENÇA CELÍACA**

Recife
2015

FABRICIO ANDRADE MARTINS ESTEVES

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO NOS GENES DA INTERLEUCINA-10,
INTERLEUCINA-6 E FATOR DE NECROSE TUMORAL-alfa COM A
PATOGENESE DA DOENÇA CELÍACA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Sergio Crovella

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza

Recife
2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Esteves, Fabrício Andrade Martins

Associação de polimorfismo nos genes da interleucina-10, interleucina-6 e fator de necrose tumoral-alfa com a patogênese da doença celíaca / Fabrício Andrade Martins Esteves- Recife: O Autor, 2015.

95 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Sérgio Crovella

Coorientador: Paulo Roberto Eleutério de Souza

Tese (doutorado) ã Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2015.

Inclui referências, apêndices e anexos

- 1. Doença celíaca 2. Polimorfismo (Genética) 3. Fator de necrose de tumor I. Crovella, Sérgio (orientador) II. Souza, Paulo Roberto Eleutério de (coorientador) III. Título**

616.399

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-204

FABRICIO ANDRADE MARTINS ESTEVES

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO NOS GENES DA INTERLEUCINA-10,
INTERLEUCINA-6 E FATOR DE NECROSE TUMORAL-alfa COM A
PATOGENESE DA DOENÇA CELÍACA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 09/02/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sergio Crovella (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. José Luíz de Lima Filho (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Paula Sandrin Garcia (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Maria de Mascena Diniz Maia (Examinadora Externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

A Nayale Lucinda Andrade Albuquerque e Davi Andrade Albuquerque, por me proporcionarem diariamente novas e estimulantes razões para retribuir-lhes o Amor que flui em nosso lar.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus manifesto minha eterna gratidão por ter me concedido forças, saúde e temperança essenciais para que eu conseguisse chegar a este momento de conclusão. Que a obtenção deste título seja uma forma de capacitar-me para corresponder melhor ao que Dele gratuitamente recebo!

Muito mais do que com palavras agradecerei com atitudes diárias de Amor ainda mais intensas à minha esposa Nayale Lucinda Andrade Albuquerque que sempre esteve e está a meu lado, cumprindo um inestimável e, por vezes silencioso, apoio e incentivo para juntos buscarmos nossos sonhos e nos capacitarmos para melhor servir a quem a nós recorre.

A meu filho Davi Andrade Albuquerque agradeço porque seu olhar sempre foi um propulsor nos momentos de fadiga que enfrentei! Seu sorriso extrai de mim o melhor que posso ser! Mesmo quando as forças pareciam se esgotar, receber seu sorriso diário faziam com que eu esquecesse de mim e me fizeram perceber que sempre posso ir mais além!

Agradeço a meus pais Ricardo Belo Esteves e Maria Regina Martins de Andrade por terem me concedido o dom da vida.

Registro com gratidão o privilégio de ter trabalhado e aprendido com o Prof. Sergio Crovella e o Prof. Paulo Roberto Eleutério! Nesse momento sinceramente lhes agradeço por terem me feito perceber que ciência e humanismo, quando caminham juntos, transformam a atividade docente em elemento de incentivo ao crescimento pessoal! Estenderam-me a mão em todos os momentos que a eles recorri e não permitiram que eu desanimasse frente os obstáculos que enfrentei ao longo desse período.

Agradeço sinceramente a todos os que integram o grupo liderado por Sergio Crovella: Lucas Brandão, Rafael Guimarães, Nathalia Alencar, Jaqueline Silva, Antonio Campos, Anselmo Jiro, Ronald Moura, Ronaldo Celerino e Paula Sandrin, o que levo da convivência com vocês é algo que não posso expressar com palavras! Talvez não seja suficiente dizer-lhes que a competência de vocês e o aprendizado que me proporcionaram me fizeram uma pessoa melhor! Gratidão a vocês fará parte de minha história de vida!

Ao Prof. Luiz Carvalho pelo exemplo que precede a prática docente: o senhor continua sendo uma inspiração no âmbito científico mas, sobretudo, na arte de tratar

as pessoas focando suas potencialidades individuais! Sempre lhe serei grato por ter aprendido que os livros ensinam, mas o exemplo convence!

Ao corpo Diretor da Faculdade ASCES (Prof. Paulo Muniz, Profa. Marileide Rosa e Sr. Sidrônio Lima) dirijo meus sinceros agradecimentos por proporcionarem todas as condições institucionais que permitiram a minha melhoria profissional e, sobretudo humana! Exercer a atividade docente na Faculdade ASCES é algo que proporciona um raro nível de satisfação pessoal e profissional, pois neste âmbito acadêmico, pautado pelos vossos direcionamentos, me estimulo a lutar por uma Academia que tem seu exercício comprometido com a melhoria da qualidade de vida das pessoas que em nós confiam!

Meus sinceros agradecimentos dirijo também aos parceiros de trabalho João Raphael, Rodrigo Lucas e João Paulo pelas inúmeras vezes que pude contar com o apoio, confiança e compreensão de vocês!

À agora mestre Rebeka Maranhão: obrigado pela parceria e pelos artigos construídos!

Trabalharmos juntos foi enriquecedor!

A Eliete Rodrigues, que sempre nos ajudou com sua típica paciência e efetividade nas ações, lhe sou muito grato por tudo!

Muito grato também a Celestina Ulisses pelo apoio diário no cuidado com minha família!

RESUMO

A Doença Celíaca (DC) trata-se de uma enteropatia imuno-mediada causada pela intolerância ao glúten. Através da ativação de linfócitos T presentes na lâmina própria da mucosa intestinal em indivíduos geneticamente susceptíveis, são desencadeados mecanismos inflamatórios regulados pelo balanço entre citocinas de perfil Th1, como o interferon gama (IFN γ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 15 (IL-15) e interleucina-18 (IL-18) e outras reguladoras tais como TGF β e interleucina-10 (IL-10). Em consequência ao mecanismo inflamatório desencadeado, a doença celíaca cursa com mal-absorção e diarreia secundária à diminuição da superfície de absorção da mucosa do intestino delgado. Uma vez que o grau e o tipo de alterações que sofre a mucosa intestinal depende do padrão de citocinas e de suas concentrações locais, o presente estudo avaliou a possível relação entre os polimorfismos nas regiões promotoras dos genes das IL-10, IL-6 e TNF- α na imunopatogênese da Doença celíaca em uma população de pacientes italianos. Participaram do estudo 204 indivíduos italianos portadores de doença celíaca (subdivididos em 96 indivíduos HLA-DQ2+ e 96 indivíduos HLA-DQ8+) e 96 indivíduos saudáveis (grupo controle). Foram realizadas genotipagens para as regiões promotoras dos genes da IL-10 (posições -1082G>A, -819C>T e -592C>A), IL-6 (posição -174G>C) e TNF- α (posição -308G>A). Foram estabelecidas as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos grupos. Com intervalo de confiança de 95%, após a aplicação do teste de Qui-Quadrado, diferenças de frequências que apresentaram valores de $p < 5\%$ foram consideradas estatisticamente significativas para estabelecimento da Odds Ratio (O.R.). Diferenças significativas foram observadas para o polimorfismo do TNF- α (-308 G>A) quando foram comparados os seguintes grupos celíacos DQ2-positive com controles (OR = 0.45, $p = 0.0002$), celíacos DQ8-positivos com controles (OR = 3.55, $p < 0.0001$) e celíacos DQ2-positivos com celíacos DQ8-positive (OR = 0.12, $p < 0.0001$). Não foram observadas diferenças de frequências estatisticamente significativas para o polimorfismo da IL-6 (-174 G>C) entre celíacos e indivíduos saudáveis ($p > 0.05$). Também não foram observadas diferenças significativas entre as frequências dos polimorfismos da região promotora do gene da IL-10 (posições -1082G>A, -819C>T e -592C>A). A análise de haplótipos da região promotora do gene desta citocina demonstrou que, na população estudada, não houve associação

que pudesse sugerir uma participação imunomoduladora da IL-10 na Doença celíaca. Contudo, por ter um caráter anti-inflamatório, a IL-10 poderia eventualmente desempenhar algum papel no tipo de forma clínica da Doença celíaca. Ou seja, indivíduos com haplótipos de baixa produção de IL-10 estariam mais susceptíveis a apresentar as formas mais graves dessa enteropatia imunomediada. Sugerimos que o polimorfismo da região promotora do gene do TNF-alfa (posição -308G>A) possa estar envolvido na imunopatogênese do mecanismo inflamatório desencadeado pela exposição alimentar ao glúten em portadores da Doença celíaca.

Palavras-chave: Doença celíaca. Interleucina-10. Interleucina-6. Fator de Necrose Tumoral. Polimorfismos.

ABSTRACT

Celiac disease (CD) it is an immune-mediated enteropathy caused by intolerance to gluten, a family of proteins in wheat and various grains. Through the activation of T lymphocytes present in the lamina propria of the gut mucosa in genetically susceptible individuals are triggered inflammatory mechanisms regulated by the balance between Th1 cytokines such as interferon gamma (IFN γ), Tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) interleukin 15 (IL-15) and interleukin-18 (IL-18) and other regulatory and TGF β such as interleukin-10 (IL-10). As a result of the inflammatory mechanism triggered, celiac disease progresses with malabsorption and diarrhea secondary to decreased mucosal absorptive surface of the small intestine. Since the degree and type of changes that suffers the intestinal mucosa depends on the pattern of cytokines and their local concentrations, the present study evaluated the possible relationship between polymorphisms in the promoter regions of the genes of interleukins IL-10, IL -6 and TNF- α in the immunopathogenesis of celiac disease in a population of Italian patients. Methods: A total of 204 individuals Italian patients with celiac disease (subdivided into 96 HLA-DQ2 + individuals and 96 individuals HLA-DQ8 +) and 96 healthy subjects (control group). Genotyping was performed in the promoter regions of the genes of IL-10 (positions -1082G> A, -819C> T and -592C> A), IL-6 (-174G position> C) and TNF-alpha (position -308G> A). The frequencies were established allelic, genotypic and haplotype of the above groups. With 95% confidence interval, after applying the chi-square test, differences in frequencies with values of $p < 5\%$ were considered statistically significant for establishment of Odds Ratio (OR). Significant differences were observed for the polymorphism of TNF- α (-308 G> A) when the celiac groups DQ2-positive with controls were compared (OR = 0.45, $p = 0.0002$), DQ8- positive celiac with controls (OR = 3.55, $p < 0.0001$) and celiac DQ2-positive with celiac DQ8-positive (OR = 0.12, $p < 0.0001$). Statistically significant differences in frequencies were observed for IL-6 polymorphism (-174 G> C) from celiac and healthy individuals ($p > 0.05$). Also there was no difference between the frequencies of polymorphisms of the promoter region of the IL-10 gene (positions -1082G> A, -819C> T and -592C> A). The haplotype analysis of the promoter region of the gene of this cytokine showed that in the population studied, there was no association that would suggest an immunomodulatory participation of IL-10 in celiac disease. However, being an anti-

inflammatory protein, IL-10 could eventually play a role in the type of clinical presentation of celiac disease. Thus, patients with IL-10 low production haplotypes could present more likely the severe forms of this immune-mediated enteropathy. We suggest that the polymorphism of TNF-alpha promoter region of the gene (position - 308 G>A) may be involved in the immunopathogenesis of inflammatory mechanism triggered by dietary exposure to gluten in patients with celiac disease.

Keywords: Coeliac disease. Interleukin-10. Interleukin-6. Tumor Necrosis Factor. Polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 ñ	Região HLA do cromossomo 6	21
Figura 2 ñ	Depleção da mucosa intestinal demonstrando a participação de relevantes fatores envolvidos no desenvolvimento da DC em indivíduos HLA-DQ2/DQ8 positivos ã ã ã ã ã ã ã ã ã ã	23
Figura 3 ñ	Perfis histopatológicos da mucosa intestinal de portadores da Doença celíaca: Estágio Marsh 1: caracterizado por intensa linfocitose intraepitelial da lâmina própria; Marsh 2: caracterizado pela hiperplasia de criptas vilositárias; Marsh 3: presença de atrofia vilosotária total ã ã ã	25
Figura 4 ñ	Estágios MarshI IIIa (atrofia vilositária parcial), Marsh IIIb (atrofia vilositária sub-total) e Marsh IIIc (atrofia vilositária total)	25
Figura 5 ñ	O "Iceberg Celíaco" - Formas clínicas da Doença Celíaca	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Prevalência de Doença celíaca não-diagnosticada em estudos populacionais	20
Artigo 1		
Tabela 1	Frequency analysis of polymorphisms in IL-10 gene promoter region (-1082A>G, -819C>T, -592C>A) between italians celiacs (CD), categorized also by HLA: DQ2+ or DQ8+, and a healthy italian group	48
Tabela 2	Haplotype frequencies of the IL-10 gene promoter region (-1082A>G, -819C>T, -592C>A) in Italian celiacs (categorized also by HLA genotype: DQ2+ or DQ8+) and healthy italian group	49
Tabela 3	Association results of haplotypic frequencies in IL-10 gene promoter region (-1082G>A, -819C>T, -592C>A) between italians celiacs (categorized also by HLA genotype: DQ2+ or DQ8+) and healthy italian group	49
Artigo 2		
Tabela 1	Genotypic and allelic frequency of the TNF- α promoter polymorphism (-308) in patients with celiac disease (CD) (DQ2 and DQ8 groups) and healthy controls, and chi-square test (P) statistics for genotypic and allelic frequency	64
Tabela 2	Genotypic and allelic frequency of the IL-6 promoter polymorphism (-174) in patients with celiac disease (CD) (DQ2 and DQ8 groups) and healthy controls, and chi-square test (P) statistics for genotypic and allelic frequency	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CASP8	Caspase-8
CRP	C-Reactive Protein (Proteína C Reativa) DC: Doença Celíaca
DMID	Diabetes Mellitus Dependente de Insulina DMO: Densidade mineral óssea
HIV	Human Immunodeficiency Vírus (Vírus da imunodeficiência humana) HLA: Human Leukocyte Antigen (antígeno leucocitário humano)
IDDM	Insulin dependent diabetes mellitus IECs: células epiteliais intestinais
IFN γ	Interferon gama
IgA anti-tTG	IgA anti-transglutaminase tecidual IgA EMA: IgA anti-endomísio
IGF1	Fator de Crescimento "insuline-like-1"
IGFBP	Fatores de Crescimento "Insuline-like" ligados à proteína IL-10: Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-15	Interleucina 15
IL-18	Interleucina 18
IL-6	Interleucina 6
IL-6R	receptores de IL-6
KGF	Fator de Crescimento de Queratinócitos LES: Lúpus eritematoso sistêmico
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Major Histocompatibility Complex (complexo principal de histocompatibilidade)
PCR	Polymerase chain reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SJRA	Artrite Reumatóide Juvenil Sistêmica
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms (Polimorfismos de base única) TGF α : Fator Transformador de crescimento alfa
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa tTG: Transglutaminase tecidual
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

WGOPG World Gastroenterology Organisation Practice Guidelines
(Organização Mundial de Gastroenterologia)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO DE LITERATURA	19
3.1	EPIDEMIOLOGIA E PREVALÊNCIA DA DOENÇA CELÍACA	19
3.2	IMUNOPATOGENESE DA DOENÇA CELÍACA	20
3.3	DIAGNÓSTICO DA DOENÇA CELÍACA	26
3.3.1	Função da endoscopia em pacientes com suspeita de doença celíaca	26
3.3.2	Biópsia intestinal	26
3.3.3	Marcadores sorológicos usados para o diagnóstico da DC	27
3.4	ASPECTOS CLÍNICOS E COMORBIDADES	27
3.5	O GENE DA INTERLEUCINA-6 (IL-6)	30
3.6	O GENE DO FATOR DE NECROSE TUMORAL - ALFA	33
3.7	O GENE DA INTERLEUCINA - 10	34
4	HIPÓTESE DO ESTUDO	38
5	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	39
6	ASPECTOS ÉTICOS	40
7	RESULTADOS	41
7.1	ARTIGO 1 ñ Evaluation of polymorphisms in the IL10 gene promoter region in an Italian celiac population	41
7.2	ARTIGO 2 ñ Association of HLA-DQ8/DQ2 and polymorphisms in the cytokines genes TNF- α and IL-6, in susceptibility to celiac disease in Italian patients	58
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
	REFERÊNCIAS	74
	APÊNDICE A ñ Digestão enzimática da IL-6 (-174 G/C) em gel de agarose a 3%	82
	APÊNDICE B ñ Digestão enzimática da TNF- α (-308 G/A) em gel de	

agarose a 3% 83	83
ANEXO A – Instruções para submissão de artigo – Genetic and Molecular Research – Qualis B2 – Ciências Biológicas I (Capes, 2013) 84	84
ANEXO B – Declaração de Anuência 94	94
ANEXO C – Aprovação do Comitê de Ética 95	95

1 INTRODUÇÃO

A Doença Celíaca (DC) é uma enteropatia imuno-mediada causada pela intolerância ao glúten, uma proteína presente no trigo e vários tipos de cereais (TRONCONE et al., 2004). Através da ativação de linfócitos T presentes na lâmina própria da mucosa intestinal em indivíduos geneticamente susceptíveis, são desencadeados mecanismos inflamatórios regulados pelo balanço entre citocinas de perfil Th1, como o interferon gama (IFN γ), o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), a interleucina 6 (IL-6) a interleucina 15 (IL-15) e interleucina-18 (IL-18) e outras reguladoras como TGF β e interleucina-10 (IL-10). Em consequência ao mecanismo inflamatório desencadeado, a doença celíaca cursa com mal-absorção e diarreia secundária à diminuição da superfície de absorção da mucosa do intestino delgado (SALVATI et al., 2001).

Uma vez que o grau e o tipo de alterações que sofre a mucosa intestinal depende do padrão de citocinas e de suas concentrações locais (MACDONALD; BAJAJ-ELLIOTT; PENDER, 1999), avaliou-se a presença de polimorfismos genéticos associados à expressão de mediadores inflamatórios conhecidamente envolvidos na imunopatogênese da DC tais como os genes da IL-6, IL-10 e TNF α .

Para tanto, foi realizada a genotipagem de DNA das regiões promotoras destas citocinas em pacientes italianos portadores de DC correlacionando estes achados com o genótipo de indivíduos de saudáveis.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os polimorfismos nas regiões promotoras dos genes das interleucinas IL-10, IL-6 e TNF- α na imunopatogênese da Doença celíaca em uma população de pacientes italianos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) genotipar a região promotora do gene da IL-10 (posições -1082 G/A, -819 C/T e - 592 C/A), TNF α (posição -308 G/A) e IL-6 (posição -174 G/C) em italianos portadores de DC (grupo caso) e em indivíduos italianos saudáveis (grupo controle);
- b) analisar as frequências alélicas, genotípicas e haplotípicas dos polimorfismos dos genes da IL-10 (posições -1082 G/A, -819 C/T e -592 C/A), TNF α (posição -308 G/A) e IL-6 (posição -174 G/C) em italianos celíacos e uma população italiana saudável e;
- c) correlacionar as frequências dos polimorfismos dos genes da IL-10 (posições -1082 G/A, -819 C/T e -592 C/A), TNF α (posição -308 G/A) e IL-6 (posição -174 G/C) com o perfil HLA (HLA-DQ2 positivos ou HLA-DQ8 positivos) dos italianos portadores de DC.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A Doença celíaca é uma enteropatia autoimune multifatorial, influenciada por fatores ambientais e imunogenéticos. A ingestão de glúten contido no trigo, centeio e cevada, desencadeia um processo inflamatório e um remodelamento da mucosa intestinal resultando em quadros de mal-nutrição e diversas complicações sistêmicas secundárias (FASANO et al., 2003). O processo inflamatório é mediado por uma resposta das células T contra novos epítomos gerados por uma desaminação da gliadina, dirigida pela transglutaminase. Mesmo sendo fortemente relacionada com fatores genéticos (altos valores de concordância entre gêmeos monozigóticos, em comparação aos dizigóticos), a principal associação genética é no complexo de histocompatibilidade principal (HLA classe II). Contudo, essa associação com o HLA não é suficiente para explicar o desenvolvimento da doença celíaca: de fato, nas famílias que apresentam casos dessa patologia, apenas alguns parentes com o mesmo HLA dos pais apresentam doença celíaca (DE LA CONCHA, 2007).

3.1 EPIDEMIOLOGIA E PREVALÊNCIA DA DOENÇA CELÍACA

A DC já foi avaliada em diversas populações ao redor do mundo. Apresenta altas taxas de soroprevalência em várias populações tendo um padrão de frequência bastante semelhante em populações norte-americanas e europeias fazendo com que a doença celíaca seja considerada uma das doenças autoimunes mais comuns (ACCOMANDO; CATALDO, 2004; CATASSI et al., 1996; JOHNSTON et al., 1998; MAKI et al., 2003; NOT et al., 1998), relata uma prevalência estimada de 1 caso para cada 99 crianças finlandesas. Oliveira et al. (2007), em estudo realizado na cidade de São Paulo, avaliou um grupo de 3.000 potenciais doadores de sangue tendo encontrado uma prevalência de 1:214 (0.47%). Resultados expressivos foram obtidos também por Gomez et al. (2001), na Argentina. Estudando 2000 casais submetidos a exames pré-nupciais obrigatórios, estes autores encontraram uma prevalência de 1:167 (0.59%). Com prevalência próxima de 1%, a doença celíaca é considerada a desordem alimentar mais comum em populações ocidentais (DUBE et al., 2005).

Levantamentos epidemiológicos têm demonstrado que a prevalência estimada da DC é de aproximadamente 0.5-1.0%. Estes dados fazem com que a DC seja a morbidade autoimune mais prevalente na infância, em várias regiões do mundo. Contudo, sendo a forma clássica da doença a menos frequente, muitos casos não são diagnosticados (BAPTISTA, 2006) como foi evidenciado por vários estudos (ANTUNES, 2002; CARLSSON et al., 2001; CATASSI et al., 1996, 1999; FASANO et al., 2003; KORPONAY-SZABO et al., 1999; MAKI et al. 2003; PATRESI et al., 2003; SHAMIR et al., 2002) (Tabela 1).

