



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



**MABEL PROENCE PEREIRA LOPES**

**POLIMORFISMO DE GENES DAS CITOCINAS *TNF*, *IFN- $\gamma$*  *TGF- $\beta$ 1*,  
*IL-10* E *IL-6* E MARCADORES INFORMATIVOS DE  
ANCESTRALIDADE EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DO  
INTESTINO IRRITÁVEL**

Salvador-BA  
2010

**MABEL PROENCE PEREIRA LOPES**

**POLIMORFISMO DE GENES DAS CITOCINAS *TNF*, *IFN- $\gamma$* , *TGF- $\beta$ 1*,  
*IL-10* E *IL-6* E MARCADORES INFORMATIVOS DE  
ANCESTRALIDADE EM INDIVÍDUOS COM SÍNDROME DO  
INTESTINO IRRITÁVEL**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Imunologia pelo Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Carneiro Lemaire

Salvador - BA  
2010

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela iluminação e discernimento. Ele é o responsável por TUDO!

A minha mãe e meu pai pelo extremo incentivo, pela confiança, companheirismo e principalmente pelo amor incondicional. Sem eles nada disso seria concretizado.

A meus irmãos, Aline e Antonio Carlos pela amizade e por acreditarem na minha capacidade. Pessoas importantíssimas na minha vida.

A Dra. Denise Carneiro Lemaire pela orientação, ensinamentos e dedicação na realização deste trabalho.

A Prof<sup>a</sup> Maria Teresita Bendicho pelo incentivo, amizade e disponibilidade em ajudar sempre.

A Prof<sup>a</sup> Kiyoko Abe-Sandes pela colaboração de fundamental importância e pela boa vontade sempre.

A Taísa Machado pelo bom humor e pelo companheirismo em todos os momentos que precisei.

Ao grande idealizador do projeto, Dr. Jorge Guedes pelos ensinamentos e colaboração essencial para conclusão deste trabalho.

A Letícia, Selma, e Aidil pela força e companheirismo.

A Rodrigo Oliveira pelo apoio incondicional. Esteve e está presente em muitos momentos...

A Dra. Lourianne Cavalcanti pela ajuda, apoio e incentivo

A Dr. Jardel Caetano pela colaboração na ampliação da amostra de pacientes

Aos, no momento, estudantes, que participaram do trabalho como Mili Freire, Talita Portugal, Lisias Miranda, Enny Paixão e Rodrigo Mariano.

Ao Laboratório de Imunogenética do ICS (Instituto de Ciências da Saúde) por permitir a realização deste estudo. Em especial a Prof. Roberto Meyer por sempre mostrar-se disposto a ajudar.

Ao Ambulatório de Gastroenterologia - HUPES pelo recrutamento dos pacientes. E aos próprios pacientes por aceitarem serem membros deste estudo.

Aos meus amigos, em especial a Mayana, Ana Carolina Ribeiro, Sâmia Marques, Lorena Meyer, Inara Oliveira pelo papel essencial que cada uma delas desempenha, mesmo que indiretamente.

## RESUMO

**Introdução:** A Síndrome do Intestino Irritável (SII) é uma desordem funcional do trato gastrointestinal, caracterizada por dor abdominal e alteração da motilidade e sensibilidade intestinal, acompanhada por desconforto. As formas clínicas desta patologia são: diarréica, constipante e alternante. A patogenia da SII é complexa e pouco entendida. Estudos genéticos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de identificar possíveis marcadores de predisposição ou proteção ao desenvolvimento desta doença. Alguns estudos sugerem que o desequilíbrio na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias tem um importante papel na SII. Porém, poucos estudos mostram a associação entre a SII e o polimorfismos em genes de citocinas. Dados da literatura sugerem que indivíduos caucasianos teriam maior risco de desenvolver esta doença, mas não há relato de estudos realizados com o objetivo de avaliar a possível associação entre os marcadores informativos de ancestralidade (AIMs) e a SII. **Objetivo:** Estudar a possível associação dos polimorfismos *TNF* -308 G >A; *TGFBI* (10T>C, 25G>C); *IL10* -1082G>A, -819T>C, -592 C>A; *IL6* -174G>C e *IFNG* +874T>A com a Síndrome do Intestino Irritável e estimar a ancestralidade genômica segundo os AIMs *PV92*, *AT3*, *Sb19.3*, *APO*, *CKMM*, *Fynull*, *LPL*, *GC* e *RB2300*. **Métodos:** A população do estudo foi constituída por 55 pacientes diagnosticados com SII atendidos no Complexo Hospitalar Prof. Edgard Santos-UFBA e 116 doadores voluntários de sangue (grupo controle). O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico pelo método de *Salting-out* (extração salina) e a genotipagem dos AIMs foi feita por PCR convencional, PCR-RFLP ou PCR Real Time e das citocinas por PCR-SSP utilizando o kit “*Cytokine Genotyping Tray*” (*One Lambda Incorporation*). **Resultados:** Não houve diferenças estatisticamente significantes nas frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas dos polimorfismos em genes de citocinas entre os grupos. Foi observada uma frequência significativamente maior do *locus AT3* na amostra de indivíduos com SII quando comparada ao grupo controle ( $p=0,0291$ ). Os grupos de pacientes e controles são homogêneos do ponto de vista genético, visto que a estimativa de mistura foi semelhante em ambos, mostrando maior contribuição européia seguida da africana e ameríndia. Houve diferença estatisticamente significativa na frequência do *locus PV92*, entre os subgrupos das diferentes formas clínicas, sendo maior entre os pacientes com a forma diarréica em relação às demais formas ( $p=0,012$ ). A estimativa de mistura para as diferentes formas clínicas mostrou que todas apresentam maior contribuição européia, seguida da africana e ameríndia. No entanto, a forma clínica diarréica apresenta menor contribuição européia e maior ameríndia quando comparada às outras formas. **Conclusões:** Polimorfismos nos genes das citocinas não parecem estar envolvidos na predisposição e/ou proteção à SII. A maior contribuição da ancestralidade européia, analisada por marcadores moleculares informativos de ancestralidade, pode ser um fator de predisposição ao desenvolvimento da SII. A maior contribuição da ancestralidade ameríndia em indivíduos com SII, pode ser um fator de predisposição ao desenvolvimento da forma diarréica.