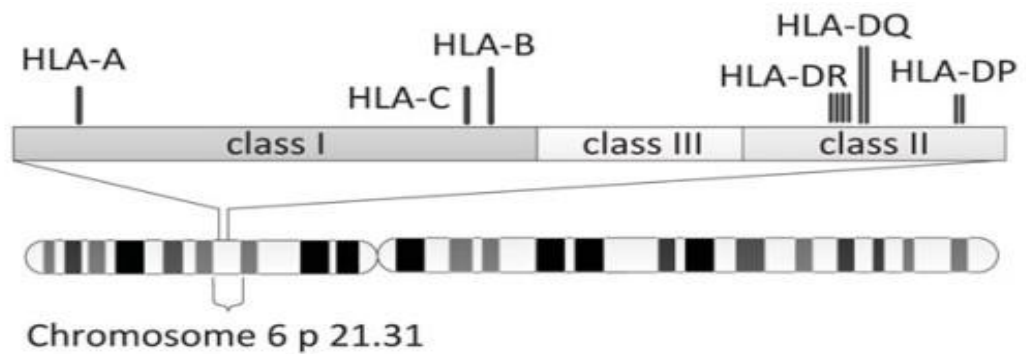
Tabela 1 Prevalência da Doença celíaca não-diagnosticada em estudos populacionais

País	Número de Casos	Faixa Etária	Prevalência
Itália	17.201	crianças	1/120
Hungria	427	crianças	1/85
Suécia	690	crianças	1/77
Finlândia	3.654	crianças	1/99
Saara	989	crianças	1/18
Portugal	536	adolescentes	1/134
Israel	1.571	adultos e crianças	1/157
EUA	4.126	adultos e crianças	1/133
Brasil	2.371	adultos e crianças	1/474 a 1/169

Fonte: Baptista (2006)

3.2 IMUNOPATOGENESE DA DOENÇA CELÍACA

O principal fator de susceptibilidade à Doença Celíaca (DC) é notadamente a expressão de alelos específicos HLA-DQ presentes no cromossomo 6p21.3 (Figura 1). Esta região do MHC classe II e tem sido designada para o estudo da heterogeneidade genética da DC (SOLLID, 2002).

Figura 1 ã Região HLA do cromossomo 6

Fonte: Brophy et al. (2010)

Infecções, estresse químicos e mecânicos podem comprometer a integridade da mucosa intestinal (SEVERANCE; YOLKEN; EATON, 2014).

Porções do glúten que são resistentes à ação enzimática da escova permanecem íntegras no processo digestivo e podem ser transportados através da barreira epitelial sob a forma de peptídeos (DUBE et al., 2005).

A transglutaminase tecidual (tTG) da lâmina própria da mucosa intestinal é ativada e promove adesaminação de peptídeos do glúten, gerando gliadinas. A desaminação consiste em substituição de aminoácidos do polipeptídeo por outros com carga negativa (SOLLID, 2002). Esta enzima, além de apresentar uma função essencial para promover o processamento do gluten no intestino, também é o principal autoantígeno alvo dos anticorpos específicos nesta desordem autoimune (DIETERICH et al., 1997; SCHUPPAN, 2000). A gliadina, por sua vez, pode formar complexo de ligação cruzada com a tTG. Sob a forma desaminada livre, ligada à transglutaminase e proteínas liberadas pelas junções intercelulares são apresentadas por células dendríticas assim como por células B carreadoras de moléculas HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8 para células T CD4+ presentes na lâmina própria da mucosa. Peptídeos desaminados do glúten associam-se fortemente moléculas HLA-DQ2 ou DQ8 expressas e induzem uma intensa resposta mediada por células T. Acredita-se que esta apresentação antigênica é aumentada em indivíduos com uma exposição tardia para antígenos bacterianos, cujas células dendríticas maduras produzem quantidades significativas de IL-12 (MOLBERG et al., 1998).

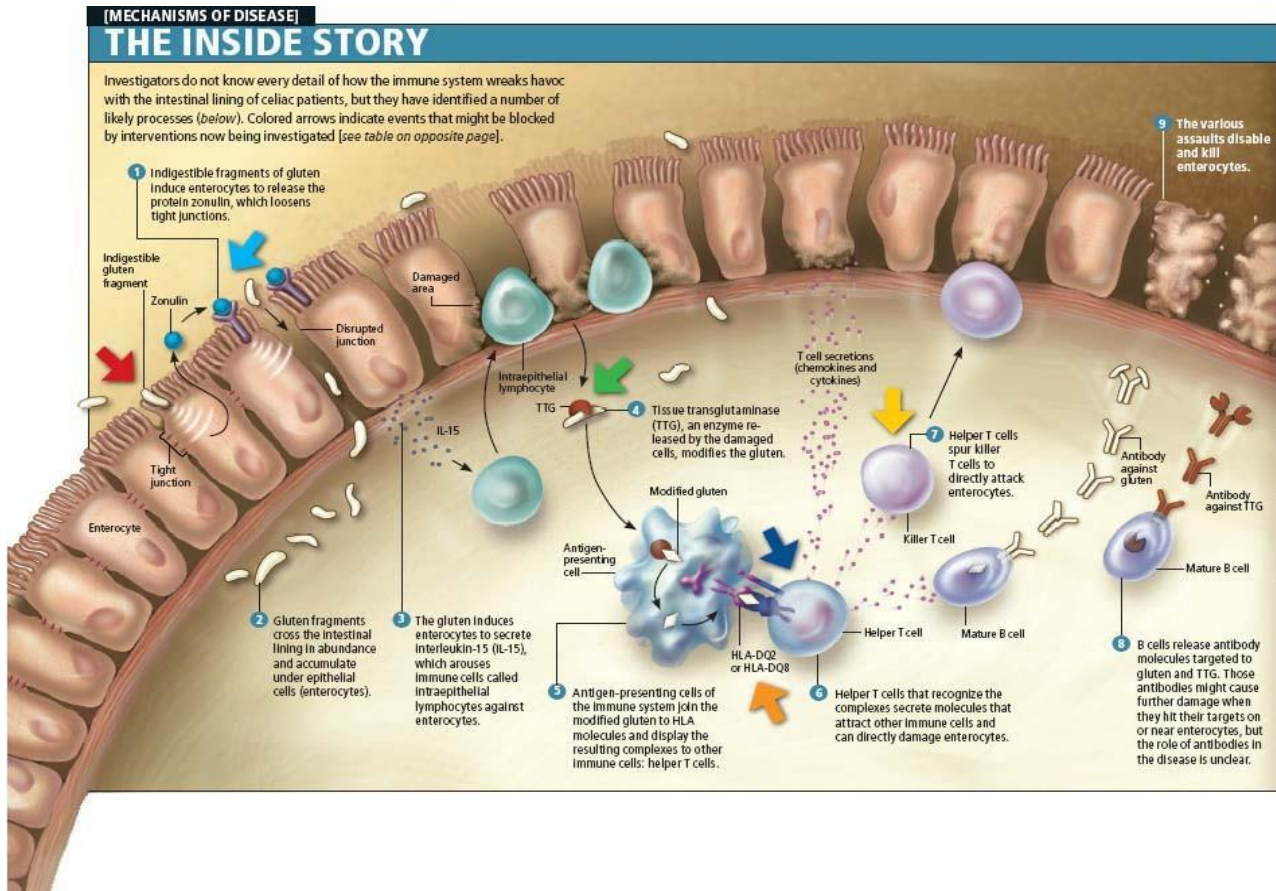
Este mecanismo de apresentação antigênica direciona a resposta das células CD4 + ou para reações de perfil Th1, com produção de citocinas inflamatórias, destruição das células da mucosa e auto-imunidade ou, para ativação de células B Th2 com produção de anticorpos contra o glúten desaminado, anti-transglutaminase, anti-complexo gliadina/tTG e outros antígenos teciduais. A tTG é o principal alvo dos auto-anticorpos direcionados contra o endomísio (DIETERICH et al., 1997).

Vader et al. (2003) afirmam que, embora a elevada afinidade existente entre moléculas HLA- DQ2 e peptídeos desaminados do glúten seja reconhecida como causa da DC, somente o HLA- DQ2.5, e não HLA-DQ2.2, promove predisposição à doença. Estes pesquisadores observaram uma alta densidade de peptídeos do glúten associados moléculas HLA-DQ2.5 enquanto que as moléculas HLA-DQ2.2 apresentaram um pequeno grau de peptídeos associados. Neste estudo, a apresentação de peptídeos do glúten foi superior em células apresentadoras de antígenos homozigóticas para HLA-DQ2 quando comparadas com células HLA-DQ2/não-DQ2. Células HLA-DQ2.5/DQ2.2 induziam níveis intermediários de proliferação e secreção de citocinas.

Os resultados obtidos por Arentz-Hansen et al. (2000) também relatam que moléculas HLA- DQ2 exercem um papel crucial na DC apresentando peptídeos desaminados do glúten a células CD4+ na lâmina própria da mucosa intestinal.

No que diz respeito às moléculas HLA-DQ8, Hovhannisyan et al. (2008) demonstraram que um polimorfismo na posição 57 (um resíduo de ácido aspártico ausente neste posição) promove um recrutamento de células T carreadoras de receptores conferindo carga negativa à região 3-beta complementar (CDR3-beta) durante a resposta a resposta contra peptídeos derivados do glúten apresentados no contexto de moléculas HLA-DQ8 e causando, dessa forma, a doença celíaca. Assim sendo, foi concluído que a ausência de carga negativa na posição beta-57 do MHC classe II atrai resíduos negativamente carregados em receptores de células T ou no peptídeo, combinação por meio da qual pode-se supor o papel desempenhado por moléculas HLA-DQ8 na amplificação da resposta mediada por células T contra o glúten proveniente da dieta.

Figura 2 ã Depleção da mucosa intestinal demonstrando a participação de relevantes fatores envolvidos no desenvolvimento da DC em indivíduos HLA-DQ2/DQ8 positivos



Fonte: Fasano (2009, p. 60)

Contudo, a associação com alelos DQ2 e/ou DQ8 não tem sido suficiente para explicar o largo espectro de características clínicas observadas na DC tais como o seu surgimento em diferentes faixas etárias, diferentes graus de lesão tecidual e a presença de desordens sistêmicas associadas (PETRONZELLI et al., 1997).

MacDonald, Bajaj-Elliott e Pender et al. (1999) evidenciam que o grau e o tipo de alteração sofrido pela mucosa intestinal dependem do padrão de citocinas e de suas concentrações locais.

O perfil de liberação de citocinas na mucosa intestinal de indivíduos portadores e doença celíaca tem sido elucidado. A ativação de linfócitos T reativos ao glúten que se depositam na lâmina própria promove a liberação de mediadores inflamatórios, tais como o IFN γ , o TNF α , a IL15, a IL18, entre outros que, por sua vez passam a apresentar uma baixa produção, como, por exemplo, a interleucina-10

(NILSEN et al., 1998; TRONCONE et al., 1999). Estes mediadores causam diversos efeitos sobre a mucosa tais como a infiltração linfocitária (tanto na lâmina própria como no epitélio) e o aumento da velocidade de degradação da matriz extracelular (DAUM et al., 1999; PENDER et al., 1997) e o aumento dos fatores de crescimento epiteliais, como o Fator Transformador de crescimento alfa (TGF α) e o Fator de Crescimento de Queratinócitos (KGF), que são os principais envolvidos no processo de hiperplasia das criptas vilositárias (SALVATI et al., 2001).

Uma vez que as concentrações locais de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias liberadas na lesão desencadeada pelo glúten, em indivíduos geneticamente susceptíveis, é variável e dependente de vários fatores tais como o fenótipo HLA e quantidade de glúten ingerido, a mucosa intestinal pode demonstrar diferentes graus de lesão tecidual, porém com características bem definidas. Assim sendo, a histologia permanece sendo o padrão-ouro no diagnóstico da DC. Estudos recentes tem sugerido, contudo que, o desenvolvimento de testes sorológicos tem facilitado este processo e a biópsia intestinal tem sido mais recomendada para a confirmação diagnóstica (WALKER; TALLEY, 2011).

Os diferentes perfis de lesão tecidual apresentados pelo mecanismo inflamatório intestinal desencadeado na DC são classificados de acordo com o que foi proposto por Marsh (1992).

Marsh I: mucosa intestinal com arquitetura normal na qual encontra-se evidente presença de infiltração linfocitária intensa, com uma linfocitose acima de 30 por enterócito.

Marsh II: é caracterizado por uma lesão hiperplásica evidenciada por criptas vilositárias largas na qual pode-se perceber a presença de células epiteliais imaturas sendo produzidas a altas taxas acompanhadas por um influx de células inflamatórias.

Marsh III: consiste em uma lesão destrutiva, com a mucosa plana tipicamente associada com DC. No entanto, Marsh III pode apresentar um espectro que vai desde discreta a atrofia vilositária grave. Assim sendo, Peña (2015) classificou a Marsh III em três subgrupos, como se segue: Marsh IIIa (atrofia vilositária parcial), onde as vilosidades apresentam-se encurtadas e estão associadas a uma ligeira infiltração de linfócitos em células epiteliais, acompanhado por criptas hiperplásicas e ampliadas; Marsh IIIb (atrofia vilositária sub-total), com vilosidades apresentando-se claramente atróficas, mas como tal, ainda reconhecíveis, associadas a criptas

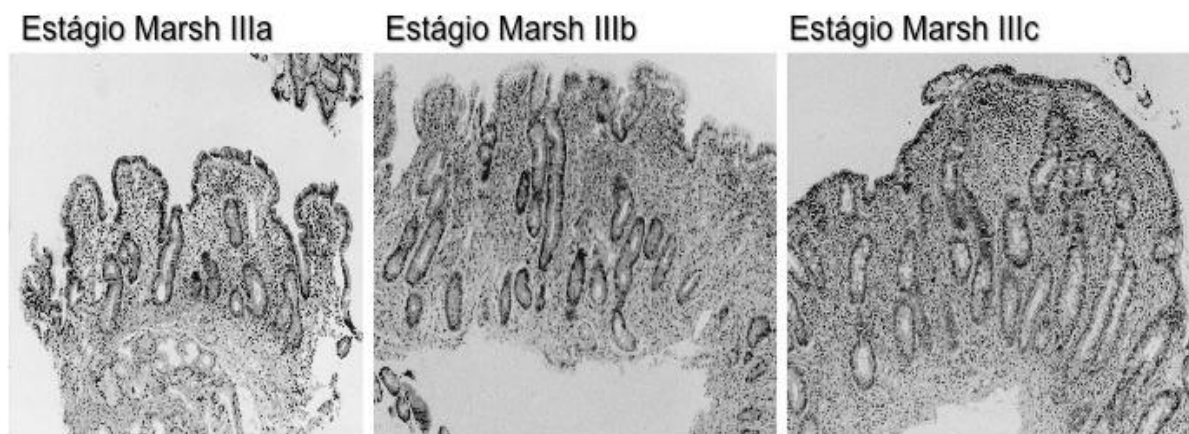
largas e cujas células epiteliais imaturas são geradas a uma taxa mais aumentada, acompanhada por um influxo de células inflamatórias e Marsh IIIc (atrofia vilositária total), com ausência quase total de vilosidades, atrofia severa, hiperplasia e lesão infiltrativa (Figura 4).

Figura 3 ñ Perfis histopatológicos da mucosa intestinal de portadores de doença celíaca: Estágio Marsh 1: caracterizado por intensa linfocitose intraepitelial da lâmina própria; Marsh 2: caracterizado pela hiperplasia de criptas vilositárias; Marsh 3: presença de atrofia vilositária total



Fonte: Freeman (2011, p. 2264)

Figura 4 ñ Estágios Marsh IIIa (atrofia vilositária parcial), Marsh IIIb (atrofia vilositária sub-total) e Marsh IIIc (atrofia vilositária total)



Fonte: Peña (2015)

3.3 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA CELÍACA

De acordo com as diretrizes estabelecidas pela World Gastroenterology Organisation Global Guidelines (2012), o diagnóstico da Doença celíaca deve ser respaldado por avaliação sorológica, clínica e histopatológica. Portanto, o diagnóstico definitivo tem sido estabelecido pela realização da endoscopia associada à biópsia intestinal e sorologia positiva. Esta abordagem tem sido considerada o padrão-ouro no diagnóstico diferencial.

3.3.1 Função da endoscopia em pacientes com suspeita de doença celíaca

Apesar da endoscopia poder indicar a necessidade de biópsia intestinal, este procedimento pode não ser suficientemente sensível para detectar todas as manifestações de DC. Os principais achados sugestivos da DC são:

- a) vilosidades hipermiadas, presença de fissuras e um padrão de mosaico;
- b) Vilosidades intestinais achatadas e;
- c) diminuição ou desaparecimento das vilosidades intestinais.

Diante dessas observações, faz-se necessária realização de biópsias e a endoscopia tem se mostrado o método mais conveniente para se obter a amostra da mucosa do intestino delgado. A biópsia de sucção (com uma cápsula de Crosby) fornece amostras de melhor qualidade (FREEMAN et al., 2011).

3.3.2 Biópsia intestinal

Como exposto anteriormente, biópsias intestinais com características que possam se enquadrar nos critérios estabelecidos por Marsh (1992), juntamente com sorologia positiva representam o padrão ouro para o diagnóstico de doença celíaca. Múltiplas biópsias são obtidas a partir da segunda ou terceira parte do duodeno (FREEMAN et al., 2011).

3.3.3 Marcadores sorológicos usados para o diagnóstico da DC

IgA anti-endomísio (IgA EMA), IgA anti-transglutaminase tecidual (IgA anti-tTG), IgA anti-gliadina e IgG anti-gliadina são os marcadores sorológicos avaliados no diagnóstico da DC (RASHTAK et al., 2008).

Anticorpos IgA ligam-se ao endomísio, uma matriz que une células musculares adjacentes, produzindo um perfil de coloração que pode ser visualizado por meio de imunofluorescência indireta. O resultado do teste tem caráter qualitativo e o antígeno tecidual é a transglutaminase (LEWIS; SCOTT, 2010).

Testes imunoenzimáticos (ELISA) sorológicos podem ser realizados no intuito de verificar e quantificar a presença de anticorpos da classe IgA dirigidos contra a tTG. Esta sorologia é altamente sensível e específica para o diagnóstico da DC e apresentam um menor custo quando comparado à imunofluorescência para pesquisa de anticorpos IgA EMA (LEWIS, 2010).

As gliadinas são os principais produtos gerados pela modificação do glúten por ação enzimática da transglutaminase e têm sido largamente utilizadas como antígeno nos testes imunoenzimáticos que visam a pesquisa de anticorpos séricos IgG e IgA anti-gliadina. Contudo, não são muito utilizados na rotina em decorrência de sua baixa sensibilidade e especificidade (FREEMAN et al., 2011).

3.4 ASPECTOS CLÍNICOS E COMORBIDADES

A expressão da doença também é variável: enquanto alguns casos apresentam uma forma caracterizada pela enteropatia clássica, na maioria dos casos a sintomatologia é não-típica (presença de anemia e osteoporose) ou ausente (sujeitos diagnosticados não por seus sintomas, mas por bases sorológicas). Nesses indivíduos assintomáticos é possível identificar as características biológicas da patologia através da análise da resposta imune no soro e na biópsia intestinal (WALKER; TALLEY, 2011).

A doença celíaca pode ser definida como uma doença multifatorial, caracterizada por genes que conferem susceptibilidade (ex.: HLA) e outros genes capazes de modular a expressão clínica da doença (KING; CICLITIRA, 2000), sendo de bastante interesse pela associação da doença celíaca com outras patologias auto-imunes.

Esta associação pode ser explicada pela presença de genes em comum e pela perturbação dos mecanismos intestinais de tolerância imunológica relacionada com a exposição contínua ao glúten. Esta hipótese é confirmada pelo fato dos pacientes celíacos mais expostos ao glúten apresentarem um maior risco de aparecimento de doenças auto-imunes (VENTURA, 1999). Pode-se inferir que diferentes polimorfismos genéticos podem estar relacionados com as formas clássicas e atípicas de doença celíaca, assim como sua associação com outras doenças auto-imunes, tais como diabetes, dermatite herpetiforme e linfoma intestinal (KARELL et al., 2002; TIMUCIN et al., 2009).

Por esta razão, a definição de polimorfismos envolvidos na doença celíaca (exceto a associação com o HLA) é complicada, mesmo com muitos genes tendo sido estudados em grandes populações (GRECO et al., 1998)

A principal característica da doença celíaca é a incapacidade do paciente desenvolver uma tolerância intestinal ao glúten. A presença de genes do HLA é capaz de influenciar a alta afinidade das pontes com peptídeos do glúten modificados, sendo a gliadina o de maior destaque. Sua desaminação, operada pela enzima transglutaminase, é necessária, mas não é uma condição suficiente (PETRONZELLI et al., 1997).

O conhecimento dos diversos perfis de apresentação clínica da DC por pediatras e clínicos em geral é importante, uma vez que as formas oligossintomáticas mostram-se mais frequentes do que a forma clássica da doença. Durante as duas últimas décadas tem sido observada ampla variação nas formas de apresentação clínica da DC, tornando seu diagnóstico um desafio (FASANO; CATASSI, 2005).

Na *forma clássica* da DC, as manifestações são gastrointestinais e se iniciam entre 6 e 24 meses de idade, logo após a introdução do glúten na dieta. Tipicamente, as crianças apresentam distensão abdominal, diarreia crônica, irritabilidade e hipotrofia muscular. A crise celíaca, raramente observada, é caracterizada por desequilíbrio eletrolítico, diarreia aquosa explosiva, distensão abdominal importante, desidratação, hipotensão e letargia (FREEMAN et al., 2011).

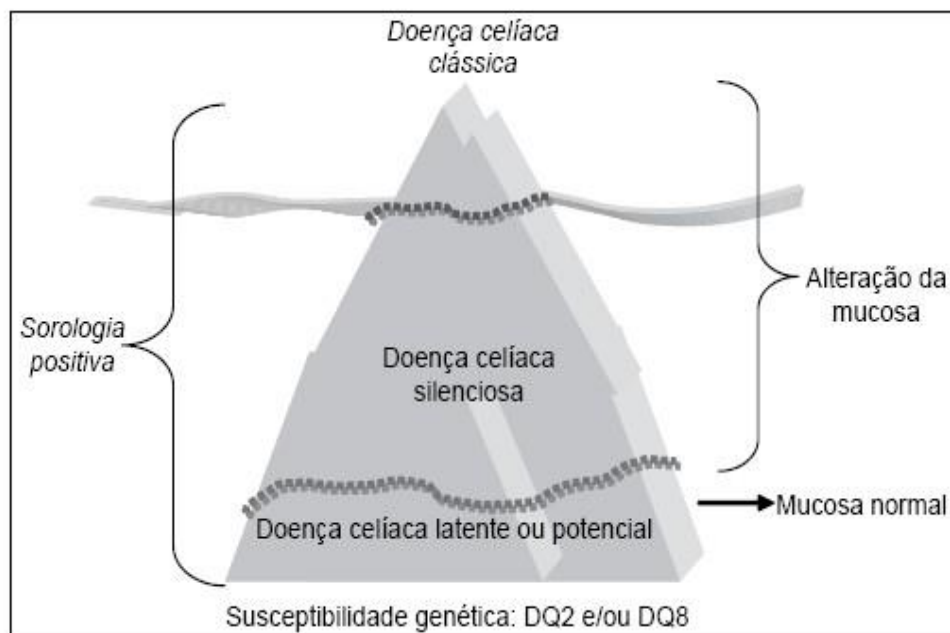
A DC *atípica* ou com sintomas não-clássicos, geralmente acometem crianças entre 5 a 7 anos de idade que tendem a apresentar náuseas, vômitos, dor abdominal recorrente, constipação, empachamento. No entanto, as manifestações extra-intestinais são predominantes, e podem ser explicadas pelos déficits nutricionais ou

por reações imunológicas acometendo outros órgãos. Na DC atípica a baixa estatura pode ser a única manifestação clínica (HILL et al., 2002).

A DC *silenciosa* é encontrada em indivíduos aparentemente assintomáticos, que apresentam sorologia positiva e padrão histológico idêntico à forma clássica, com atrofia parcial ou subtotal da mucosa intestinal, e que respondem à dieta isenta de glúten. Melhoria do rendimento escolar e sensação de bem estar geral frequentemente são relatados por pacientes após a adoção de dieta isentas de glúten, o que nos permite afirmar que a DC silenciosa não é totalmente assintomática (FREEMAN et al., 2011).

A forma latente ou potencial da DC apresenta sorologia positiva para anticorpos anti- endomísio de anti-transglutaminase e biópsia intestinal normal. (FERGUSON; ARRANZ; O'MAHONY, 1993, TRONCONE et al., 1996).

Figura 5 O íceberg Celíaco - Formas clínicas da Doença Celíaca



Fonte: Baptista (2006)

A exposição ao glúten e o desenvolvimento de auto-anticorpos dirigidos contra a tTG, em indivíduos geneticamente susceptíveis, pode levar a manifestações sistêmicas e repercussões autoimunes inflamatórias secundárias de caráter crônico. Assim sendo, doenças autoimunes são dez vezes mais frequentes em adultos portadores de DC do que na população geral tais como: Diabetes insulino-

dependente (tipo I), Tireoidite, Síndrome de Sjögren⁸, Doença de Addison, Doença Hepática Autoimune, Dermatite herpetiforme, Cardiomiopatia e Desordens Neurológicas (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION GLOBAL GUIDELINES, 2012).

Desordens reprodutivas (MARTINELLI et al., 2010; MARTINS et al., 2006), ataxia cerebelar, epilepsia, neuropatia, demência, miopatia e leucoencefalopatia (SIQUEIRA NETO et al., 2004), desmineralização óssea (SILVA, 2003) e distúrbios bucais (RAUEN et al., 2005) têm sido relacionados como distúrbios secundários que acometem indivíduos portadores de DC.

Genes envolvidos na resposta imune (quimiocinas) ou na imunidade natural podem desempenhar um papel na modulação do fenótipo celíaco. O ambiente (diferente exposição a patógenos gastrointestinais) também podem ter uma função importante. As proteínas da imunidade natural, que regulam o contato entre o ambiente e o sistema imune, são de interesse particular (WESTERHOLM-ORMIO et al., 2002) .

Os polimorfismos genéticos do TNF-alfa e CTLA4 têm sido analisados previamente e os resultados obtidos foram controversos (DJILALI-SIAH, 1998, DE LA CONCHA et al., 2000, KING et al., 2002). Uma abordagem mais informativa pode ser o estudo de polimorfismos genéticos em pacientes celíacos, subdivididos em diferentes expressões clínicas da patologia.

3.5 O GENE DA INTERLEUCINA-6 (IL-6)

A IL6 é uma citocina imunorreguladora que ativa um conjunto de sinalização de superfície celular (BOULANGER et al., 2003).

Por hibridação in situ e análise por Southern - Blot de linhagens celulares híbridas de murino-humanas, Sutherland et al. (1988) mapearam o gene da IL-6 no cromossomo 7p15.

Demonstrando a sua indução por níveis elevados de IL-1 e TNF-alfa, Zilberstein et al. (1986) sugeriram que ele pode ser um mediador de alguns efeitos destas citocinas na inflamação e respostas de fase aguda, bem como na regulação da proliferação celular.

Kawano et al. (1988) apresentaram evidências de que a produção anormal de IL-6 por células neoplásicas foi tida como fator contributivo para o grande

crescimento de mieloma múltiplo e outras discrasias de células B, linfoma de células T, carcinomas de células renais e ovarianos e sarcoma de Kaposi.

Santhanam et al. (1991) demonstraram a supressão do promotor do gene IL-6 por Proteína p53.

Funatsu et al. (2002) investigou a relação entre edema macular diabético e os níveis de Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) e IL-6 no humor aquoso e plasma. Eles descobriram que os níveis aquosos humorais de VEGF e IL-6 encontravam-se correlacionado com a gravidade do edema macular e que os níveis aquosos foram significativamente maiores do que os níveis de plasmáticos. Além disso, o nível de VEGF aquoso apresentou-se significativamente correlacionado com o de IL-6. Os autores concluíram que tanto o VEGF e IL-6 são produzidos em conjunto nos tecidos intra-oculares e que ambos estão envolvidos na patogênese do edema macular diabético.

De Groof et al. (2002) avaliaram os níveis de proteínas de ligação do Fatores de Crescimento "Insuline-like" ligados à proteína (IGFBP), IL-6 e TNF-alfa em 27 crianças com choque séptico grave devido a sepse meningocócica durante os primeiros três dias após a internação. Níveis elevados de IL-6 e TNF-alfa foram observados em não sobreviventes.

Pasare e Medzhitov (2003) observaram que a falência de IL-6 em camundongos deficientes para atingir a supressão por Tr (células T reguladoras positivas) mediada resultou num aumento da susceptibilidade a infecção e resistência à autoimunidade. Em um comentário, Powrie e Maloy (2003) propuseram um modelo para o controle do desenvolvimento Tr por células imunes inatas e observou que a tentativa de controlar os níveis de IL-6 pode ser um estratégia atrativo para as doenças inflamatórias.

TGF-beta converte as células T virgens em células T reguladoras, que impedem a auto- imunidade. No entanto, na presença de IL-6, TGF-beta, também promove a diferenciação de linfócitos T virgens em células T-helper pró-inflamatórias produtoras de citocinas (Th17), que promovem a auto-imunidade e inflamação (MUCIDA et al, 2007).

IL-6 foi um dos genes candidatos escolhidos por Ota et al. (1999) para estudos de ligação de osteopenia e da osteoporose porque o produto do gene estimula osteoclastos através da ligação ao seu receptor na superfície de células, IL-6R (receptores de IL-6). Eles apresentaram evidência adicional de que a variação na

IL-6 pode estar relacionada com a osteoporose. Em 470 indivíduos japoneses, eles descobriram uma correlação entre a presença do alelo de um polimorfismo G para um polimorfismo C no nucleótido -634 e diminuição da densidade mineral óssea (DMO), por análise de variância. Quando os valores de DMO foram comparados entre os 3 grupos genotípicos no nucleotídeo -634, a DMO foi menor entre os homozigotos GG, a mais alta entre os homozigotos CC e intermediário entre os heterozigotos (OTA et al., 2001).

Em um estudo onde foram avaliados indivíduos afetados por Artrite Reumatóide Juvenil Sistêmica (SJRA), Fishman et al. (1998) propôs que a regulação da expressão de IL-6 difere de indivíduos não afetados. Eles identificaram um polimorfismo G / C na posição -174 do gene da IL-

Em um grupo de 383 homens e mulheres saudáveis de Londres, a frequência do alelo C foi 0,403 (IC 95% 0,37-0,44). Em comparação, 92 pacientes com SJRA teve uma frequência genotípica global diferente, especialmente aqueles com início da doença em idade de 5 anos. Isso ocorreu, principalmente, devido à menor frequência estatisticamente significativa do genótipo CC neste grupo.

Kristiansen et al. (2003) genotiparam 1.129 pessoas de 253 famílias dinamarquesas com Diabetes Mellitus Dependente de Insulina (DMID) e encontrou evidência de ligação e associação do polimorfismo no gene da IL-6 -174G-C com DMID, mas exclusivamente no sexo feminino. O genótipo IL-6 -174CC foi associada com menor idade de início em mulheres IDDM. A presença de 17-beta-estradiol (E2) poderia predispor a variante IL-6-174C a ser um risco de cerca de 70% maior do que a variante de proteção IL-6 -174G.

A Doença de Crohn inibe o crescimento em até um terço das crianças afetadas. Por causa da IL-6 ser elevada na Doença de Crohn, Sawczenko et al. (2005) a hipótese de que o retardo no crescimento iria variar de acordo com o genótipo na IL6 -174. Eles descobriram que crianças inglesas e suecas afetadas pela Doença de Crohn e com genótipo IL6 -174GG apresentaram mais crescimento retardado no momento do diagnóstico e tinham níveis mais elevados do marcador inflamatório proteína C-reativa induzida por IL-6 (CRP) do que crianças com genótipos GC ou CC. Após o tratamento com corticosteróides ou alimentação enteral, os níveis de PCR diminuíram significativamente e se tornaram comparáveis aos de crianças com genótipos GC ou CC. Sawczenko et al. (2005) concluiu que o genótipo da IL6-174 medeia deficiências do crescimento na Doença de Crohn. No

mesmo estudo, sugeriram que a IL6, induzida por inflamação intestinal, retarda o crescimento e suprime Fator de Crescimento "insuline-like-1" (IGF1). Assim, eles trataram ratos com colite induzida por ácido trinitrobenzenossulfônico com anti-IL6 e descobriram que a ingestão de nutrientes e inflamação não diminuíram, mas o crescimento linear foi restaurado os níveis hepáticos e plasmáticos de IGF1.

3.6 O GENE DO FATOR DE NECROSE TUMORAL - ALFA

O Fator de Necrose Tumoral - alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória multifuncional envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos, incluindo a imunorregulação, proliferação e apoptose (ESPOSITO; CUZZOCREA, 2009).

O gene do TNF-alfa está localizado no cromossomo 6p21.33. Três polimorfismos localizados na região promotora do gene foram descritos: -238G>A, -308G>A e -376G>A (KNIGHT et al., 1999).

O polimorfismo -308G>A é o mais comumente estudado. Tem-se verificado que a expressão de TNF- α é maior em pacientes portadores do alelo -308A do que naqueles que transporta o alelo -308G, sugerindo que este polimorfismo tem implicações funcionais na inflamação e pode estar associado com doenças inflamatórias (MESSER et al., 1991).

De fato, estudos anteriores demonstraram a associação deste polimorfismo com certas doenças inflamatórias, tais como a esteatose hepática (ALLER et al., 2010), infecção por vírus da hepatite B (ZHANG et al., 2014), lúpus eritematoso sistêmico (AHMED et al., 2014), síndrome do cólon irritado (TONG et al., 2014), a arterite (SANDHYA et al., 2013) e artrite reumatóide (MAXWELL et al., 2008).

A desregulação e, em particular, a sobreprodução de TNF-alfa têm sido implicadas numa variedade de doenças humanas, incluindo sepse, a malária cerebral e doenças auto-imunes, tais como esclerose múltipla, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, e doença de Crohn, bem como câncer. A susceptibilidade a muitas destas doenças tem sido associada a bases genéticas, e o gene do TNF-alfa é considerado um gene candidato à predisposição. No entanto, revelando a importância da variação genética no gene do TNF-alfa a susceptibilidade a doenças ou a gravidade é complicada pela sua localização no interior do MHC, uma região altamente polimórfica que codifica numerosos genes envolvidos nas respostas imunológicas. Ruuls e Sedgwick (1999) reviram os estudos

que analisaram a contribuição de TNF-alfa e genes relacionados com a susceptibilidade à doenças humanas e discutiram como a presença do gene do TNF-alfa dentro do MHC pode potencialmente complicar a interpretação de estudos em modelos animais nos quais o gene do TNF- alfa é experimentalmente manipulado

Obayashi et al. (2000) investigaram a influência de TNF-alfa sobre a predisposição à dependência de insulina (diabetes tipo I) em pacientes diabéticos que tiveram a doença desencadeada no início da vida adulta . Eles concluíram que o TNF-alfa está associada a uma predisposição para a progressão para a dependência de insulina e que a determinação do genótipo de TNF-alfa nestes pacientes pode permitir uma melhor previsão da sua evolução clínica.

Gunther et al. (2011) demonstraram um papel crítico para a caspase-8 (CASP8) na regulação da necroptose de células epiteliais intestinais (IECs) e ileíte terminal. Seus dados demonstraram uma função crítica de caspase-8 na regulação da homeostase intestinal e na protecção de células epiteliais intestinais para morte celular induzida por TNF-alfa.

3.7 O GENE DA INTERLEUCINA - 10

As respostas imunitárias são específicas tanto para o antígeno contra o qual são montadas como pela classe de resposta que é induzida. O perfil antigênico, uma vez exposto às características imunogenéticas do indivíduo, pode determinar respostas mutuamente excludentes que perpassam desde uma hipersensibilidade humoral a respostas tardias, culminando com a tolerância imunológica. Estudos que avaliam a ação de células-T auxiliares sugerem a existência de fatores de inibição de síntese de citocinas. Em humanos, este fator inibitório foi denominado Interleucina- 10 (IL-10) por Vieira et al. (1991).

Kim et al. (1992) mapearam o gene da IL-10 no cromossomo 1q32.1 por análises em PCR a partir de células somáticas híbridas hamster-humanas.

A estimulação de células sanguíneas humanas em cultura com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano demonstraram uma ampla variação nas taxas de secreção de IL-10 (WESTENDORP et al., 1997). Eskdale et al. (1998) estudou a contribuição da estrutura da região promotora do gene da IL-10 sobre a secreção de IL-10 induzida por LPS e concluiu que a heterogeneidade genética apresentava

associação com o nível de produção de IL-10.

Alta produção de IL-10 tem sido associada com doenças autoimunes tais como artrite reumatóide e lupus eritematoso sistêmico (LES) e os níveis de produção são concordantes entre gêmeos monozigóticos (WESTENDORP et al., 1997).

A região promotora do gene da IL-10 é polimorfica e pode influenciar seu nível de produção. Gibson et al. (2001) identificou sete SNPs na região distal do promotor do gene da IL10 e descobriram que certos haplótipos estão significativamente associados com a alta ou baixa produção de IL-10 e com LES em afro-americanos.

Turner et al. (1997) demonstrou associação entre a presença ou ausência de uma Adenina na posição -1082 e o nível de secreção de IL-10.

Shin et al. (2000) identificaram associações significativas entre o genótipo do vírus da imunodeficiência humanas-1 (HIV-1) e a progressão da infecção à síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), pesquisando também variantes polimórficas na região promotora do gene da IL-10. Indivíduos HIV positivos com um alelo "A" na posição -592 progrediram mais rapidamente para AIDS do que indivíduos homozigotos para o alelo alternativo "C" (-592C/C). Demonstraram que o alelo -592A encontrava-se associado a uma baixa produção de IL-10 e sugeriram que a progressão para AIDS pode ser retardada por estratégias imunoterapêuticas que mimetizem ou aumentem o efeito inibitório da exercido pela IL-10.

Polimorfismos em genes codificantes de citocinas proinflamatórias parecem contribuir de forma significativa para o risco de doença cardíaca coronária. Em duas diferentes populações do norte e do sul da Itália, World Gastroenterology Organisation Global Guidelines (2012), Lio et al. (2003) encontraram uma frequência significativamente maior do genótipo IL10-1082G/G (que está associado com o aumento da produção de IL10) entre os idosos participantes mais velhos do que nos controles e pacientes com infarto agudo do miocárdio. Por outro lado, a frequência do genótipo -1082A/A, associada à baixa produção de IL10, foi significativamente maior em pacientes com infarto agudo do miocárdio do que nos controles e participantes mais idosos. Assim, alta produção de IL10 foi protetora para infarto agudo do miocárdio e um parâmetro determinante para a longevidade. Um fundo genético protetor contra as doenças cardiovasculares parecia ser um componente de longevidade. Lio et al. (2003) concluíram que uma vez que o sistema imunológico humano evoluiu para controlar organismos patogênicos, as respostas

proinflamatórias eram susceptíveis de ser programadas pela evolução para resistir a infecções fatais. Eles também observaram que a baixa produção de interleucina-10 está associada a um aumento da resistência a patógenos. O aumento da concentração de interleucina-10, no entanto, pode controlar melhor as respostas inflamatórias induzidas por lesão vascular crônica e reduzir o risco de complicações aterogênicas. Lio et al. (2003) concluíram que essas condições podem resultar em um aumento da possibilidade de vida longa em um ambiente com uma carga reduzida de antígenos.

Por outro lado, o risco para desenvolvimento de câncer pode incluir susceptibilidades genéticas tais como o controle de produção de citocinas. Uma vez que polimorfismos na região promotora do gene da IL-10 estão correlacionadas com seus diferentes níveis de produção, a IL-10 também pode exercer influência sobre o desenvolvimento processos neoplásicos. Neste contexto, Alamartine et al. (2003) investigaram a possível associação entre a presença de SNP's na região promotora do gene da IL-10 nas posições -1082, -819, -592 e a ocorrência de câncer carcinoma de pele após transplante renal. Genótipos e haplótipos do gene da IL-10 encontravam-se diferentemente distribuídos entre indivíduos submetidos a transplantes de rins que desenvolveram carcinoma de pele, mas especialmente no carcinoma de células escamosas evidenciou-se um aumento da frequência do haplótipo GCC e diminuição da frequência do haplótipo ATA. A produção de IL-10 foi intensamente correlacionada com o desenvolvimento de câncer de pele e tendeu a ser maior em pacientes que desenvolveram carcinoma de células escamosas do que nos demais. Este resultados indicaram que polimorfismos no promotor da IL-10 podem contribuir para o desenvolvimento de processos carcinoma de células escamosas após o transplante renal.

Summers et al. (2000) sugeriram que uma alta ou baixa produção de IL-10 poderia afetar a secreção de citocinas inflamatórias associadas com risco para Síndrome da Morte Súbita Infantil (SMSI). Uma vez que o haplótipo -1082A, -819T, and -592A (ATA) da região promotora do gene da IL-10 define a sua baixa produção eles propuseram que uma produção deficiente contribuiria para a SMSI ou por um início tardio da produção de anticorpo protetor ou por uma menor capacidade para inibir a produção de citocinas inflamatórias.

Wang et al. (2012) sugere que haplótipos do promotor da IL-10 1082A>G, -819C>T e -592C> A podem influenciar a expressão de IL-10 e dar origem a câncer

de pulmão de células não- pequenas células (CPCNP) em pacientes com mau prognóstico e recaída. Eles demonstraram um evidente desequilíbrio de ligação entre os polimorfismo nas posições -819 e -592 no promotor do gene da IL-10 e que células T do sangue periférico de pacientes não-ATA foram mais susceptíveis à apoptose e apresentaram menor citotoxicidade para células tumorais, em comparação com os doentes com carreadores do haplótipo ATA. Os resultados sugerem que a baixa produção de IL-10 pode promover malignidade do tumor através de promover a apoptose das células T e a sobrevivência de células tumorais, e que os haplótipos do promotor da IL-10 de haplótipos podem ser utilizados para prever recaídas e a sobrevivência em CPCNP, podendo auxiliar o manejo clínicos e na tomada de decisões apropriadas ao tratamento dos pacientes.

4 HIPÓTESE DO ESTUDO

O presente estudo teve o intuito de avaliar a frequência de polimorfismos nas regiões promotoras de genes da imunidade, a saber: IL-10 (posições -1082 G/A, -819 C/T e -592 C/A), TNF α (posição -308 G/A) e IL-6 (posição -174 G/C) realizando um estudo de associação dos alelos envolvidos com a Doença Celíaca. Um possível envolvimento desses genes com a patogênese da doença celíaca pode ser sugerido por suas funções na adaptação do sistema imune ao ambiente e na função da homeostase imunológica.

O aumento da produção geneticamente determinada de TNF-alfa, IL-6 e redução de IL-10 podem ser relevantes na susceptibilidade para DC, principalmente para pacientes com deficiência de IgA, assim como o grau de expressão os genes da TNF α , IL-6 e IL-10 parecem influenciar o perfil de produção de citocinas (CATALDO et al., 2003).

Walker e Talley (2011) afirmam que o fenótipo da doença celíaca pode variar em decorrência das concentrações locais e sistêmicas de citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias liberadas em um *background* imunológico com características bem definidas para a DC. Por este motivo, foram avaliadas as regiões promotoras dos genes da IL-10 (posições -1082 G/A, -819 C/T e -592 C/A), TNF α (posição -308 G/A) e IL-6 (posição -174 G/C).