**Palavras-chaves:** Síndrome do Intestino Irritável. Polimorfismos genéticos. Citocinas. Marcadores Informativos de Ancestralidade.

## ABSTRACT

**Introduction:** The Irritable Bowel Syndrome (IBS) is a gastrointestinal functional disorder characterized by abdominal pain and altered gut motility and sensibility followed by discomfort. The disease clinical forms are: diarrheic, constipating and alternate. The pathogenesis of IBS is complex and poorly understood. Genetic studies are being developed aiming to identify possible markers of predisposition or resistance to the development of this disease. Some studies suggest that pro- and anti-inflammatory cytokines imbalance has an important role in IBS. However, few studies showed an association between IBS and polymorphisms in cytokine genes. Published data suggest that Caucasians would have a higher risk to develop this disease, but there is no report of studies aiming to evaluate the possible association between the ancestry informative markers (AIMs). **Objective:** To evaluate the association of the following polymorphisms *TNF* -308 G >A; *TGFB1* (10T>C, 25G>C); *IL10* -1082G>A, -819C>T, -592 C>A; *IL6* -174G>C and *IFNG* +874T>A with irritable bowel syndrome and to estimate the genomic ancestry according to AIMs (*PV92*, *AT3*, *Sb19.3*, *APO*, *CKMM*, *Fynull*, *LPL*, *GC* and *RB2300*). **Methods:** The study population comprised 55 patients diagnosed with IBS treated at the University Hospital Professor Edgard Santos Complex-UFBA and 116 voluntary blood donors (control group). Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by salting-out method. AIMs genotyping was performed by conventional PCR, PCR RFLP or Real time PCR and cytokines were evaluated by SSP PCR kit Cytokine Genotyping Tray (One Lambda Incorporation). **Results:** There were no statistically significant differences in allelic, genotypic and phenotypic frequencies of cytokine genes polymorphisms among groups. We observed a significantly higher frequency of the AT3 locus in the sample of IBS individuals when compared to control group ( $p = 0.0291$ ). Patient groups and controls were genetically homogeneous, based on the fact the admixture estimation was similar in both, showing greater European contribution followed by the African and Amerindian. There was a statistically significant difference on PV92 locus frequency, between the different clinical forms subgroups, being higher among patients with diarrheic when compared to the other forms ( $p = 0.012$ ). The admixture estimation for the different clinical forms showed that all had a greater European contribution, followed by African and Amerindian. However, the diarrheic clinical form has a lower European and higher Amerindian contribution when compared to other forms. **Conclusions:** Polymorphisms in cytokine genes do not seem to be involved in predisposition and / or protection to SII. The major contribution of European ancestry, analyzed by molecular markers informative for ancestry, may be a predisposing factor for the development of IBS. The major contribution of Amerindian ancestry in individuals with IBS may be a predisposing factor for the development of the diarrheic form.