Os polimorfismos acima citados foram escolhidos como alvo do presente estudo porque já foram avaliados em outras populações ao redor do mundo e também por já terem sido associados com várias doenças autoimunes inflamatórias bem como com a Doença Celíaca.

5 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O melhor conhecimento de mecanismos genéticos e imunopatogênicos da Doença Celíaca podem trazer perspectivas na elaboração de protocolos diagnósticos mais objetivos, que possam subsidiar um melhor manejo clínico da DC uma vez que a definição da manifestação e gravidade da doença ainda permanecem sem consenso. Tais informações podem também contribuir para estudos de desenvolvimento de tratamento imunoterápico da Doença Celíaca.

6 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo da doença celíaca em pacientes italianos foi aprovado por comitê de ética *Burlo Garofolo Ethical Committee* sob número de protocolo CE/V-71/2010 e aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ñ CEP/UPE sob registro CAEE 0213.0.097.000-11.

7 RESULTADOS

Os resultados da pesquisa serão apresentados em forma de artigos, ou seja, Artigos 1 e Artigo 2.

7.1 ARTIGO 1 - Evaluation of polymorphisms in the IL-10 gene promoter region in an Italian celiac population

AUTORES: Fabricio Andrade, Paulo Souza PhD, Maria de Mascena Maia PhD, Rebeka Maranhão, Ludovica Segat PhD, Sergio Crovella PhD.

Artigo submetido à Genetics and Molecular Research Qualis: B2 em Ciências Biológicas I of polymorphisms in the IL10 gene promoter region in an Italian celiac population

F. A. Martins Esteves¹, P. R. Eleutério de Souza PhD², M.M. Maia PhD², R.M. de Albuquerque Maranhão³, L. Segat PhD^{3*}, S. Crovella PhD⁴.

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife/PE
ZIP CODE: 50670-901, Recife, Pernambuco, ²Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, / ZIP CODE: 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil

³Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (ICB/UPE), Recife, Pernambuco, Brazil

⁴Departament of Genetics, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária, Recife/PE
ZIP CODE: 50670-901 Recife, Pernambuco, Brazil.

⁵Institute for Maternal and Child Health, Trieste, Italy - Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico IRCCS "Burlo Garofolo" - via dell'Industria 65/1, 34100 Trieste, Italy.

Corresponding author:

Fabricio Andrade Martins Esteves.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 ñ Cidade Universitária, Recife-PE. CEP:

50670- 901 Recife, PE, Brazil

Tel: (+55) 81-87101610

Fax: (+55) 81-2126.8485

E-mail address: andrade.fab@gmail.com

Source of Support: CNPq/CAPES

Abstract

Celiac disease (CD) is a multifactorial autoimmune disorder characterized by reversible small bowel mucosal inflammation triggered by gluten in patients with a specific genetic predisposition. The CD estimated prevalence in the Italian population is about 1 case per 170 inhabitants, which females are more affected (women to men ratio = 2.3:1). HLA-DQ2 and/or DQ8 genotype are the main factor in the development of CD. The intestinal injury triggered by gluten has well- characterized histological and immunological features and the degree and type of damage depends on the pattern of cytokines and their local concentration. The IL-10 is an anti-inflammatory cytokine and its expression has been studied in association with CD. The purpose of this study was to perform a frequency association of polymorphisms in the promoter region of the IL10 gene (- 1082 A>G, -819 C>T, -592 C>A) among celiacs and healthy controls and to evaluate the association between these SNPs according to HLA genotype. A total of 136 Italian celics, divided in 68 individuals DQ2+, 68 individuals DQ8+ and 68 Italian healthy controls (mean age: 17.08±15.41 years, range 2-7, both male and female) were recruited. The allele frequency for ĩ 1082G, -819C and -592C was more frequent in controls than in CD patients (52.2% vs. 48.5%; 75% vs. 67%; 75% vs. 68%, respectively) but did not show statistical relevance ($p>0.05$). The involvement of polymorphisms in the promoter region of IL-10 gene has shown conflicting results varying according to the studied celiac population. The polymorphic allelic frequencies did not show any positive association with the HLA genotype in the celiac group. We suggest that additional studies evaluating the promoter region of IL10 gene as a candidate region involved in the

inflammatory background of the celiac disease should be performed for better clarify this mechanism.

Keywords: Celiac disease; Interleukin-10, HLA

Introduction

Celiac disease (CD) or gluten-sensitive enteropathy (GSE), is a multifactorial autoimmune disorder characterized by reversible small bowel mucosal inflammation with villous atrophy (Leon et al, 2006), triggered by well-identified environmental factors (gluten and related prolamins) in patients with a specific genetic predisposition (Troncones et al, 2004). The worldwide prevalence of CD varies between 0.7 to 2% (Lamireau, 2011). A study carried out by Volta (2001) with a native Italian population showed a prevalence of 1 case per 170 inhabitants, which females are more affected (women to men ratio = 2.3:1). A previous multicenter study performed with approximately 17,000 students of Italian origin revealed a significant prevalence of 1 case of celiac disease for each 184 students (Catassi, C. *et al*, 1996).

Serologic tests for Immunoglobulin (Ig)-A anti-endomysium (IgA-EMA), antigliadin IgA and antitissue transglutaminase IgA (IgA-tTG) provide, when combined, reliable parameters for the diagnosis and may also be useful to follow up patients' response to gluten-free diet (Kurppa *et al.*, 2009). Moreover, the disease is highly associated with the expression of leukocyte antigens HLA- DQ2 and/or-DQ8 (Latiano et al., 2007). These antigens are expressed in approximately 98% of celiac patients (Greco et al., 1998, Van Heel et al., 2005).

However, the association with HLA is not sufficient to explain the wide range of clinical features of celiac disease: in fact, even in familiar cases of this disease, only a few relatives that share the same HLA alleles develop celiac disease (King et al., 2000). Thus, other genes are supposed to modulate the clinical expression of disease (King et al., 2000). In genetically susceptible individuals, exposure to gluten generates a known pattern Th1-type inflammatory response. The main immune mediators involved in the mechanism of tissue aggression are: IL-2, IL-4, IFN- γ (Westerholm-Ormi et al., 2002), TNF α , IL-15, IL-18, TGF β and IL-10 (León AJ *et al.*,

2005). The degree and type of damage to the mucosa depends on the pattern of cytokines and their concentration (MacDonald et al., 1999).

The IL-10 is an anti-inflammatory cytokine and a potent modulator of the Th1 response. Three functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) at positions - 592 (C>A / rs1800872), - 819 (C>T / rs1800871) and -1082 (A>G / rs1800896) in the promoter region of the gene encoding for *IL-10* have been reported as modulator of immune response in chronic inflammatory disorders (Ying et al., 2011; Wang et al., 2011). The occurrence of these SNPs in the promoter region of the gene may eventually promote an exacerbated Th1 inflammation, that could lead to increased susceptibility to CD (Hahn-Zoric et al., 2003).

Regulating the level of gene expression, the presence of polymorphisms in promoter regions of genes of cytokines can exert influence over the degree of susceptibility to immune-mediated diseases such as celiac disease (Reynard, MP. *et al*, 2000; Bidwell, J. *et al*, 1999; De La Concha, EG., 2000).

With varying results for different populations, some studies have suggested the *IL10* gene as a candidate for autoimmune disorders and/or chronic inflammatory diseases (Núñez et al., 2006; Garrote et al., 2005; Woolley et al., 2005; Barisani et al., 2006).

Therefore the aim of this study was to evaluate if the presence of polymorphisms in the promoter region of the interleukin 10 gene can eventually be susceptibility to celiac disease.

Material and Methods

The study was approved by the Ethics Committee for Research on Human Beings of CEP/UPE in Brazil, with the registry CAEE 0213.0.097.000-11 and the work was performed in accordance with the principles of the 1983 Declaration of Helsinki.

A total of 136 CD Italian patients, divided in 68 individuals DQ2-positives and 68 individuals DQ8- positives and 68 italian healthy controls (mean age: 17.08±15.41 years, range 2-7, both male and female) participated in this study.

Patients were recruited from at IRCCS Burlo infantile maternal Garofolo, Trieste, Italy. A free and informed consent statement was obtained from all participants in the study or their tutors. The control population, matched for age, sex and from the same geographical region of CD patients, consisted of 68 healthy controls (mean age $27.5.08 \pm 12.45$ years, range 18-60, both male and female), serum negative for antibodies anti-tTG and for anti- endomysium. In the control group, CD was excluded on clinical evaluation and by negative serology for antibodies anti-tTG and for anti-endomysium.

Blood specimens (5 ml) were collected in EDTA sterile tubes at the Institute IRCCS Burlo infantile maternal Garofolo, Trieste, Italy.

CD diagnosis was made according to the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition guidelines (*Walker-Smith JA, et al., 1990*): after the evaluation of clinical symptoms, an anti-tTG serological test was performed (with the ELISA Eu-tTG kit; Eurospital, Trieste, Italy), and EMA antibodies were subsequently screened (with the Antiendomysium Kit; Eurospital, Trieste, Italy) for results confirmation when ambiguous serological results were achieved. Molecular HLA typing was used to confirm the serological diagnosis and to exclude CD in doubtful cases. An intestinal biopsy was also performed for all CD patients and the presence of histological infiltrative lesion (Marsh I, II, IIIA, IIIB or IIIC) was considered as predictive of CD. In symptomatic CD patients with normal intestinal mucosa and positive serology, after HLA typing, immunohistochemical analysis was performed to determine the number of CD3-positive intraepithelial lymphocytes, using CD4, CD8, and CD25 as population markers (*Jarvinen TT et al., 2004*).

Genomic DNAs were extracted from peripheral whole blood for all patients and controls using the Wizard Genomic Purification kit (Promega, Madison, WI) following the manufacturer's indications. HLA class II molecular typing was performed using the Eu-tTG Risk kit (Eurospital).

SNPs genotyping

IL10-592A>C (rs1800872) polymorphism was detected by PCR-RFLP using the following protocol: final volume of 20 μ L, containing: 3 U of Taq DNA Polymerase Platinum $\text{\textcircled{R}}$ (Invitrogen), 1X buffer of Taq DNA Polymerase (20 mM Tris-HCl [pH 8.4], 50 mM KCl), 2.5 mM MgCl_2 , 1 pmol of each primer (Sense primer:

5' CCT AGG TCA CAG TGA CGT GG-3' Antisense primer: 5' GGT GAG CAC TAC CTG ACT AGC-3', 0.2 mM dNTP (final concentration of 200 μ M for each nucleotide) and ~ 200 ng of DNA. Amplification conditions were as follows: 3 minutes at 95 ° C initial denaturation, 95 ° C for 30 seconds, 55 ° C for 20 seconds and 72 ° C for 30 seconds (29 cycles) and one cycle of final extension at 72 ° C for 10 min.

Subsequently 6 μ L of the amplified product were used in the reaction for the digestion with 3 U of *RsaI* to a final volume of 20 μ L. This reaction was incubated at 37 ° C for 3 hours. After digestion, the products were subjected to electrophoresis separation in agarose gel using 2% TAE buffer (Tris Acetate 400mM and EDTA 10mM). The electrophoresis separation was performed at 80V for 30 min. The amplified product was 412 bp.

Analysis of the polymorphism was performed according to the following criteria: a single band of 412 bp for the CC genotype, two bands, one of 236 bp and the other of 176bp for the AA genotype, and three bands of 412, 236 and 176bp for the AC genotype.

The presence of polymorphisms in the position -1082A>G (rs1800896) and -819C>T (rs1800871) in the IL-10 promoter were analyzed by the use of sequence specific primers Primers (Forward: 5' ~~TC~~CTGCCGCAACCCAACTGGC-3' and Reverse: 5' ~~TT~~TGGGGGAAGTGGGTAAGAGT-3') - PCR Cytokine Genotyping ET Dye Terminator Cycle sequencing kit (GE Healthcare) following the manufacturer's instructions.

Cycling conditions on the ABI prism 7900 HT (Applied Bio- systems) were 2 min, 50°C; 10 min, 95°C followed by 40 cycles of 15 sec, 92°C; and 1 min, 60°C.

Then the samples were taken to the automated DNA sequencer MegaBACE 1000 (Amersham Pharmacia Bio- tech) according to the manufacturers' protocol. Results were analyzed using genetic profiler version 2.0 (Amersham Pharmacia Biotech).

Statistical Analysis

Hardy-Weinberg equilibrium was assessed by a χ^2 test with 1 degree of freedom.

Allele and genotype frequencies were calculated by direct gene counting. The data were stored and analyzed using the free online software SNPStats. (Xavier, Solé, et al, 2006). Haplotypes were computed also using the same web tool for the analysis of association. Differences in alleles, genotypes and haplotypes distribution were analyzed using the χ^2 test. p-values < 0.05 were considered to be significant. Odds ratio (OR) and 95% confidence intervals (CI) were also calculated.

Results

Table 1 shows the alleles and genotypes frequencies distributions for the SNPs in the promoter region of *IL10* gene between CD patients (also according to HLA typing: DQ2-positives or DQ8-positives) and healthy controls. The allele frequency for -1082 G, -819 C and -592 C was more frequent in controls than in CD patients (71% vs. 49%; 75% vs. 68%; 75% vs. 68%, respectively). It also displays the results of the analysis of allelic and genotypic frequencies between Italian celiac (subdivided according to the HLA profile: DQ2 + or DQ8 +) and the control group. No significant differences were found for both genotype and allelic frequency distribution ($p > 0.05$), as may be verified in Table 1. Moreover, no deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was observed in both CD patients and controls.

To evaluate if polymorphisms in the promoter region of the *IL10* gene would be associated with HLA, the celiac group was stratified into celiac DQ2+ or DQ8+. No significant difference was found when these analyses were performed.

We observed higher frequency of the haplotype -1082G, -819C and -592C in both DQ2+ and DQ8+ CD patients (41%). Moreover, genotypes frequencies did not show significant differences being the genotypes -1082 G/A, -819 C/C and -592 C/C the more presented by celiac DQ2 + (66%, 45%, 45%, respectively) and DQ8 + (80%, 45%, 45%, respectively).

Table 1: Frequencies analysis of polymorphisms in *IL-10* gene promoter region (-1082A>G, -819C>T, -592C>A) between italians celiacs (CD), categorized also by HLA: DQ2+ or DQ8+, and a healthy italian group (HC).

		CD		DQ2+		DQ8+		HC		O.R.	I.C.=95%	p-value	
IL-10 (-1082) / rs1800896		n	%	n	%	n	%	n	%				
Alleles	A	140	51	71	52	69	51	65	48	Ref.=1.0			
	G	132	49	65	48	67	49	71	52	0.86	0.57-1.3	0.52	CD vs. HC
										0.83	0.52-1.34	0.27	DQ2+ vs. HC
										0.89	0.55-1.44	0.35	DQ8+ vs. HC
Genotypes	AA	20	15	13	19	7	10	8	12	Ref.=1.0			
	AG	100	73	45	66	55	80	49	72	0.58	0.33-1.98	0.67	CD vs. HC
	GG	16	12	10	15	6	10	11	16	0.58	0.18-1.78	0.4	CD' vs. HC'
										0.56	0.21-1.48	0.17	DQ2+vs.HC
										0.55	0.16-1.9	0.26	DQ2' + vs. HC'
										1.28	0.43-3.79	0.43	DQ8+ vs. HC
										0.62	0.15-2.58	0.38	DQ8' + vs.HC'
										0.44	0.16-1.19	0.08	DQ2+ vs. DQ8+
IL-10 (-819) / rs1800871										0.89	0.22-3.52	0.57	DQ2' + vs. DQ8+'
Alleles	C	184	68	93	68	91	67	102	75	Ref.=1.0			
	T	88	32	43	32	45	33	34	25	1.43	0.9-2.28	0.13	CD vs. HC
										1.38	0.81-2.35	0.14	DQ2+ vs. HC
										1.48	0.87-2.51	0.09	DQ8+ vs. HC
Genotypes	CC	62	45	31	45	31	45	38	56	Ref.=1.0			
	CT	60	44	31	45	29	42	26	38	1.41	0.76-2.6	0.28	CD vs. HC
	TT	14	11	6	10	8	13	4	6	2.14	0.65-6.99	0.28	CD' vs. HC'
										1.46	0.72-2.95	0.19	DQ2+vs.HC
										1.35	0.34-5.3	0.46	DQ2' + vs. HC'
										1.36	0.67-2.78	0.24	DQ8+ vs. HC
										2.45	0.67-8.9	0.14	DQ8' + vs.HC'
										1.06	0.52-2.17	0.49	DQ2+ vs. DQ8+
IL-10 (-592) / rs1800872										0.75	0.23-2.4	0.42	DQ2' + vs. DQ8+'
Alleles	C	184	68	93	68	91	67	102	75	Ref.=1.0			
	A	88	32	43	32	45	33	34	25	1.43	0.9-2.28	0.13	CD vs. HC
										1.38	0.81-2.35	0.14	DQ2+ vs. HC
										1.48	0.87-2.51	0.09	DQ8+ vs. HC
Genotypes	CC	62	45	31	45	31	45	38	56	Ref.=1.0			
	AC	60	44	31	45	29	42	26	38	1.41	0.76-2.6	0.28	CD vs. HC
	AA	14	11	6	10	8	13	4	6	2.14	0.65-6.99	0.28	CD' vs. HC'
										1.46	0.72-2.95	0.19	DQ2+vs.HC
										1.35	0.34-5.3	0.46	DQ2' + vs. HC'
										1.36	0.67-2.78	0.24	DQ8+ vs. HC
										2.45	0.67-8.9	0.14	DQ8' + vs.HC'
										1.06	0.52-2.17	0.49	DQ2+ vs. DQ8+

Legend: CD = Italian celiacs / HC = Italian healthy control / DQ2+ = italians celiacs HLA-DQ2 carriers / DQ8+ = italians celiacs HLA-DQ8 carriers / CD vs. HC= comparison of frequencies between the reference genotype and heterozygotes for celiacs and healthy controls / CDövs. HCö= comparison of frequencies between the reference genotype and the less frequent genotype for celiacs and healthy controls / DQ2+ vs. HC = comparison of frequencies between the reference genotype and heterozygotes for celiacs DQ2-carriers and healthy controls / DQ2+ö vs. HCö = comparison of frequencies between the reference genotype and the less frequent genotype for celiacs DQ2-carriers and healthy controls / DQ8+ vs. HC = comparison of frequencies between the reference genotype and heterozygotes for celiacs DQ8-carriers and healthy controls / DQ8+ö vs. HCö = comparison of frequencies between the reference genotype and the less frequent genotype for celiacs DQ8-carriers and healthy controls / DQ2+ vs. DQ8+ = comparison of frequencies between the reference genotype and heterozygotes for celiacs DQ2-carriers and DQ8-carriers / DQ2+övs. DQ8+ö= comparison of frequencies between the reference genotype and the less frequent genotype for celiacs DQ2-carriers and DQ8-carriers. Table 2 shows the frequency distribution of the haplotypes displayed by celiacs and healthy Italian individuals. The frequency of the *IL10* 1082 G / 819 C / 592 C reference haplotype was higher in both controls and celiacs groups (44% vs. 42%, respectively).

Table 2: Haplotypes frequencies of the IL-10 gene promoter region (-1082G>A, - 819C>T, - 592C>A) in Italians celiacs (categorized also by HLA genotype: DQ2+ or DQ8+) and healthy italian group.

Haplotypes (-1082;-819;-592)	Controls		Celiacs		Celiacs DQ2+		Celiacs DQ8+	
	n	freq.	n	freq.	n	freq.	n	freq.
GCC	29	0.44	56	0.42	28	0.41	28	0.41
ACC	21	0.31	36	0.26	19	0.27	17	0.25
ATA	11	0.16	34	0.25	17	0.25	17	0.25
GTA	5	0.09	10	0.07	4	0.07	5	0.09

Table 3 shows the results of haplotypes frequencies analysis between the control and celiac group (-1082A/-819C/-592C; -1082A/-819T/-592A; -1082G/-819T/-592A). There were not significant differences between proportions displayed by both groups ($p>0.05$).

Table 3: Association results of haplotypic frequencies in IL-10 gene promoter region (-1082G>A, - 819C>T, -592C>A) between italians celiacs (categorized also by HLA genotype: DQ2+ or DQ8+) and healthy italian group.

Haplotypes (-1082;-819;-592)	DQ2+ x DQ8+			DQ2+ x Controls			DQ8+ x Controls			Celiacs x Controls		
	P-value	O.R.	95% CI	P-value	O.R.	95% CI	P-value	O.R.	95% CI	P-value	O.R.	95% CI
GCC	NA	1.00 (REF.)	NA	NA	1.00 (REF.)	NA	NA	1.00 (REF.)	NA	NA	1.00 (REF.)	NA
ACC	0.76	0.88	0.39 - 1.99	0.88	0.94	0.4 - 2.18	0.98	1.01	0.43 - 2.39	1.00	1.00	0.49 - 2.04
ATA	0.89	0.95	0.45 - 2.01	0.15	1.74	0.82 - 3.68	0.17	1.8	0.77 - 4.16	0.11	0.56	0.28 - 1.13
GTA	0.82	1.16	0.33 - 4.05	0.67	0.74	0.19 - 2.93	1.00	1.00	0.28 - 3.62	0.84	1.12	0.38 - 3.32

p-value, not significant for all associations (>0.05).

DISCUSSION

In this work we reported the distribution of *IL10* promoter polymorphisms in CD patients and controls in a native Italian population. The IL-10 is an anti-inflammatory cytokine and a potent modulator of the Th1 response. The *IL10* gene is located on the long arm of human chromosome 1 and its proximal promoter contains three single nucleotide polymorphisms (SNPs) at positions - 1082 (A>G), - 819 (T>C) and -592 (C>A) (Crawley et al., 1999; Eskdale et al., 1999; Eskdale et al.,

1997; Eskdale et al., 1997) and only three haplotypes have been described in Caucasian populations (ATA, ACC and GCC) with effect on the production of the protein. Therefore, the 5'-flanking region also contains two microsatellites: IL-10G and IL-10R (Eskdale et al., 1999; Eskdale et al., 1997). The presence of the A to G substitution at position -1082 in the *IL10* promoter reduces the level of transcription of the *IL10* gene in vitro (Crawley et al., 1999; Fernandes et al., 2008) and in vivo studies demonstrated that the presence of the -1082A allele is associated with reduced quantities of IL-10 both at the mRNA and protein level (Koss et al., 2000; Rad et al., 2004; Cataldo et al., 2003; Fernandes et al., 2008).

In the present study we reported the distribution of SNPs at positions -1082 (A>G), -819 (C>T) and -592 (C>A) of *IL10* gene in CD patients and healthy controls in an Italian native population. No significant differences were showed for all analysis performed. These results are in agreement with those reported by Lio *et al.* (2005), which also did not find relation for an Italian population from Sicily. On the other hand, Cataldo *et al.* (2003): in a case-control study, including 32 Italian patients suffering by celiac disease, demonstrated that the presence of SNP (-1082) in the promoter region of *IL10* gene was associated with susceptibility to celiac disease. Similar results were also obtained by others studies (McManus et al., 1996 and De La Concha et al., 2000).

It has been reported few previous studies that show a relation between single nucleotide polymorphisms (SNPs) at positions -1082 (A>G), -819 (C>T) and -592 (C>A) and CD susceptibility or with the development of certain clinical or immunological features suggesting that these polymorphisms do not represent the causative gene but contribute to modifying the phenotype (Hahn-Zoric et al., 2003; Woolley et al., 2005; Nunez, 2006; Ortiz et al., 2006; Lio et al., 2005; Kekik et al., 2011).

In a study of case-control, carried out by Concepcion *et al* (2006), the distribution of CCG/ACA/ATA/ATG haplotypes frequencies distributions from the promoter region of the *IL10* gene (-592C>A/-819C>T/-1082A>G, respectively) did not show any association with celiac disease. Similar results were also reported by Garrote et al. (2005) when analyzing a Spanish celiac population compared with healthy individuals. They found an increase in the frequency of the GCC promoter

haplotype when DQ2-positive patients were compared to DQ2-negative patients. Furthermore, was reported a significant high frequency of GCC haplotype in celiac patients with DQB1*0218. Our analyses are in agreement with these findings once the haplotype frequency distribution of the promoter region IL10 gene revealed no statistical significant differences.

The GCC haplotype has been described as a high producer of IL10 and the ACC/ATA are cited as lower producers of this cytokine in some populations (Fernandes et al., 2008; Wooley et al., 2005). However, Edgardo *et al.* (2006) has reported that low levels of production of IL10 stimulate the clonal proliferation of intraepithelial lymphocytes in the intestinal mucosa of celiac Argentine individuals. This process is crucial to the inflammatory changes triggered by exposure to gluten in genetically susceptible individuals. Thus, we suggest the hypothesis that the interaction SNPs from IL10 gene promoter region makes up the genetic background and may be more involved in the developing of intestinal inflammatory characteristics triggered by gluten than conferring risk for celiac disease in this population.

The pivotal role of IL-10 in the development of the celiac lesion is also supported in a recent paper by Salvati et al. (2005) which demonstrated that IL-10 was able to inhibit the cytokine production triggered by gliadin in duodenal biopsies of CD patients.

There have been many studies that found genetic associations of polymorphisms in the promoter region of *IL10* gene with others inflammatory diseases, like rheumatoid arthritis (Ying et al, 2011, Alfonso M. *et al.*, 2004), type 1 diabetes (Ide et al., 2002), systemic lupus erythematosus (D' Alfonso et al., 2002), inflammatory bowel diseases (Castro-Santos et al., 2006; Santhosh et al., 2010), cancer (Zabaleta et al. 2008) and periodontal disease (Claudino et al., 2008). This way, we suggest that additional studies evaluating the promoter region of IL10 gene as a candidate region involved in the inflammatory background of the celiac disease can be approached for better clarify this mechanism.

We also propose that further studies should be conducted in the research in different populations in order to establish allelic characteristics of different populations.

References

- Leon AJ, Garrote JA, Blanco-Quiros A, Calvo C, Fernandez-Salazar L, Del Villar A, Barrera A, Arranz E. Interleukin 18 maintains a long-standing inflammation in coeliac disease patients. *Clin Exp Immunol*. 2006;146(3):479-485.
- Troncone R, Bhatnagar S, Butzner D, Cameron D, Hill I, Hoffenberg E, et al. Celiac disease and other immunologically mediated disorders of gastrointestinal tract: working group report of the second world congress of pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition. *J Ped Gastroenterol Nutr* 2004; 39(Suppl. 2):S601-10
- Lamireau T, Clouzeau H. Epidemiology of celiac disease. *Pathol Biol (Paris)*; 2011; 61(2):1-4.
- Volta U, Bellentani S, Bianchi FB, Brandi G, De Franceschi L, Miglioli L, Granito A, Balli F, Tiribelli C. High prevalence of celiac disease in Italian general population. *Dig Dis Sci* 2001; 46:1500-5.
- Catassi C, Fabiani E, Ratsch IM, Coppa GV. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for celiac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr* 1996;412(Suppl):29- 35.
- Kurppa K, Collin P, Viljamaa M, Haimila K, Saavalainen P, Partanen J, Laurila K, Huhtala H, Paasikivi K, Mäki M, Kaukinen K. Diagnosing mild enteropathy celiac disease: a randomized, controlled clinical study. *Gastroenterology* 2009; 136: 816-823
- Latiano A, Mora B, Bonamico M, Megiorni F, Mazzilli MC, Cucchiara S, Palmieri O, Valvano MR, Annese V. Analysis of candidate genes on chromosomes 5q and 19p in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007; 45: 180-186
- Greco L, Percopo S, Clot F, Bouguerra F, Babron MC, Eliaou JF et al. Lack of correlation between genotype and phenotype in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1998; 26: 286-290
- Van Heel DA, Hunt K, Greco L, Wijmenga C. Genetics in coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2005; 19: 323-339

King AL, Ciclitira PJ. Celiac disease: strongly heritable, oligogenic, but genetically complex. *Molecular Genetic Metabolism*. 2000; 71(1-2): 70-75.

Westerhom-Ormi, M, Garioch J, Ketola I, Savilahti E. Inflammatory cytokines in small intestinal mucosa of patients with potential coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 2002; 128: 94ñ101.

León JA, Garrote JA, Arranza E. Citocinas en la patogenia de la enfermedad celíaca. *Med Clin (Barc)*. 2005;125(13):508-16

MacDonald TT, Bajaj-Elliott M, Pender SL. T cells orchestrate intestinal mucosal shape and integrity. *Immunol Today*. 1999; 20: 505-510.

Reynard MP, Turner D, Navarrete CV. Allele frequencies of polymorphisms of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-2 genes in a North European Caucasoid group from UK. *Eur J Immunogenet* 2000; 27:241ñ9.

Bidwell J, Keen L, Callagher G, Kimberly R, Huizinga T, Mc Dermott MF, et al. Cytokine gene polymorphisms in human disease: on-line database. *Genes Immun* 1999;1:3ñ19.

De la Concha EG, Fernandez-Arcquero M, Vigil P, Rubio A, Maluenda C, Polanco I, et al. Celiac disease and TNF promoter polymorphisms. *Hum Immunol* 2000; 61:513ñ7.

Ying B, Shi Y, Pan X, Song X, Huang Z, Niu Q, Cai B, Wang L. Association of polymorphisms in the human IL-10 and IL-18 genes with rheumatoid arthritis. *Mol Biol Rep*. 2011; 38(1): 379-385.

Wang AH, Lam WJ, Han DY, Ding Y, Hu R, Fraser AG, Ferguson LR, Morgan AR. The effect of IL-10 genetic variation and interleukin 10 serum levels on Crohn's disease susceptibility in a New Zealand population. *Hum Immunol*. 2011; 72(5): 431-435.

Hahn-Zoric M, Hytonen AM, Hanson LA, Nilsson LA, Padyukov L. Association of -1087 IL10 and -308 TNFA gene polymorphisms with serological markers of coeliac

disease. *J Clin Immunol* 2003 ; 23(4): 291-296.

Nunez C, Alecsandru D, Varade J, Polanco I, Maluenda C, Fernandez-Arquero M, de la Concha EG, Urcelay E and Martinez A Interleukin-10 haplotypes in celiac disease in the Spanish population. *BMC Med Genet* (2006) 7,32ñ36.

Garrote, JA, Arranz E, Gómez-González E, León AJ, Farré C, Calvo C, Bernardo D, Fernández- Salazar L, Blanco-Quirós A. IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in coeliac disease: differences between DQ2 positive and negative patients. *Allergol et Immunopathol* 2005;33(5):245- 9.

Woolley N, Mustalahtiy MM, Partanen J. Cytokine Gene Polymorphisms and Genetic Association with Coeliac Disease in the Finnish Population. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2005; 61: 51ñ56

Barisani D, Ceroni S, Meneveri R, Cesana BM, Bardella MT. IL-10 polymorphisms are associated with early-onset celiac disease and severe mucosal damage in patients of Caucasian origin. *Genet Med* 2006;8(3):169ñ174.

Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for the diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990; 65:909-11.

Jarvinen TT; Collin P, Rasmussen M et al., Villous tip intraepithelial lymphocytes as markers of early-stage coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 2004; 39:428-33

Xavier S, Elisabet G, Joan V, Raquel I and Víctor M. SNPStats: a web tool for the analysis of association studies. *Bioinformatics*, 2006; 22,(15): 1929-1929.

Crawley E, Kay R, Sillibourne J. et al. Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1101ñ1108.

Eskdale, J.; Keijzers, V.; Huizinga, T.; Gallagher, G. Microsatellite Alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. *Genes Immun.*, 1999; 1: 151-155.

Eskdale, J.; Kube, D.; Tesch, H.; Gallagher, G. Mapping of the human IL10 gene and further characterization of the 5' flanking sequence. *Immunogenetics*, 1997; 46:120-128

Eskdale J, Wordsworth P, Bowman S, Gallagher FG. Associations Between polymorphisms at the human IL-10 locus and systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*, 1997; 49:635-639.

Fernandes APM, Gonçalves MAG, Simões RT, Mendes-Junior CT, Duarte G, Donadi EA. A pilot case-control association study of cytokine polymorphisms in Brazilian women presenting with HPV-related cervical lesions. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2008;140: 241-244.

Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun*. 2000;1(3):185-90.

Rad R, Dossumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, Gerhard M, Prinz C. Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during *Helicobacter pylori* infection. *Gut* 2004;53:1082-1089.

Cataldo F., Lio D., Marino V., Scola L., Crivello A., Mulè A.M., Corazza G.R.; Groups of the SIGEP and "Club del Tenue". Cytokine genotyping (TNF and IL-10) in patients with celiac disease and selective IgA deficiency. *The American Journal of Gastroenterology*. 2003;98(4):850-6.

Lio D, Scola L, Forte GI, Accomando S, Giacalone A, Crivello A et al. TNF, IFN and IL-10 gene polymorphisms in a sample of Sicilian patients with coeliac disease. *Digestive and Liver Disease* 2005; 37: 756-60.

McManus R, Moloney M, Borton M, Finch A, Chuan YT, Lawlor E, Weir DG, Kelleher D. Association of celiac disease with microsatellite polymorphisms close to the tumor necrosis factor genes. *Hum Immunol*. 1996;45(1):24-31.

De la Concha EG, Fernandez-Arcquero M, Vigil P, Rubio A, Maluenda C, Polanco I, et al. Celiac disease and TNF promoter polymorphisms. *Hum Immunol* 2000; 61:513ñ7.

Ortiz J, Fernández-Arquero M, Urcelay E, López-Mejías R, Ferreira A, Fontán G, de la Concha EG, Martínez A. Interleukin-10 polymorphisms in Spanish IgA deficiency patients: a case-control and family study. *BMC Med Genet*. 2006; 7: 56.

Kekik G, Oğuz FS, Karahan GE, Seyhun Y, Aslan E, Bayramiçli OU. IL-10 and TNF-alpha Gene Polymorphisms in Patients with Celiac Disease. *Turk J Immunol*. 2011; 16: 11-6.

Concepción N, Diana A, Jezabel V, Isabel P, Carlos Maluenda, Miguel FA, Emilio GC, Elena U, Alfonso M. Interleukin-10 haplotypes in Celiac Disease in the Spanish population. *BMC Medical Genetics* 2006; 7:32.

Edgardo C. Kolkowski, Marco A. Fernández, Ricardo Pujol-Borrell, Dolores Jaraquemada. Human intestinal IEL clones in celiac disease show reduced IL-10 synthesis and enhanced IL-2 production. *Cellular Immunology*, 2006; 244: 1ñ9.

Salvati VM, Mazzarella G, Gianfrani C, Levings MK, Stefanile R, De Giulio B, Iaquinto G, Giardullo N, Auricchio S, Roncarolo MG, et al. Recombinant human interleukin 10 suppresses gliadin dependent T cell activation in ex vivo cultured coeliac intestinal mucosa. *Gut*. 2005;54:46ñ 53

Alfonso M, Marina S, Gema B, Dora PS, Miguel FA, Sonia M, Alejandro B, de la Concha G, Benjamin FG. Association of the major histocompatibility complex with response to infliximab therapy in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Rheum*. 2004;50(4):1077ñ1082.

Ide A, Kawasaki E, Abiru N, Sun F, Takahashi R, Kuwahara H, Fujita N, Kita A, Oshima K, Sakamaki H, Uotani S, Yamasaki H, Yamaguchi Y, Eguchi K. Genetic association between interleukin-10 gene promoter region polymorphisms and type 1 diabetes age-at-onset. *Hum Immunol*. 2002;63(8):690-5.

D' Alfonso S, Giordano M, Mellai M, Lanceni M, Barizzzone N, Marchini M, Scorza R, Danieli MG, Cappelli M, Rovere P, Sabbadini MG, Momigliano-Richiardi P.

Association tests with systemic lupus erythematosus (SLE) of IL10 markers indicate a direct involvement of a CA repeat in the 5' regulatory region. *Genes Immun.* 2002;3(8):454-63.

Castro-Santos P, Suarez A, López-Rivas L, Mozo L, Gutierrez C. TNFalpha and IL-10 gene polymorphisms in inflammatory bowel disease. Association of -1082 AA low producer IL-10 genotype with steroid dependency. *Am J Gastroenterol.* 2006;101(5):1039-47.

Santhosh S, Dutta AK, Samuel P, Joseph AJ, Ashok JK, Kurian G. Cytokine gene polymorphisms in Irritable bowel syndrome in Indian population - A pilot case control study. *Tropical Gastroenterology* 2010;31(1):30ñ33

Zabaleta J, Lin HY, Sierra RA, Hall MC, Clark PE, Sartor OA, Hu JJ, Ochoa AC. Interactions of cytokine gene polymorphisms in prostate cancer risk. *Carcinogenesis.* 2008;29(3):573-578.

Claudino M, Trombone AP, Cardoso CR, Ferreira SB Jr, Martins W Jr, Assis GF, Santos CF, Trevilatto PC, Campanelli AP, Silva JS, Garlet GP. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. *J Leukoc Biol.* 2008;84(6):1565-73.

7.2 ARTIGO 2 - Association of HLA-DQ8/DQ2 and polymorphisms in the cytokines genes TNF- α and IL-6, in susceptibility to celiac disease in Italian patients

AUTORES: F.A. Martins Esteves, Maranhão, R.M.A, S. Crovella, Maia, M.M.D, P.R.E Souza

Artigo aceito pela Genetics and Molecular Research Qualis: B2 em Ciências Biológicas I

Running title: TNF- α and IL-6 gene *polymorphisms* and celiac disease

F.A. Martins Esteves^{2,4}, R.M. de Albuquerque Maranhão¹, S. Crovella^{2,4,5}, L. Segat⁵ and P.R. Eleutério Souza³

¹Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco (ICB/UPE), Recife, Pernambuco, Brazil

²Department of Genetics, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

³Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, Pernambuco, Brazil

⁴Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife, Pernambuco, Brazil

⁵Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico (IRCCS) materno infantile Burlo Garofolo, Trieste, Italy

Corresponding author:

Fabricio Andrade Martins Esteves.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 ñ Cidade Universitária, Recife-PE. CEP: 50670- 901 Recife, PE, Brazil

Tel: (+55) 81-87101610

Fax: (+55) 81-2126.8485

E-mail address: andrade.fab@gmail.com

ABSTRACT

The aim of this work was to study polymorphisms in the genes encoding of the cytokines like interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in patients with celiac disease (CD) antigens DQ2 (DQ2-positive) or antigen DQ8 (DQ8 - positive). We, and compared these results with healthy controls in order to determine whether any of these polymorphisms have a role in susceptibility to CD celiac disease. A case-control of 192 patients with CD (96 DQ2-DQ8-positive and 96 DQ8-positive) and 96 healthy controls from northeast Italy were included in the study. Analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) was carried out using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. Significant differences for the TNF- α (-308 G>A) polymorphism were observed when we compared the following groups: DQ2-positive with controls (odds ratio (OR) = 0.45, P = 0.0002); DQ8-positive with controls (OR = 3.55, P < 0.0001); and DQ2-positive with DQ8-positive (OR = 0.12, P < 0.0001). We did not observe a statistically significant association between IL-6 (-174 G>C) polymorphism and CD (P > 0.05). Our results suggest that TNF- α (-308 G>A) polymorphism may play a role in susceptibility to CD in Italian patients.

Key words: Celiac disease; IL-6; TNF- α ; HLA-DQ.

INTRODUCTION

Celiac disease (CD) is an autoimmune condition with strong heritability and is characterized by inflammation of the small intestine (Trynka et al., 2010). The disorder is triggered by the ingestion of a peptide component of dietary gluten, gliadin, and is characterized by villous atrophy of the jejunal mucous membrane, crypt cell hyperplasia, and an increase in intraepithelial lymphocytes (Clot and Babron, 2000). In genetically predisposed individuals, gliadin triggers a cascade of innate and adaptive immune responses and leads to the destruction of the intestinal epithelium and mucosa. This peptide is recognized by cells that present human leukocyte antigen (HLA) class II molecules. Upon activation, macrophages release pro-inflammatory cytokines, which activate intraepithelial lymphocytes and result in the characteristic histologic alterations of CD (Clot and Babron, 2000; Manavalan et al.,

2010). Studies have shown that inflammatory gluten-reactive T cells recognizing gluten selectively in the context of the HLA region (alleles coding the heterodimers HLA-DQ2 or HLA-DQ8) are presented only in the small intestinal mucosa of individuals with CD (Abadie et al., 2011). Pro-inflammatory cytokines are also known to play an important role in disease progression and tissue damage in autoimmune diseases such as multiple sclerosis (Wen et al., 2012), rheumatoid arthritis (Kishimoto, 2006), and systemic lupus erythematosus (Dienz and Rincon, 2009).

Interleukin-6 (IL-6) is a multifunctional pro-inflammatory cytokine that regulates the immune response, hematopoiesis, the acute phase response, and inflammation. IL-6 has been extensively studied in the context of several inflammatory or autoimmune conditions, and different results have been obtained (Dema et al., 2009). Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) is a pro-inflammatory cytokine involved in cellular and inflammatory immune reactions. This cytokine has been implicated in the severity of different immune-regulated diseases including autoimmune and inflammatory diseases, lymphoma, and transplantation (Hajeer and Hutchinson, 2000; Bel Hadj Jrad et al., 2007). The production and/or function of cytokines are at least partially regulated by polymorphisms in their gene sequences (Mosaad et al., 2012). Polymorphisms within the promoter regions of cytokine genes may play a role in the genetically determined production of both T helper cell types 1 and 2 (Th1 and Th2 cells), influencing the susceptibility of a broad spectrum of immune-mediated diseases, including CD (de la Concha et al., 2000).

In CD patients, exposure of the mucosa to gluten stimulates the expression of IL-6 and TNF- α *in vitro* (Nilsen et al., 1998). In addition, serum levels of these interleukins significantly increase in patients with active CD compared with healthy individuals, and decrease only after a year on a gluten-free diet (Clot and Brabon, 2000; Romaldini et al., 2002). In this way, genetic polymorphisms that modify the levels of these cytokines can make an important contribution to susceptibility to CD (de la Concha et al., 2000; Mosaad et al., 2012).

Among the various polymorphisms described, the genetic variant most extensively investigated is located at position -308 (G>A) of the *TNF- α* gene promoter (Hajeer and Hutchinson, 2000). Independent studies have shown that the -308A *TNF* allele has higher transcriptional activity compared with the -308G *TNF* allele (Wilson et al., 1997; Batikhan et al., 2010). When considering the inflammatory conditions of the gastrointestinal tract, a positive association of the -

308A allele has been demonstrated; conversely, the same polymorphism has not been associated with ulcerative colitis (Elahi et al., 2009). The polymorphism at position -174 (G>C) of the *IL-6* gene promoter seems to affect *IL-6* transcription (Ishihara and Hirano, 2002) and IL-6 plasma levels (Dema et al., 2009). For this polymorphism, G/G and G/C genotypes are associated with the production of high levels of IL-6, while the C/C genotype is associated with low levels (Santhosh et al., 2010). However, contradictory results for these interleukin polymorphisms influencing autoimmune inflammatory diseases have been found in different populations (Schotte et al., 2001; Mirowska-Guzel et al., 2011; Angelo et al., 2012; Mosaad et al., 2012).