**Key words:** Irritable Bowel Syndrome. Genetic Polymorphisms. Cytokines. Ancestry Informative Markers (AIM).

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagem de gel de agarose a 1,5%, mostrando a genotipagem de um indivíduo: TNF G/A (1: G-F), TGF- $\beta$ 1 T/T e G/G (1: E-B), IL-10 GCC/GCC (1:A, 2: H-E), IL-6 C/C (2: D-C) e IFN- $\gamma$ T/T (2: B-A)	36
Figura 2 - Comparação da estimativa de mistura da população com SII e controle	49
Figura 3 - Comparação da estimativa de mistura entre as três formas clínicas da SII	50

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Frequências (alelo1) dos AIMs estudados nas populações ancestrais.	36
Quadro 2 - Localização cromossômica dos loci analisados e populações parentais com maior frequência do alelo*1.	37
Quadro 3 - Sequências de primers ou sondas e Temperatura de Pareamento (T°) da PCR dos loci estudados.	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização clínico-demográfica dos participantes do estudo	40
Tabela 2 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo do gene <i>TGFB1</i> (códon 10 T>C) em pacientes com SII e um grupo controle.	41
Tabela 3 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo do gene <i>TGFB1</i> (códon 25G>C) em pacientes com SII e um grupo controle.	42
Tabela 4- Distribuição das frequências genotípicas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo do gene <i>TGFB1</i> (códon 10T>C; códon 25G>C ) em pacientes com SII e um grupo controle.	43
Tabela 5- Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo <i>IFNG</i> +874 T>A em pacientes com SII e um grupo controle.	44
Tabela 6- Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo -174 G>C do gene de <i>IL6</i> em pacientes com SII e um grupo controle.	45
Tabela 7- Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e dos fenótipos previstos para os polimorfismos -1082G>A, -819C>T e -592C>A do gene <i>IL10</i> em pacientes com SII e um grupo controle.	45
Tabela 8- Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo -308 G>A do gene <i>TNF</i> em pacientes com SII e um grupo controle	46
Tabela 9- Frequências do alelo*1 em pacientes com SII e controle e análise de diferenciação gênica entre as duas populações.	48
Tabela 10- Proporções de contribuição africana, européia e ameríndia (estimativa de mistura) no grupo de pacientes com SII, controle e população de Salvador	48
Tabela 11- Frequências do alelo*1 em pacientes com SII e controle e análise de diferenciação gênica entre as formas clínicas SII-D, SII-C, SII-A.	50
Tabela 12- Frequências do alelo*1 em pacientes com SII e controle e análise de diferenciação gênica entre as formas clínicas SII-D, SII-C, SII-A.	50



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
AIMs	<i>Ancestry Informative Markers</i> (Marcadores Informativos de Ancestralidade)
Arg	Arginina
C	Citosina
UC	Colite Ulcerativa
CM	Colite Microscópica
COX-2	Ciclooxigenase-2
DC	Doença de Crohn
DII	Doença Inflamatória Intestinal
dH <sub>2</sub> O	Água destilada
dNTP	dinucleotídeos tri-fosfato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EC	Enterocromafins
EDTA	Ácido etilenodiaminotetra acético
ETOH	Etanol
G	Guanina
INF- $\gamma$	Interferon - gama
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina – 6
IL-8	Interleucina - 8
IL-10	Interleucina -10
IL-12	Interleucina -12
IL-13	Interleucina -13
IL-15	Interleucina -15
Leu	Leucina
LPS	lipopolissacarídeo
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NK	<i>Natural Killer</i> (Células Matadoras Naturais)
Pb	Pares de Bases
PCR	Reação de polimerização em cadeia

PCR-SSP	Reação de polimerização em cadeia- SSP ( <i>primers</i> sequência específico)
Pro	Prolina
PGE2	Prostaglandina E2
RNA	Ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> (Polimorfismo de Único Nucleotídeo)
SERT	Transportador de Serotonina
SII	Síndrome do Intestino Irritável
SII-D	Síndrome do Intestino Irritável – Forma Diarréica
SII-C	Síndrome do Intestino Irritável – Forma Constipante
SII-A	Síndrome do Intestino Irritável – Forma Alternante
SII-PI	Síndrome do Intestino Irritável pós-infecção
T	Timina
T. A	Temperatura Ambiente
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris Borato EDTA
Thr	Treonina
T CD4	célula T CD4
TGF-β	Fator de transformação do crescimento β
Th1	Linfócitos T Auxiliar 1
Th2	Linfócitos T Auxiliar 2
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF-β	Fator de Necrose Tumoral - beta
TGI	Trato Gastrointestinal