The purpose of the present study was to evaluate whether both *TNF- α* (-308 G>A) and *IL-6* (-174 G>C) promoter polymorphisms are associated with CD susceptibility in an Italian population. Moreover, a HLA-stratified association analysis among HLA-DQ genes and *IL-6* and *TNF- α* was performed.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

The study group comprised 192 (120 females and 72 males; mean age: 17.08 $\pm$ 15.41 years, range 2–70) patients with CD (96 DQ2-positive and 96 DQ8-positive), and 96 healthy individuals (62 females, 34 males; mean age 27.5.08 $\pm$ 12.45 years, range 18–60). CD patients were enrolled at the Gastroenterology Service of IRCCS Burlo Garofolo (Trieste, Italy). After the evaluation of clinical symptoms, patients were diagnosed on the basis of positivity for both antibody tests: anti-tissue transglutaminase antibodies (anti-tTG) (using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Eu-tTG kit; Eurospital, Trieste, Italy); and anti-endomysial antibodies (EMA) (using the anti-endomysium kit; Eurospital). Molecular typing for HLA was performed using the I-DQ kit (Eurospital) to confirm the serological diagnosis and exclude celiac patients in doubtful cases. An intestinal biopsy was also performed for all CD patients and the presence of histological infiltrative lesion was considered predictive of CD. Both the collection of biological material and the diagnostic tests for the disease were performed at IRCCS Burlo infantile maternal Garofolo, Trieste, Italy. The healthy controls were blood donors from the Transplant Service of the “Ospedale Maggiore” of Trieste (Italy), all were

negative for DQ2 and DQ8 variants, and had negative serology for anti-transglutaminase, anti-gliadin, and anti-endomysial antibodies.

The study was approved by the Research Ethics Committee ñ CEP/UPE in Brazil, with the registry CAEE 0213.0.097.000-11.

DNA extraction

The DNA was extracted from peripheral blood using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA) according to a standard procedure.

Genotyping

IL-6 polymorphism (rs 1800795)

IL-6 polymorphism was detected by polymerase chain reaction (PCR) amplification followed by restriction fragment length polymorphism (RFLP), using PCR primers and amplification conditions, as previously described by Depboylu et al. (2004). For RFLP analysis, 5 µL of the PCR product was digested overnight with 2U of *Hsp92II* restriction enzyme (Promega) in a total volume of 20 µL. The RFLP-generated profile comprised two fragments (244 base pairs (bp), 56 bp) for allele G, and three (133 bp, 111 bp, and 56 bp) for allele C. Approximately 10% of the PCR products were randomly selected for DNA sequencing by a MegaBACE 1000 capillary sequencer (Amersham Pharmacia Biotech).

TNF-α polymorphism (rs 1800629)

Genotyping of *TNF-α* -308 G>A promoter polymorphism was performed by PCR-RFLP, as previously described by Bel Hadj Jrad et al. (2007). For RFLP analysis, 5 µL of the PCR product was digested overnight with 2U *NcoI* restriction enzyme (Promega) in a total volume of 20 µL. The RLFP profile comprised one fragment of 107 bp for allele A, and two fragments of 87 bp and 20 bp for allele G. About 10% of the PCR products were randomly selected for DNA sequencing by a MegaBACE 1000 capillary sequencer (Amersham Pharmacia Biotech) to double-check the PCR-RLFP genotyping results.

Statistical analysis

All genotype groups were tested for Hardy-Weinberg equilibrium for each variant. The chi-square (χ^2) test was used for the calculation of genotypic and allelic frequency. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated between all groups. The differences were considered significant if $P \leq 0.05$. Statistical analyses were performed using BioEstat software 5.0.

RESULTS

Genotype and allele frequency distributions of the TNF- α G>A polymorphism in CD patients (DQ2- and DQ8-positive) and healthy controls are presented in Table 1. No significant difference was observed between CD patients and healthy controls for allelic frequency and genotype.

Table 1: Genotypic and allelic frequency of the TNF- α promoter polymorphism (-308) in patients with celiac disease (CD) (DQ2 and DQ8 groups) and healthy controls, and chi-square test (χ^2) statistics for genotypic and allelic frequency.

	CD patients % (n = 192)	DQ2+ patients % (n = 96)	DQ8+ patients % (n = 96)	Healthy controls % (n = 96)	χ^2	P	OR (95% CI)	P (OR)
Genotypes								
GG (low)	52 (100)	24 (23)	80 (77)	44 (42)	Reference			
GA	33 (63)	49 (47)	17 (16)	48 (46)	$\chi^2_1 = 4.32$	P1 = 0.0377	1.74 (1.029–2.935)	P1 = 0.0519
					$\chi^2_2 = 3.56$	P2 = 0.0001	0.54 (0.279–1.028)	P2 = 0.0847
					$\chi^2_3 = 24.69$	P3 < 0.0001	5.27 (2.665–10.42)	P3 < 0.0001
					$\chi^2_4 = 42.00$	P4 < 0.0001	0.10 (0.0488–0.2119)	P4 < 0.0001
AA (high)	15 (29)	27 (26)	3 (3)	8 (8)	$\chi^2_1 = 0.92$	P1 = 0.3367	0.66 (0.278–1.555)	P1 = 0.4503
					$\chi^2_2 = 15.07$	P2 = 0.0001	0.17 (0.066–0.432)	P2 = 0.0002
					$\chi^2_3 = 5.96$	P3 = 0.0146	4.89 (1.231–19.42)	P3 = 0.0342
					$\chi^2_4 = 42.40$	P4 < 0.0001	0.03 (0.0096–0.1243)	P4 < 0.0001
G	68 (263)	48 (93)	89 (170)	68 (130)	Reference			
A	32 (121)	52 (99)	11 (22)	32 (62)	$\chi^2_1 = 0.77$	P1 = 0.6812	1.04 (0.715–1.503)	P1 = 0.9244
					$\chi^2_2 = 19.43$	P2 < 0.0001	0.45 (0.296–0.678)	P2 = 0.0002
					$\chi^2_3 = 32.39$	P3 < 0.0001	3.55 (2.153–6.307)	P3 < 0.0001
					$\chi^2_4 = 95.97$	P4 < 0.0001	0.12 (0.072–0.206)	P4 < 0.0001

1 = CD patients vs. healthy controls; 2 = DQ2-positive patients vs. healthy controls; 3 = DQ8- positive patients vs. healthy controls; 4 = DQ2-positive patients vs. DQ8-positive patients.

When we parsed the variants of the HLA gene, we observed that the frequency of the G allele was higher in the DQ8 group than in the DQ2 group or in the healthy controls, and the same was true of the A allele in the DQ2 group vs. the DQ8 group or the controls. For both allele A (high producer) and AA genotype, there was a highly significant difference between the DQ2 group and the control group. The DQ8 group showed a high significant difference with the low producer, G allele. Thus, the analysis of the two HLA variants (DQ2 vs. DQ8) showed a high significant difference between them, both allelic and genotypic.

Genotypes and allele frequency distributions of the IL-6-174 C>G polymorphism in CD patients (DQ2- and DQ8-positive) and healthy controls are presented in Table 2.

Table 2: Genotypic and allelic frequency of the IL-6 promoter polymorphism (-174) in patients with celiac disease (CD) (DQ2 and DQ8 groups) and healthy controls, and chi-square test (χ^2) statistics for genotypic and allelic frequency.

	CD patients % (n=192)	DQ2+ patients % (n=96)	DQ8 + patients % (n=96)	Healthy controls % (n=96)	χ^2	P	OR (95% CI)	P (OR)
Genotypes								
GG (high)	52 (99)	49 (47)	54 (52)	43 (41)	Reference			
GC	40 (76)	40 (38)	40 (38)	53 (51)	$\chi^2_1 = 3.48$	P1 = 0.0619	1.62 (0.975–2.694)	P1 = 0.0822
					$\chi^2_2 = 2.03$	P2 = 0.1538	1.54 (0.850–2.784)	P2 = 0.2020
					$\chi^2_3 = 3.18$	P3 = 0.0746	1.70 (0.947–3.060)	P3 = 0.1022
					$\chi^2_4 = 0.11$	P4 = 0.7404	0.90 (0.0497–1.644)	P4 = 0.8582
CC (low)	9 (17)	11 (11)	6 (6)	4 (4)	$\chi^2_1 = 0.95$	P1 = 0.3296	0.57 (0.180–1.792)	P1 = 0.4751
					$\chi^2_2 = 2.07$	P2 = 0.1504	0.42 (0.123–1.410)	P2 = 0.2475
					$\chi^2_3 = 0.06$	P3 = 0.8045	0.85 (0.224–3.196)	P3 = 0.9299
					$\chi^2_4 = 1.72$	P4 = 0.1893	0.49 (0.1691–1.4374)	P4 = 0.2937
G	71 (274)	69 (132)	74 (142)	69 (133)	Reference			
C	29 (110)	31 (60)	26 (50)	31 (59)	$\chi^2_1 = 0.27$	P1 = 0.6047	1.11 (0.757–1.613)	P1 = 0.6740
					$\chi^2_2 = 0.01$	P2 = 0.9121	0.98 (0.633–1.504)	P2 = 1.0000
					$\chi^2_3 = 1.04$	P3 = 0.3084	1.26 (0.806–1.966)	P3 = 0.3652
					$\chi^2_4 = 1.27$	P4 = 0.2590	0.77 (0.4970–1.2075)	P4 = 0.3097

1 = CD patients vs. healthy controls; 2 = DQ2-positive patients vs. healthy controls; 3 = DQ8- positive patients vs. healthy controls; 4 = DQ2-positive patients vs. DQ8-positive patients.

In the CD group, for both DQ2 and DQ8 variants the frequency of the G allele was much greater than that of the C allele. The same was observed in the control group. When we examined the genotypic frequencies, the GC and GG genotypes were at higher frequency than the CC genotype.

The results of statistical analysis did not show significant differences between the CD patients and the healthy controls for both genotypic and allelic frequencies.

When we compared the groups DQ2 vs. healthy controls, DQ8 vs. healthy controls, or DQ2 vs. DQ8, for allelic and genotypic frequencies, no significant differences were found.

DISCUSSION

Celiac disease is a complex disorder and genetic factors play an important role in the development of the condition; the most important genetic risk factors that have been studied are the HLA class II genes (Trynka et al., 2010). It is believed that HLA is necessary for the development of CD, but further investigation is required. Expression of HLA-DQ accounts for up to 40% of the genetic component of this disorder, of which 40–90% of patients with CD express the HLA-DQ2 heterodimer; the small proportion that do not express it are HLA-DQ8-positive. Therefore, other factors must be involved in the development of the disease, such as genes coding for several molecules related to the immune system response, which have been implicated in CD susceptibility (Garrote et al., 2005; Trynka et al., 2010).

Several studies have indicated that the HLA region might contain an additional genetic factor that affects disease susceptibility independently of the DQ genes (Woolley et al., 2005). Since the *TNF- α* gene has been located on chromosome 6, within the major histocompatibility complex (MHC) and between HLA class I and II regions, there has been much speculation concerning a genetic association between *TNF- α* polymorphisms, TNF production, immunologic response, and susceptibility to disease (Cataldo et al., 2003). Some polymorphisms in the promoter region of the gene for *TNF- α* have been associated with the development of the disease (Angelo et al., 2012), but the allele -308A is the most reported, inducing, especially in homozygosis, higher levels of *TNF- α* transcription and facilitating the inflammatory response to gluten (Kroeger et al., 2000). In the present study, allelic distribution of the *TNF- α* promoter region (-308) polymorphism did not show a significant difference between celiac patients and the control group ($P = 0.9244$). Similarly, Kekik et al. (2011) did not find an association in a Turkish population ($P > 0.05$).

When we analyzed separately the distribution of allelic frequencies, as DQ2-positive patients vs. the control group, DQ8-positive patients vs. the control group, or DQ2-positive vs. DQ8-positive patients, significant differences were observed. These results suggest that DQ2- positive and DQ8-positive patients together show a

difference in the modulation of CD susceptibility. This can be seen in the high frequency of allele A in DQ2-positive patients and the high frequency of allele G in DQ8-positive patients (Table 1).

Moreover, several studies have found a relationship between the *TNF- α* rs1800629 allele A and susceptibility to CD (de la Concha et al., 2000; Lio et al., 2005), as well as other inflammatory and autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (Angelo et al., 2012) and type 1 diabetes (Garrote et al., 2002). In our study, a higher difference in the frequency of the allele A (high producer) was observed when we compared DQ2-positive CD patients with the healthy controls. However, different results were observed when we compared DQ2-positive patients with DQ8-positive patients for both allelic and genotypic frequencies. Supporting our results, Garrote et al. also found in a Spanish population an increased frequency of the *TNF- α* -308A allele within the group of DQ2-positive patients with respect to DQ2-negative cases, suggesting the allele A as an additional risk marker for susceptibility to CD in DQ2-positive individuals (Cherňavský et al., 2008).

To date, most studies associating the *TNF- α* -308A polymorphism have been conducted on DQ2-positive individuals (McManus et al., 1996; Capilla et al., 2007; Henderson et al., 2007), whereas studies associating the *TNF- α* -308 polymorphism only with DQ8-positive patients have not yet been performed. Nevertheless, Garrote et al. (2005) reported that 10% of CD patients express the DQ8 heterodimer with a similar ability to link gluten peptides or other heterodimers that share one of the chains with DQ2, but they usually do not carry the *TNF-308A* allele.

This feature was also found in our study, where 89% of DQ8-positive individuals had the G allele, whereas only 11% had the A allele. The frequency of individuals carrying the GG genotype for *TNF- α* (-308) polymorphism was different among DQ2-positive vs. healthy controls, and DQ8-positive vs. healthy controls. As a result, the frequency of individuals carrying the GA genotype was different among DQ8 positive vs. healthy controls. Thus, the GG genotype could confer protection from CD in DQ2-positive patients. In contrast, GG and GA genotypes could cause susceptibility to CD in DQ8-positive patients.

It is important to note that studies involving the relationships of HLA-DQ refer mainly to HLA-DQ2. Consequently, more is known about HLA-DQ2-associated CD than HLA-DQ8-associated CD (Henderson et al., 2007). Therefore, studies stratifying CD patients into DQ2 and DQ8 variants are less frequent.

To our knowledge, this is the first study that has looked specifically at a group of DQ8- positive patients in relation to polymorphism in the TNF- α gene. Unfortunately, it was not possible to obtain information about the same distribution of polymorphism in other populations. Here, we observed a higher frequency of the G allele (low producer) in individuals carrying HLA-DQ8 than in those carrying HLA-DQ2, suggesting this allele may be an additional risk marker for CD in DQ8-positive patients.

Another gene encoding molecules involved in the immune system and possibly involved in susceptibility to CD is the gene encoding for interleukin-6, a cytokine essential for regulation of the immune process. Moreover, overproduction of this cytokine leads to inflammation and has been correlated with inflammatory autoimmune diseases (Kishimoto, 2006). Some polymorphisms in the promoter region of the gene for *IL-6* have been studied, but the polymorphism at position -174 is one of the most important, according to the literature, since it affects *IL-6* expression (Barisani et al., 2006). This polymorphism has been investigated in a variety of diseases, such as pemphigus (Mosaad et al., 2012), multiple sclerosis (Mirowska-Guzel et al., 2011), and CD (McManus et al., 1996; Depboylu et al., 2004; Dema et al., 2009).

In our study, genotypic and allelic distributions for polymorphism at position -174 of the *IL-6* gene promoter showed no significant difference between celiac patients vs. the healthy control group. The same results were observed in previous studies in Italian (McManus et al., 1996) and Spanish populations (Dema et al., 2009). Furthermore, studies relating this polymorphism to other inflammatory and autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (Schotte et al., 2001) and rheumatoid arthritis (Arman et al., 2011), also did not show a relationship to the development of the disease.

In contrast, Garrote et al. showed that the ancestral allele G (higher producer) in DQ2- negative patients was associated with the development of CD compared with both the control group and the DQ2-positive patients (Garrote et al., 2005). The relationship between the G allele and susceptibility to diseases was also observed for irritable bowel syndrome (Barkhordari et al., 2010) and lupus erythematosus (Hamdy et al., 2012). We also evidenced higher frequencies of the GG and GC genotypes, as well as the G allele in the region -174 of the *IL-6* gene in both CD patients and healthy controls, but these differences were not significant. The same results were

found by Abbas et al. (2011) in a study on systemic lupus erythematosus in an Egyptian population. However, Mirowska-Guzel et al. (2011) found an association of the allele C (low producer) with the development of sclerosis in a Polish population ($P < 0.00001$), showing that the polymorphism in the region -174 of the *IL-6* gene varies depending on the population studied.

When we analyzed the -174 G>C *IL-6* polymorphism according to HLA gene variants (DQ2 and DQ8) for DQ2-positive vs. the control group, DQ8-positive vs. the control group, and DQ2- positive vs. DQ8-positive, no significant differences were found (Table 2). As with *TNF- α* , the influence of *IL-6* polymorphisms in celiac HLA-DQ8 individuals has not yet been disclosed.

In conclusion, our findings suggest that *TNF- α* rs1800629 allele A possibly influences CD susceptibility in DQ2-positive patients, and *TNF- α* rs1800629 allele G may be considered an additional risk marker for CD susceptibility in DQ8-positive patients.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), the Foundation to Support Science and Technology in the State of Pernambuco (FACEPE), and the Coordination Enhancement Senior Staff (CAPES).

REFERENCES

- Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB and Jabri B (2011). Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 29: 493-525.
- Abbas D, Hamdy E and Helal MM (2011). Promoter region polymorphism (-174 G/C) of interleukin-6 gene and SLE; are they associated? *The Egyptian Rheumatologist.* 33: 69-75.
- Angelo HD, da Silva HA, Asano NM, Muniz MT, et al. (2012). Tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism -308 G/A in Brazilian patients with systemic lupus erythematosus. *Hum. Immunol.* 73: 1166-1170.
- Arman A, Coker A, Sarioz O, Inanc N, et al. (2011). Lack of association between *IL-6* gene polymorphisms and rheumatoid arthritis in Turkish population. *Rheumatol. Int.* 32: 2199-2201.

- Barisani D, Ceroni S, Meneveri R, Cesana BM, et al. (2006). IL-10 polymorphisms are associated with early-onset celiac disease and severe mucosal damage in patients of Caucasian origin. *Genet. Med.* 8: 169-174.
- Barkhordari E, Rezaei N, Ansaripour B, Larki P, et al. (2010). Proinflammatory cytokine gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. *J. Clin. Immunol.* 30: 74-79.
- Batikhan H, Gokcan MK, Beder E, Akar N, et al. (2010). Association of the tumor necrosis factor- α -308 G/A polymorphism with nasal polyposis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 267: 903-908.
- Capilla A, Donat E, Planelles D, Espinós C, et al. (2007). Genetic analyses of celiac disease in a Spanish population confirm association with CELIAC3 but not with CELIAC4. *Tissue Antigens* 70: 324-329.
- Cataldo F, Lio D, Marino V, Scola L, et al. (2003). Cytokine genotyping (TNF and IL-10) in patients with celiac disease and selective IgA deficiency. *Am. J. Gastroenterol.* 98: 850-856.
- Cherňavsky AC, Páez MC, Periolo N, Correa P, et al. (2008). The simultaneous presence of IL-1B and TNFA two-positions risk haplotypes enhances the susceptibility for celiac disease. *Cytokine.* 42: 48-54.
- Clot F and Babron MC (2000). Genetics of celiac disease. *Mol. Genet. Metab.* 71: 76-80.
- Dema B, Martínez A, Fernández-Arquero M, Maluenda C, et al. (2009). The IL6-174G/C polymorphism is associated with celiac disease susceptibility in girls. *Hum. Immunol.* 70: 191-194.
- Depboylu C, Lohmüller F, Gocke P, Du Y, et al. (2004). An interleukin-6 promoter variant is not associated with an increased risk for Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 17: 170- 173.
- Dienz O and Rincon M (2009). The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clin. Immunol.* 130: 27-33.
- Elahi MM, Asotra K, Matata BM and Mastana SS (2009). Tumor necrosis factor α -308 gene locus promoter polymorphism: An analysis of association with health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1792: 163-172.
- Garrote JA, Arranz E, Tellería JJ, Castro J, et al. (2002). TNF α and LT α gene polymorphisms as additional markers of celiac disease susceptibility in a DQ2-positive population. *Immunogenetics.* 54: 551-555.
- Garrote JA, Arranz E, Gómez-González E, León AJ, et al. (2005). IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in coeliac disease: differences between DQ2 positive and negative patients. *Allergol. Immunopathol. (Madr).* 33: 245-249.
- Hajeer AH and Hutchinson IV (2000). TNF- α gene polymorphism: clinical and biological implications. *Microsc. Res. Tech.* 50: 216-228.
- Hamdy E, Afify RAA, Kamal A, Abbas D, et al. (2012). IL-6 promoter polymorphism

(-174G/C) and systemic lupus erythematosus. *Comp. Clin. Pathol.* 21: 975-979.

Henderson KN, Tye-Din JA, Reid HH, Chen Z, et al. (2007). A structural and immunological basis for the role of human leukocyte antigenDQ8 in celiac disease. *Immunity*. 27: 23-34.

Ishihara K and Hirano T (2002). IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13: 357-368.

Bel Hadj Jrad B, Chatti A, Laatiri A, Ahmed SB, et al. (2007). Tumor necrosis factor promoter gene polymorphism associated with increased susceptibility to non-Hodgkin's lymphomas. *Eur. J. Haematol.* 78: 117-122.

Kekik G, Oğuz FS, Karahan GE, Seyhun Y, et al. (2011). IL-10 and TNF-alpha gene polymorphisms in patients with celiac disease. *Turk. J. Immunol.* 16: 11-16.

Kishimoto T (2006). Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res. Ther.* 8: 1-6.

Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA and Abraham LJ (2000). Effects of stimulus and cell type on the expression of the -308 tumour necrosis factor promoter polymorphism. *Cytokine*. 12: 110-119.

de la Concha EG, Fernández-Arquero M, Vigil P, Rubio A, et al. (2000). Celiac disease and TNF promoter polymorphisms. *Hum. Immunol.* 61:513-517.

Lio D, Scola L, Forte GI, Accomando S, et al. (2005). TNF α , IFN γ and IL-10 gene polymorphisms in a sample of Sicilian patients with coeliac disease. *Dig. Liver Dis.* 37: 756-760.

Manavalan JS, Hernandez L, Shah JG, Konikkara J, et al. (2010). Serum cytokine elevations in celiac disease: association with disease presentation. *Hum. Immunol.* 71:50-57.

McManus R, Wilson AG, Mansfield J, Weir DG, et al. (1996). TNF2, a polymorphism of the tumour necrosis- α gene promoter, is a component of the celiac disease major histocompatibility complex haplotype. *Eur. J. Immunol.* 26: 2113-2118.

Mirowska-Guzel D, Gromadzka G, Mach A, Czlankowski A, et al. (2011). Association of IL1A, IL1B, ILRN, IL6, IL10 and TNF- α polymorphisms with risk and clinical course of multiple sclerosis in a Polish population. *J. Neuroimmunol.* 236: 87-92.

Mosaad YM, Fathy H, Fawzy Z and El-Saied MA (2012). Tumor necrosis factor- α -308 G>A and interleukin-6 -174 G>C promoter polymorphisms and pemphigus. *Hum. Immunol.* 73: 560-565.

Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, et al. (1998). Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology* 115: 551-563.

Romaldini CC, Barbieri D, Okay TS, Raiz R Jr, et al. (2002). Serum soluble interleukin-2 receptor, interleukin-6, and tumor necrosis factor- α levels in children with celiac disease: response to treatment. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 35: 513-

517.

Santhosh S, Dutta AK, Samuel P, Joseph AJ, et al. (2010). Cytokine gene polymorphisms in irritable bowel syndrome in Indian population -- a pilot case control study. *Trop. Gastroenterol.* 31: 30-33.

Schotte H, Schlüter B, Rust S, Assmann G, et al. (2001). Interleukin-6 polymorphism (-174 G/C) in Caucasian German patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 40: 393- 400.

Trynka G, Wijmenga C and van Heel DA (2010). A genetic perspective on celiac disease. *Trends Mol. Med.* 16: 537-550.

Wen SR, Liu GJ, Feng RN, Gong FC, et al. (2012). Increased levels of IL-23 and osteopontin in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 244: 94-96.

Wilson AG, Symons JA, McDowell TL, McDevitt HO, et al. (1997). Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 3195-3199.

Woolley N, Mustalahti K, Mäki M and Partanen J. (2005). Cytokine Gene Polymorphisms and Genetic Association with Coeliac Disease in the Finnish Population. *Scand. J. Immunol.* 61: 61-66.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma vez que não foram observadas diferenças significativas entre as frequências dos polimorfismos da região promotora do gene da IL-10 (posições -1082G>A, -819C>T e -592C>A), sugerimos que novos estudos sejam realizados associando estes polimorfismos com o grau de lesão tecidual em indivíduos celíacos. A análise de haplótipos da região promotora desta citocina demonstrou que, na população estudada, não houve associação que pudesse sugerir uma participação imunomoduladora da IL-10 na Doença celíaca. Contudo, por ter um caráter anti- inflamatório, a IL-10 poderia eventualmente desempenhar algum papel no tipo de forma clínica da Doença celíaca. Ou seja, indivíduos com haplótipos de baixa produção de IL-10 estariam mais susceptíveis a apresentar as formas mais graves dessa enteropatia imunomediada. O polimorfismo - 174G>C do promotor da IL-6 poderia, dentro deste mesmo espectro modular o grau de lesão tecidual a nível intestinal, desencadeado por indivíduos celíacos. Sugerimos também que o polimorfismo da região promotora do gene do TNF-alfa (posição -308G>A) possa estar envolvido na imunopatogênese do mecanismo inflamatório desencadeado pela exposição alimentar ao glúten em italianos portadores da Doença celíaca.

REFERÊNCIAS

- ABUZAKOUK, M. et al. Serological screening for celiac disease in healthy 2.5 year-old children in Sweden. **Pediatrics**, Evanston, v. 107, p. 42-45, 2001.
- ACCOMANDO, S.; CATALDO, F. The global village of celiac disease. **Dig. liver dis.**, Roma, v. 36, p. 492-498, 2004.
- AHMED, H. H. et al. Association between TNF promoter -308 G>A and LTA 252 A>G polymorphisms and systemic lupus erythematosus. **Mol. biol. rep.**, [S. l.], v. 41, n. 4, p. 2029-2036, 2014.
- ALAMARTINE, E. et al. Interleukin-10 promoter polymorphisms and susceptibility to skin squamous cell carcinoma after renal transplantation. **J. invest. derm.**, [S. l.], v. 120, p. 99-103, 2003.
- ALLER, R. et al. G308A polymorphism of TNF-alpha gene is associated with insulin resistance and histological changes in non alcoholic fatty liver disease patients. **Ann. hepatol.**, México, v. 9, n. 4, p. 439-444, 2010.
- ANTUNES, H. First study on the prevalence of celiac disease in a Portuguese population. **J. pediatr. gastroenterol. nutr.**, New York, v. 34, p. 240, 2002.
- ARENTZ-HANSEN, H. et al. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. **J. exp. med.**, New York, v. 191, p. 603-612, 2000.
- BAPTISTA, M. L. Doença celíaca: uma visão contemporânea. **Pediatria**, São Paulo, v. 28, p. 262-271, 2006.
- BOULANGER, M. J. et al. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. **Science**, Washington, v. 301, p. 2101-2104, 2003.
- BROPHY, K. et al. Evaluation of 6 candidate genes on chromosome 11q23 for coeliac disease susceptibility: a case control study. **BMC med. genet.**, London, v. 11, p. 76, 2010.
- CARLSSON, A. K. et al. Serological screening for celiac disease in healthy 2.5 year-old children in Sweden. **Pediatrics**, Evanston, v.107, p. 42-45, 2001.
- CATALDO, F. et al. Cytokine genotyping (TNF and IL-10) in patients with celiac disease and selective IgA deficiency. **Am. j. gastroenterol.**, New York, v. 98, n. 4, p. 850-856, 2003.
- CATASSI, C. et al. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for celiac disease in school-age subjects. **Acta paediatr.**, Stockholm, v. 412, p. 29-35, 1996. Suplemento.
- _____. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? **Lancet**, London, v. 354, p. 647-648, 1999.

DAUM, S. et al. In-creased expression of mRNA for matrix metalloproteinases-1 and -3 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in intestinal biopsy specimens from patients with coeliac disease. **Gut.**, London, v. 44, p. 17-25, 1999.

DE GROOF, F. et al. Acute stress response in children with meningococcal sepsis: important differences in the growth hormone/insulin-like growth factor I axis between nonsurvivors and survivors. **J. clin. endocr. metab.**, [S. l.], v. 87, p. 3118-3124, 2002.

DE LA CONCHA, E. G. et al. Celiac disease and TNF promoter polymorphisms. **Hum. immunol.**, New York, v. 61, n. 5, p. 513-521, May 2000.

_____. Celiac disease: etiology and susceptibility. **An. Real Acad. Nac. Med.**, Madri, v. 124, n. 4, p. 813-824, 2007.

DI SABATINO, A. et al. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. **Gut.**, London, v. 55, n. 4, p. 469-477, 2006.

DIETERICH, W. et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac di-sease. **Nat. med.**, New York, v. 3, p. 797-801, 1997.

DINARELLO, C. A. IL-18: a TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. **J. allergy clin. immunol.**, St. Louis, v. 103, p. 11-24, 1999.

DJILALI-SAIAH, I. et al. CTLA-4 gene polymorphism is associated with predisposition to coeliac disease. **Gut.**, London, v. 43, n. 2, p. 187-189, Aug. 1998.

DUBE, C. et al. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. **Gastroenterology.**, Baltimore, v. 128, n. S57-S67, 2005.

ESKDALE, J. et al. Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. **Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia**, Philadelphia, v. 95, p. 9465-9470, 1998.

ESPOSITO, E.; CUZZOCREA, S. TNF-alpha as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia- reperfusion injury and trauma. **Curr. med. chem.**, Schiphol, v. 16, n. 24, p. 3152-3167, 2009.

FASANO, A. Celiac disease: how to handle a clinical chameleon. **N. England. j. med.**, Boston, v. 348, p. 2568-2570, 2003.

_____. Study of a potentially fatal food-triggered disease has uncovered a process that may contribute to many autoimmune disorders. **Medicine**, [S. l.], p. 54-61, Aug. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/sci-hub.cc/scientificamerican/journal/v301/n2/full/scientificamerican0809-54.html>>. Acesso em: 22 out. 2014.

FASANO, A.; CATASSI, C. Coeliac disease in children. **Best pract. res. clin. Gastroenterol.**, [S. I.], v. 19, p. 467ñ478, 2005.

FASANO, A. et al. Prevalence of celiac disease in at- risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. **Arch. intern. med.**, Chicago, v. 163, n. 286ñ292, 2003.

FERGUSON, A.; ARRANZ, E.; O'MAHONY, S. Clinical and pathological spectrum of celiac disease: active, silent, latent, potencial. **Gut**, London, v. 34, p. 150ñ151, 1993.

FISHMAN, D. et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL- 6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **J. clin. invest.**, New York, v. 102, p. 1369ñ1376, 1998.

FREEMAN, H. J. et al. Recent advances in celiac disease. **World j. gastroenterol.**, Beijing, v. 17, n. 18, p. 2259ñ2272, 2011.

FUNATSU, H. et al. Increased levels of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humor of diabetics with macular edema. **Am. J. Ophthal.**, [S. I.], v. 133, p. 70ñ77, 2002.

GIBSON, A. W. et al. Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. **J. immun.**, [S. I.], v. 166, p. 3915ñ3922, 2001.

GOMEZ, J. C. et al. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. **Am. j. gastroenterol.**, New York, v. 96, p. 2700ñ2704, 2001.

GRECO, L. et al. Genome search in celiac disease. **Am. j. human genetic.**, [S. I.], v. 62, n. 3, p. 669ñ675, 1998.

GUNTHER, C. et al. Caspase-8 regulates TNF-alpha-induced epithelial necroptosis and terminal ileitis. **Nature.**, London, v. 477, p. 335ñ339, 2011.

HILL, I. D. et al. Coeliac disease: Working Group Report of the First World Congress of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. **J. pediatric. gastroenterol. nutr.**, New York, v. 35, p. S78ñS88, 2002. Suplemento.

HOVHANNISYAN, Z. et al. The role of HLA-DQ8 beta-57 polymorphism in the anti-gluten T-cell response in coeliac disease. **Nature.**, London, v. 456, p. 534ñ538, 2008.

JOHNSTON, S. D. et al. Coeliac disease detected by screening is not silent-simply unrecognized. **Quart. J. Med.**, [S. I.], v. 91, p. 853-860, 1998.

KARELL, K. et al. J. Genetic dissection between coeliac disease and dermatitis herpetiformis in sib pairs. **Ann. hum. genet.**, London, v. 66, p. 387ñ392, 2002.

KAWANO, M. et al. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. **Nature.**, London, v. 332, p. 83ñ85, 1988.

KIM, J. M. et al. Structure of the mouse Il-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes. **J. immunol.**, [S. l.], v. 148, p. 3618ñ3623, 1992.

KING, A. L.; CICLITIRA, P. J. Celiac disease: strongly heritable, oligogenic, but genetically complex. **Mol. genet. metab.**, [S. l.], v. 71, n. 1-2, p. 70ñ75, Sep./Oct, 2000. Review.

KING, A. L. et al. CTLA-4/CD28 gene region is associated with genetic susceptibility to coeliac disease in UK families. **J. med. genet.**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 51ñ54, 2002.

KNIGHT, J. C. et al. D. A polymorphism that affects OCT-1 binding to the TNF promoter region is associated with severe malaria. **Nat. genet.**, New York, v. 22, p. 145ñ150, 1999.

KORPONAY-SZABO, I. R. et al. High prevalence of silent celiac disease in pre-school children screened with IgA/IgG antiendomysium antibodies. **J. pediatr. gastroenterol. nutr.**, New York, v. 28, p. 26ñ30, 1999.

KRISTIANSEN, O. P. et al. Association of a functional 17- beta-estradiol sensitive IL6-174G/C promoter polymorphism with early-onset type 1 diabetes in females. **Hum. molec. genet.**, [S. l.], v. 12, p. 1101ñ1110, 2003.

LEÓN, A. J. et al. Interleukin 18 maintains a long-standing inflammation in coeliac disease patients. **Clin. exp. immunol.**, London, v. 146, n. 3, p. 479ñ485, 2006

LEWIS, N. R.; SCOTT, B. B. Meta-analysis: deamidated gliadin peptide antibody and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for coeliac disease. **Aliment. pharmacol. ther.**, Oxford, v. 31, p. 73ñ81, 2010.

LIO, D. S. et al. Inflammation, genetics, and longevity: further studies on the protective effects in men of IL-10 -1082 promoter SNP and its interaction with TNF-a -308 promoter SNP. **J. med. genet.**, [S. l.], v. 40, p. 296ñ299, 2003.

MACDONALD, T. T.; BAJAJ-ELLIOTT, M.; PENDER, S. L. T cells orchestrate intestinal mucosal shape and integrity. **Immunol. today.**, [S. l.], v. 20, p. 505ñ510, 1999.

MAKI, M. et al. Prevalence of celiac disease among children in Finland. **N. Engl. j. med.**, Boston, v. 348, p. 2517ñ2524, 2003.

MARSH, M. N. Gluten, major histocompatibility complex and the small intestine: a molecular and immunologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (celiac sprue). **Gastroenterology.**, Baltimore, v. 102, p. 330ñ354, 1992.

MARTINELLI, D. et al. Reproductive life disorders in Italian celiac women: a case-control study. **BMC gastroenterol.**, London, v. 10, p. 1ñ9, 2010.

MARTINS, C. L. da S. et al. Celiac disease and female infertility: a frequently neglected association. **Rev. bras. ginecol. obstet.**, Rio de Janeiro, v. 28, v. 10, p. 601ñ606, 2006.

MAXWELL, J. R. et al. Biologics in Rheumatoid Arthritis Genetics and Genomics Study Syndicate Association of the tumour necrosis factor-308 variant with differential response to anti-TNF agents in the treatment of rheumatoid arthritis. **Hum. mol. genet.**, Oxford, v. 17, n. 22, p. 3532–3538, 2008.

MESSER, G. et al. Polymorphic structure of the tumor necrosis factor (TNF) locus: an NcoI polymorphism in the first intron of the human TNF-beta gene correlates with a variant amino acid in position 26 and a reduced level of TNF-beta production. **J. exp. med.** New York, v. 173, n. 1, p. 209–219, 1991.

MOLBERG, O. et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. **Nat. med.**, New York, v. 4, p. 713–717, 1998.

MUCIDA, D. et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. **Science**, Washington, v. 317, p. 256–260, 2007.

NILSEN, E. M. et al. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 115, p. 551–563, 1998.

NOT, T. et al. Celiac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. **Scand. j. gastroent.**, [S. I.], v. 33, p. 494–498, 1998.

OBAYASHI, H. et al. Tumor necrosis factor microsatellite polymorphism influences the development of insulin dependency in adult-onset diabetes patients with the DRB1*1502-DQB1*0601 allele and anti-glutamic acid decarboxylase antibodies. **J. clin. endocr. metab.**, [S. I.], v. 85, p. 3348–3351, 2000.

OLIVEIRA, R. P. et al. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. **Eur. j. gastroenterol. hepatol.**, London, v. 19, p. 43–49, 2007.

OTA, N. et al. A nucleotide variant in the promoter region of the interleukin-6 gene associated with decreased bone mineral density. **J. hum. genet.**, Tokyo, v. 46, p. 267–272, 2001.

_____. Linkage of interleukin 6 locus to human osteopenia by sibling pair analysis. **Hum. genet.**, Berlin, v. 105, p. 253–257, 1999.

PASARE, C.; MEDZHITOV, R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. **Science**, Washington, v. 299, p. 1033–1036, 2003.

PATRESI, R. et al. Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population. **Scand j. gastroenterol.**, Oslo, v. 7, p. 747–750, 2003.

PEÑA, A. S. What is the best histopathological classification for celiac disease? Does it matter? **Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench.**, [S. I.], v. 8, n. 4, p. 239–243, 2015.

PENDER, S. L. et al. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. **J. immunol.**, Baltimore, v. 158, p. 1582-1590, 1997.

PETRONZELLI, F. et al. Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. **Ann. hum. genet.**, London, v. 61, p. 307-317, 1997.

POWRIE, F.; MALOY, K. J. Regulating the regulators. **Science.**, Washington, v. 299, p. 1030-1031, 2003.

RASHTAK, S. et al. Comparative usefulness of deamidated gliadin antibodies in the diagnosis of celiac disease. **Clin. gastroenterol. hepatol.**, Philadelphia, v. 6, p. 426-432, 2008.

RAUEN, M. S. et al. Celiac disease's relationship with the oral health. **Rev. nutr.**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 271-276, 2005.

RUULS, S. R.; SEDGWICK, J. D. Unlinking tumor necrosis factor biology from the major histocompatibility complex: lessons from human genetics and animal models. **Am. j. hum. genet.**, Chicago, v. 65, p. 294-301, 1999.

SALVATI, V. M. et al. Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. **Gut.**, London, v. 50, p. 186-190, 2002.

_____. Keratinocyte growth factor and coeliac disease. **Gut.**, London, v. 49, p. 176-181, 2001.

SANDHYA, P. et al. Tumour necrosis factor (TNF)- α -308 gene polymorphism in Indian patients with Takayasu's arteritis: a pilot study. **Indian j. med. res.**, New Delhi, v. 137, n. 4, p. 749-752, 2013.

SAWCZENKO, A. et al. Intestinal inflammation-induced growth retardation acts through IL-6 in rats and depends on the -174 IL-6 G/C polymorphism in children. **Proc. Nat. Acad. Sci. Philadelphia.**, Philadelphia, v. 102, p. 13260-13265, 2005.

SCHUPPAN, D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. **Gastroenterology.**, Baltimore, v. 119, p. 234-234, 2000.

SEVERANCE, E. G.; YOLKEN, R. H.; EATON, W. W. Autoimmune diseases, gastrointestinal disorders and the microbiome in schizophrenia: more than a gut feeling. **Schizophr. res.**, Amsterdam, v. 176, n. 1, p. 23-35, Sept. 2014.

SHAMIR, R. et al. The use of a single serological marker underestimates the prevalence of celiac disease in Israel: a study of blood donors. **Am j. gastroenterol.**, New York, v. 97, p. 2589-2594, 2002.

SHIN, H. D. et al. Genetic restriction of HIV-1 pathogenesis to AIDS by promoter alleles of IL10. **Proc. Nat. Acad. Sci. Philadelphia.**, Philadelphia, v. 97, p. 14467-14472, 2000.

SILVA, G. A. P. da. Doença celíaca: repercussões na mineralização óssea. **J.**

pediatr., Rio de Janeiro, v. 79, n. 4, p. 282-283, 2003.

SIQUEIRA NETO, J. I. et al. Neurological manifestations of celiac disease. **Arq. neuropsiquiatr.**, São Paulo, v. 62, n. 4, p. 969-972, 2004.

SOLLID, L. M. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. **Nat. rev. immunol.**, London, v. 2, p. 647-655, 2002.

SOLLID, L. M.; LUNDIN, K. E. A. Diagnosis and treatment of celiac disease. **Mucosal Immunol.**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 3-7, Jan. 2009.

SUMMERS, A. M. et al. Association of IL-10 genotype with sudden infant death syndrome. **Hum. immun.**, New York, v. 61, p. 1270-1273, 2000.

SUTHERLAND, G. R. et al. Interleukin 4 is at 5q31 and interleukin 6 is at 7p15. **Hum. genet.**, Berlin, v. 79, p. 335-337, 1988.

TIMUCIN, C. I. L. et al. Screening for celiac disease in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma patients. **Turk. j. gastroenterol.**, Ankara, v. 20, n. 2, p. 87-92, 2009.

TONG, Q. et al. Association of TNF- α polymorphism with prediction of response to TNF blockers in spondyloarthritis and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. **Pharmacogenomics.**, London, v. 14, n. 14, p. 1691-1700, 2013.

TRONCONE, R. et al. Celiac disease and other immunologically mediated disorders of gastrointestinal tract: working group report of the second world congress of pediatric gastroenterology, hepatology and nutrition. **J. pediatr. gastroenterol. nutr.**, New York, v. 39, p. S601-S610, 2004. Suplemento, 2.

_____. IgA antibodies to tissue transglutaminase: an effective diagnostic test for celiac diseases. **J. Pediatr.**, St. Louis, v. 134, n. 2, p. 166-171, 1999.

_____. Latent and potencial coeliac disease. **Acta paediatr.**, Stockholm, v. 1996, n. 412, p. 10-14. Suplemento.

_____. Majority of gliadin-specific T-cell clones from celiac small intestinal mucosa produce interferon-gamma and interleukin-4. **Dig. dis. sci.**, New York, v. 43, p. 156-161, 1998.

TURNER, D. M., et al. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. **Europ. j. immunogenet.**, [S. l.], v. 24, p. 1-8, 1997.

VADER, W. et al. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. **Proc. Nat. Acad. Sci. Philadelphia.**, Philadelphia, v. 100, p. 12390-12395, 2003.

VENTURA, A. et al. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease: SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. **Gastroenterology.**, Baltimore, v. 117, p. 297-303, 1999.

VIEIRA, P. et al. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. **Proc. Nat. Acad. Sci. Philadelphia.**, Philadelphia, v. 88, p. 1172-1176, 1991.

WALKER, M. M.; TALLEY, N. J. Clinical value of duodenal biopsies: beyond the diagnosis of coeliac disease. **Pathol. res. pract.**, New York, v. 207, n. 9, p. 538-544, Sept. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/sci-hub.cc/science/article/pii/S0344033811001543>>. Acesso em: 10 set. 2014.

WANG, Y. C. et al. Interleukin-10 haplotype may predict survival and relapse in resected non-small cell lung cancer. **PLoS ONE.**, San Francisco, v. 7, n. 7, p. 1-10, 2012.

WESTENDORP, R. G. J., et al. Genetic influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. **Lancet.**, London, v. 349, p. 170-173, 1997.

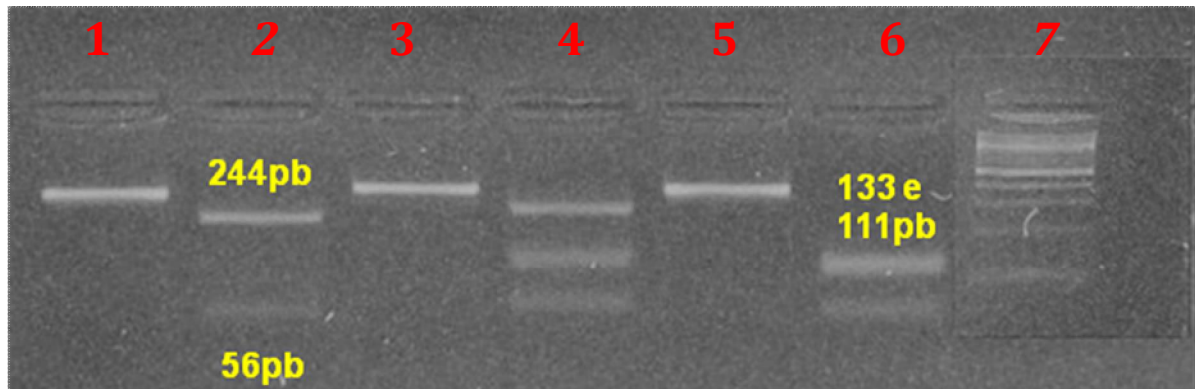
WESTERHOLM-ORMIO, M. et al. Inflammatory cytokines in small intestinal mucosa of patients with potential coeliac disease. **Clin. exp. immunol.**, London, v. 128, p. 94-101, 2002.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION GLOBAL GUIDELINES. **Doença celíaca.** [S. l.], 2012.

ZHANG, T. C. et al. The relationship between tumour necrosis factor- α gene polymorphism and susceptibility and clearance of the persistent hepatitis B virus infection in a Chinese population: a meta-analysis. **Clin. microbiol. infect.**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 227-234, 2014.

ZILBERSTEIN, A. et al. Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines. **EMBO j.**, Oxford, v. 5, p. 2529-2537, 1986.

APÊNDICE A ã Digestão enzimática da IL-6 (-174 G/C) em gel de agarose a 3%



1; 3; 5: Produto de amplificação (300pb)

2: Genótipo GG (244 e 56pb)

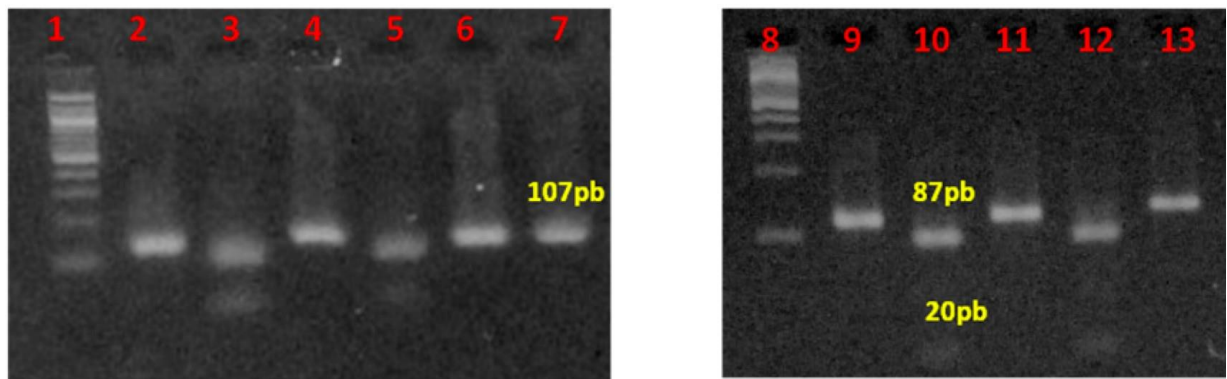
4: Genótipo AG (244, 133, 111 e 56pb)

6: Genótipo AA (133,

111 e 56pb) 7: Ladder

DNA 100pb (Invitrogen)

APÊNDICE B ã Digestão enzimática da TNF- α (-308 G/A) em gel de agarose a 3%



1;8: Ladder DNA 100pb (Invitrogen)

2; 4; 6; 9; 11; 13: Produto de amplificação (107pb)

3; 5; 10; 11: Genótipo GG

(87 e 20pb) 7: Genótipo AA

(107pb)

14: Genótipo AG (107, 87 e 20pb)

ANEXO A ã Instruções para submissão de artigo ã Genetic and Molecular Research
ã Qualis B2 ã Ciências Biológicas I (Capes, 2013)

Online journal: Genetics and Molecular Research (GMR)

What is GMR?

GMR is a peer-reviewed, all-electronic journal available at no charge to readers via the Internet on the FUNPEC-RP (Ribeirão Preto Foundation for Research) website (www.funpecrp.com.br).

What are GMR 's aims and scope?

The overall aim of GMR is to publish original, outstanding research papers in the areas of Genetics, Molecular Biology and Evolution.

Why a new journal?

GMR has been launched to agilize the process of publication and to make these publications readily available to the scientific community. The editorial staff at GMR maintains the same structure and procedures as the print journals that it has worked with previously, but with reduced costs due to the elimination of printing and mailing. Further, the lead time to publication is considerably reduced. After extensive consultation with scientists, financing institutions and indexing agencies we decided that there was a need for a high-quality electronic journal accessible at no charge to anyone, anywhere, at anytime.

Is GMR a 'real' journal?

Absolutely, GMR publishes original research articles that have undergone rigorous peer review. Citations to GMR can be made as for any print journal. FUNPEC is committed to maintaining unrestricted access to the archive at no charge and in perpetuity. GMR is presently abstracted and indexed in the following secondary services: Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, AgBiotechNet, Agricola, Agricultural Economics Database, Agroforestry Abstracts, Animal Breeding Abstracts, Animal Science Database, Apicultural Abstracts, BioDirectory, Biological Abstracts, Biological Sciences Abstracts, Biosis Previews, Biotechnology and Bioengineering Abstracts, CAB Abstracts, CABI Animal Production Database, CABI Crop Science Database, CABI Plant Genetics and Breeding Database, CABI Tropical Diseases Bulletin, CABI Veterinary Science Database, Cambridge Scientific

Abstracts, Chemical Abstracts, Crop Physiology Abstracts, CSA Biological Sciences, Dairy Science Abstracts, Directory of Open Access Journals, EBSCO Publishing, EMBASE, EMBiology, Entomology Abstracts, Environmental Science Database, Excerpta Medica ñ Embase, Field Crop Abstracts, Forest Science Database, Forestry Abstracts, Genetics Abstracts, Horticultural Science Abstracts, Index Medicus, ISI (Science Citation Index- Expanded), Lilacs, Med Bio World, Medline, Nematological Abstracts, Neurotransmitter, Nutrition Abstracts and Reviews Series A, Nutrition and Food Sciences Database, Parasitology Database, Pherobase, Plant Breeding Abstracts, Plant Genetic Resources Abstracts, Plant Protection Database, Protozoological Abstracts, PubMed (LinkOut Journal), Review of Agricultural Entomology, Review of Medical and Veterinary Entomology, Review of Medical and Veterinary Mycology,

Review of Plant Pathology, Rice Abstracts, SCD UHP-NANCY, Scirus, Scopus, Virtual Health Library, Weed Abstracts and Wheat, Barley and Triticale Abstracts.

How do I benefit as an GMR author and why should I submit my best papers?

The Editors are dedicated to establish GMR as a prestigious place to publish and authors benefit from this commitment to scientific quality and visibility. The very nature of articles published in GMR means that the journal will have high impact and attract extensive citations.

Funding agencies, tenure committees and promotion boards will recognize GMR in their thinking and decisions.

Authors benefit from the high visibility of publishing their papers on the GMR web site. Speed of publication - referees will be asked to review papers within 30 days and papers will be published on the web as soon as accepted for publication; there will be little in the way of postal or printing delays.

Authors can also include links to their articles in their own or departmental online websites and in messages to colleagues, informing them of publication. Thus, they will save postage costs and delays in the availability of their material to interested readers.

How does GMR take advantage of the Internet?

GMR takes advantage of web publishing in several ways. Articles are published as

soon as they are accepted rather than waiting for an issue to be completed. Authors can present data and results which cannot readily be presented in print journals. This includes color figures, with no extra charge. In addition authors can supply hypertext links to other resources, such as supplementary material available elsewhere on the web.

Is everything archived?

Yes. We are aware of the need to provide secure data storage for future archiving of material. Our own web server is extensively backed up and we have a commitment to provide access 24 hours a day, 7 days a week.

Can articles be printed out?

Yes, they appear on the web as html documents, which are easily viewed on a computer screen, or as (Adobe Acrobat) pdf documents, which appear in a normal print journal format, and can be printed as such, with the corresponding journal page numbers.

How are GMR articles cited?

Citations are the same as for a print article, as GMR articles have page numbers. Example:

Duarte FAM (2002). A new, online genetics journal. *Genet. Mol. Res* 1:2-5.

Rua Floriano Peixoto, 2444 - Alto da Boa Vista - CEP 14025-220 - Ribeirão Preto, SP | Brasil. PHONE NUMBERS Tel: +55 (16) 3620-1251 / Fax: +55 (16) 3621-1991

CONTACTS

E-mail:

gmr@geneticsmr.com

Skype:geneticsmr

MSN: gmr@geneticsmr.com



Instructions for Authors

Genetics and Molecular Research (GMR) publishes Book Review, Brief Note, Case Report, Comment, Correction, Errata, Homage, *In Memoriam*, Letter to the Editor, Methodology, Mini-Review, Obituary, Opinion, Point of View, Research Note, Retraction, Review, Review Article, Short Communication, and Thesis Abstract, with regard to genetics, evolution, molecular biology, and bioinformatics. Review articles are normally received by invitation only. If you would like for us to consider a review article, please consult the editor first; send a proposed title, a brief outline and a list of papers relevant to the review published by the author(s). GMR is an exclusively online journal.

All GMR articles must meet the highest standards of scientific quality, both in terms of originality and significance, and the research findings reported should make substantial advances. As it is a journal serving a wide and varied scientific community, article abstracts, introductions and conclusions should be comprehensible to the non-specialist, stressing any wider implications of the study. However, the papers should not compromise on the scientific rigor and detail demanded by an international research journal. The broad readership that GMR attracts gives authors an opportunity to convey to a large audience, as well as to specialists, the importance of their research. The journal is currently indexed in over 64 services; see [<http://www.geneticsmr.com>].

Contributions should be sent either by e-mail as attachments to [gmr@geneticsmr.com].

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been previously published and will not be simultaneously published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries. The use of registered

names, trademarks, etc., in this publication does not imply, even in the absence of a specific statement, that such names are exempt from the relevant protective laws and regulations and therefore free for general use.

All papers should be prepared in U.S. English. An initial evaluation of the language will be made upon receipt of each manuscript. Those that are considered inadequate for initial review will be returned or sent out for correction, at the discretion of the author. The manuscript will be considered officially received when the corrected version is ready to be sent to the referees.

Before final acceptance, a submission letter with the title of the article and names and signatures of all the authors should be sent by e-mail to gmr@geneticsmr.com. Galley proofs will be sent in pdf form via e-mail for final revision. All authors are co-responsible for their submissions and they should make every effort to check the paper before this final step to avoid costly reformatting and possible introduction of new errors.

GMR articles have no rigid length restrictions. They should contain sufficient technical detail for an expert reader to understand and assess the methods and results. There is no page limit for GMR articles, but authors should still be concise, for two main reasons. First, our electronic refereeing system relies on e-mail, and very large files occasionally cause problems. Second, lengthy manuscripts can be cumbersome to read and study. Referees tend to dislike them, and they take longer to process. In addition, readers of electronic journals often print articles to read them. Remember that a 10,000-word article takes up around 11 pages.

How many pages would you be willing to read on-screen or print out?

Editorial policies: GMR is a refereed journal. Only original manuscripts will be considered for publication. Manuscripts will be reviewed by at least two independent reviewers before a decision is made on publication. The whole process is conducted electronically to speed progress and final publication. Papers will be published (placed online), once were fully processed. Papers accepted in

their final form from January 1 to March 31 constitute the first issue of each volume, and so on. There are four issues per year.

Manuscripts (in U.S. English), together with a cover letter from the author responsible for all correspondence, should be submitted to the Editor at [gmr@geneticsmr.com] in electronic format as .doc files saved in Microsoft Word 97 for Windows, or later version. Do not use formatting such as Word's "Heading" or "Style Sheets". Spelling, punctuation, sentence structure, spacing, length, and consistency of usage in form and descriptions should be checked before submission. Please also check references for accuracy. Ensure that all figures and tables are mentioned in the text, and that all references are cited in the text. Figure and table files (see below) should be separate.

Submission information

Authors are required to provide the following information with their electronic submissions:

Author submitting the article; article title; authors (full list); article type and session; status of article (e.g., new, revised, etc.); postal address; e-mail address; phone number; fax number; names and types of the files sent.

Brazilian authors should not translate their institutional addresses. These should remain in the original (Portuguese) language.

Revised versions: Authors submitting a revised version of an article, must remember to include a list of changes, and replies to the referees (or technical editor). All the files, not just those revised, for the final draft of paper should be sent.

Acknowledgment of electronic submissions: Successful receipt and processing of the author's submission will be acknowledged by e-mail when the submitted manuscript has been checked. If no reply has been received within one week, the author should contact the editor at [gmr@geneticsmr.com].

Review: Articles are reviewed anonymously by independent referees. Authors are encouraged to suggest names of expert reviewers, but selection remains the prerogative of the editors. To facilitate the review process, the authors can send supplementary material, such as cited accepted but not yet published papers, which may be important for assessment of the manuscript.

A review article should contain: an abstract of 250 words or less, no more than six key words, a running title and no more than 60 references. It should be divided into sections with appropriate titles and subtitles.

Preparation of the manuscript

Order the sections comprising the manuscript as follows: title, running title, author, address, abstract, key words, introduction, material and methods, results, discussion, acknowledgments, and references.

Title Page: The title page should include the title of the article, authors' names (names and initials (only) thinking in indexing services), and authors' affiliation. The affiliation should comprise the department, institution (usually university or company), city, and state (or nation). The title page should include the name and complete mailing address, telephone number, fax number, and e-mail address of the author designated to review proofs. A running title of no more than 60 characters (including spaces) should be provided.

Abstract: An abstract of up to 250 words, single-spaced, is required of research articles and reports and should be arranged in one paragraph. The following information (without headings) should be included: purpose, methods, results (please report numerical data (means $\pm$ SE) for significant results), and conclusions. Review articles also require an abstract, which need not include all of these items.

Key words: A list of key words or indexing terms (up to six) should be included. **Text**

Format: Headings should be bold, and first letters capitalized and left-aligned. All

text should be set in Times New Roman font, 12 point, left-aligned, single-spaced. Do not justify the right margin. Leave only one (1) space after periods. Paragraphs should not be indented; there should not be any blank lines between them. Use line returns only at the end of paragraphs. Do not use tabs or spaces to create indents. Use the Symbol font for symbols and special characters. Do not use equation editors or footnoting utilities. Save equations as images. Equations should be numbered consecutively with Arabic numerals in parentheses on the right hand side of the page.

Footnotes: Footnotes should be avoided. When their use is absolutely necessary, foot- notes should be numbered consecutively using Arabic numerals and should be placed at the bottom of the page to which they refer. Place a line above the footnote, so that it is set off from the text.

Tables/Charts: Special care should be taken to ensure that all tables are properly formatted. Scientific symbols used should be in Symbol or Times New Roman. Tables should be on a separate page, numbered consecutively (with Arabic numerals) referred to by number in the text and designed to fit the column or page size of the journal. Use tables with cells to separate columns. Do not use spaces, tabs or vertical lines. Left justify the title above the table.

Indicate each table's location within the manuscript.

Illustrations: Illustrations/figures (photographs, drawings, diagrams, and charts) should each be in a single file, numbered in a consecutive series of Arabic numerals in the order in which they are cited in the text. Illustrations must be submitted as separate files. All illustrations are to be supplied in JPEG (jpg) format in either color or black and white. Images must be saved as separate, stand- alone files. The image resolution should be 300 dpi. Do not embed images within the text file. Indicate each figure's location within the text. Do not forget to send the legend in a separate page. The authors should also send, by mail, a printed version of the figures. These should be at least 10 x 15 cm, up to US letter size, so that figures can be scanned (in case the figure files are not adequate) to guarantee good quality for publishing online.

Abbreviations: Try to use abbreviations in the text sparingly. Write out abbreviations in full before the first time they are used in the text. Use the metric system for all measurements without periods (cm, mL, s). Define all symbols used in equations and formulas. Do not abbreviate the word “Figure” or “Table” in titles or text.

Acknowledgments: All acknowledgments (including those for grant and financial support) should be typed in one paragraph directly preceding the reference section. Authors of manuscripts submitted to GMR are requested to state the source of all funding that enabled the described research to be undertaken.

References: References in the text should include the name of the author and the year in parentheses, e.g. (Searle, 1961) or (King and Wilson, 1975). When a reference with more than two authors is cited, only the first author is named, e.g. (Comstock et al., 1958). The references must be cited in the text in chronological order, e.g. (Ideber, 2001; Uetz, 2002; Ottavai, 2004). References to “unpublished results” and “submitted papers” should appear in the text in parentheses following the name(s) of the individual(s). Example: (Pereira KS, Martins PK and Silva TM, unpublished results). **No more than 40 references should be cited in a Full-length paper, 20 references in a Short Communication and 60 references in a Review article.**

References, under the heading “References” should include only works referred to in the text. This section should be arranged in alphabetical order under the first author’s last name. References should be cited as follows: journal papers - names and initials of the first four authors (after that using et al.), year, journal title abbreviated according to PubMed or Web of Science, volume number, first and last page numbers; books - names of authors, year, full title, edition, publishers, address (city); articles published in symposia - names of authors, year, full title of book, name(s) of editor(s) in parentheses, publisher, address (city), first and last page numbers.

The references should consist mainly of articles from indexed journals. References for techniques that are essential for understanding or repeating the methods should always be in easily accessible (indexed) journals.

Reference style: The list of references at the end of the paper should follow the format requested by GMR. The link below can be accessed to see how the references should appear.

Examples of reference style General information of GMR style

ANEXO B ã Declaraçaõ de Anuência



I.R.C.C.S. BURLO GAROFOLO
S.C. DI GENETICA MEDICA
 DIPARTIMENTO DI MEDICINA DI LABORATORIO

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE
SEZIONE DI GENETICA MEDICA
 DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA
 RIPRODUZIONE E DELLO SVILUPPO



Trieste, 03 de agosto de 2011

DECLARAÇÃO DE ANUÊNCIA

Eu, Dr. MARCELLO MORGUTTI dirigente biólogo do Laboratório de Genética Molecular do IRCCS Burlo Garofolo de Trieste (Itália) concordo que a aluna **REBEKA MORAES DE ALBUQUERQUE MARANHÃO**, mestranda do curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, nível Mestrado, utilize as amostras de DNA de pacientes com doença celiaca e do grupo controle saudável, as quais se encontram sob minha responsabilidade, as quais fizeram parte de um projeto inicial RC03/04 aprovado pelo comitê de ética do IRCCS Burlo Garofolo n. CE/V-71/2010. A referida aluna estará desenvolvendo seu projeto de dissertação com o título: Estudo da relação entre os polimorfismos das interleucinas IL-6 e TNF alfa com a susceptibilidade a doença celíaca em pacientes italianos sob a co-orientação do Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza, e do Prof. Sérgio Crovella.

Atenciosamente,

Dr. Marcello Morgutti



IRCCS BURLO GAROFOLO - TRIESTE
 S.C. Laboratorio di Genetica Medica
 dott. Marcello Morgutti

ANEXO C ã Aprovação do Comitê de Ética**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****PARECER**

Registro CEP/UPE: 214/11

Registro CAAE: 0213.0.097.000-11

Área de Conhecimento: Ciências Biológicas - Genética

Grupo: III

Instituição de Origem: Universidade de Pernambuco

Título: Polimorfismo das interleucinas IL-6 TNF-Alfa e sua relação com a suscetibilidade a doença celíaca em pacientes italianos

Pesquisador Responsável: Paulo Roberto Eleuterio de Souza

Pesquisador(a): Rebeka Moraes de Albuquerque Maranhão

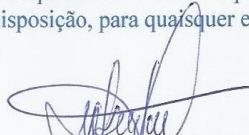
O plenário do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Pernambuco CEP/UPE, no exercício de suas atribuições legais e em consonância com a Resolução 196/96 do CNS/MS, considera a inclusão da Interleucina 10 (IL10) e sua relação com a susceptibilidade a doença celíaca em pacientes italianos pertinente com metodologia adequada aos objetivos propostos, não apresenta riscos, contém medidas protetoras ao sujeito e não apresenta agravo ético. Sendo assim o CEP opina favoravelmente ao pleito do pesquisador, considerando a inclusão como **"APROVADA"**.

O CEP/UPE informa ao pesquisador que tem por obrigação:

- Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e/ou do TCLE. Nestas circunstâncias, a inclusão de pacientes deve ser suspensa temporariamente, até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas;
- Comunicar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo;
- Para pesquisas com duração até 18 meses, apresentar relatório final após o término da pesquisa;
- Para pesquisas com duração acima de 18 meses, apresentar relatório parcial neste período e o final após o término da pesquisa;
- O relatório final deverá ser entregue ao CEP uma via em CD.

Agradecemos a oportunidade de podermos contribuir para o avanço da ciência e na apreciação do referido projeto. Colocamo-nos à disposição, para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Reiteramos votos de sucesso.

Recife, 07 de maio de 2012.


Prof. Dr. Nelson Mendes Loretto
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade de Pernambuco