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	14
1.1 A SÍNDROME DO INTESTINO IRRITÁVEL.....	14
<b>1.1.1 Diagnóstico / Aspectos Clínicos.....</b>	17
<b>1.1.2 Dados Epidemiológicos.....</b>	18
<b>1.1.3 A Síndrome do Intestino Irritável em diferentes populações.....</b>	19
1.2 CITOCINAS .....	20
<b>1.2.1 Fator de transformação do crescimento-beta 1 (TGF-<math>\beta</math>1).....</b>	21
<b>1.2.2 Interferon-gama (IFN-<math>\gamma</math>).....</b>	22
<b>1.2.3 Interleucina 6 (IL-6).....</b>	23
<b>1.2.4 Interleucina 10 (IL-10).....</b>	24
<b>1.2.5 Fator de necrose tumoral (TNF).....</b>	25
<b>1.2.6 Influência das citocinas no desenvolvimento da SII.....</b>	26
1.3 POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS E A SII.....	27
1.4 DISTRIBUIÇÃO ÉTNICO-GEOGRÁFICA DE POLIMORFISMO DE CITOCINAS.....	28
1.5 MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE (AIMs).....	30
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	31
2.1. OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	32
3.1 DESENHO DO ESTUDO.....	32
3.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	33
<b>3.2.1 Critérios de inclusão.....</b>	33
<b>3.2.2 Critérios de exclusão.....</b>	33
<b>3.2.3 Grupo Controle.....</b>	34
3.3 COLETA DE SANGUE.....	34
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	34
3.5 GENOTIPAGEM DE CITOCINAS ( <i>IL6, IL10, TNF, IFNG, TGFBI</i> ).....	35
<b>3.5.1 Revelação do resultado em gel de agarose.....</b>	35

3.6 GENOTIPAGEM DOS MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE (AIMs).....	36
3.7 ASPECTOS ÉTICOS.....	38
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
4.1 POLIMORFISMO EM GENES DE CITOCINAS.....	41
<b>4.1.1 Distribuição de frequência dos polimorfismos do gene <i>TGFBI</i> (códon 10T&gt;C; códon 25G&gt;C).....</b>	<b>41</b>
4.1.1.1 Códon 10 (T>C).....	41
4.1.1.2 Códon 25 (G>C).....	42
4.1.1.3 Distribuição das frequências fenotípicas.....	42
<b>4.1.2 Distribuição de frequência do polimorfismo do gene <i>IFNG</i> -308 T&gt;A.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.3 Distribuição de frequência dos polimorfismos do gene <i>IL6</i> -174 G&gt;C.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.4 Distribuição de frequência dos polimorfismos do gene <i>IL10</i> -1082G&gt;A; -819C&gt;T; -592C&gt;A.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.5 Distribuição de frequência dos polimorfismos do gene <i>TNF</i> -308G&gt;A.....</b>	<b>46</b>
4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES COM SII E CONTROLE QUANTO À ANCESTRALIDADE GENÔMICA.....	47
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>56</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>69</b>
APÊNDICE A- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	70
APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA.....	72
APÊNDICE C- MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE.....	74
APÊNDICE D- REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	77
APÊNDICE E- MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO .....	79
<b>ANEXOS .....</b>	<b>96</b>
ANEXO A- MAPA PARA PCR-SSP.....	96
ANEXO B- APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	97

## 1 INTRODUÇÃO

### A SÍNDROME DO INTESTINO IRRITÁVEL

A Síndrome do Intestino Irritável (SII) é uma desordem gastrointestinal funcional e multifatorial caracterizada pela presença de dor abdominal ou desconforto contínuo ou remittente (aliviando após defecação), plenitude ou distensão abdominal, alteração no ritmo intestinal, hipersensibilidade intestinal e ausência de marcadores específicos. Os sintomas não são explicados por nenhuma causa orgânica, mecânica, química ou inflamatória. Esta doença, muitas vezes, não faz parte do raciocínio clínico de muitos dos médicos. Desta forma, o diagnóstico de SII normalmente é feito após a exclusão de outras desordens gastrointestinais mais complexas (DINAN, 2006; GILKIN, 2005; SPINELLI, 2007; BARKHORDARI, 2009).

A associação dos sintomas que define a SII tem sido descrita desde o século XIX (CUMMING, 1849). A maioria das hipóteses atuais para explicar a etiologia e fisiopatologia da SII parecem ter sido formulada antes de 1950: Influência hormonal (RYLE, 1928), intolerância alimentar (HOLLANDER, 1927), pós-infecção (RYLE, 1928) e hipersensibilidade do trato gastrointestinal (BOCKUS, 1928).

A patogênese exata da SII não está claramente identificada, mas outras prováveis hipóteses também são estudadas como: influência da dieta, mudanças no estilo de vida, (SPINELLI, 2007; HOTOLEANU, 2008); motilidade gastrointestinal alterada, inflamação, desequilíbrio de neurotransmissores e fatores psicológicos como o estresse (GILKIN, 2005; VAN DER VEEK, 2005; DINAN, 2006; SPILLER, 2007; BARKHORDARI, 2009).

Algumas pesquisas mostram que as alterações de motilidade, sensibilidade e reatividade autonômica vistas na SII, podem ser frutos da desregulação na interação entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e sistema nervoso entérico (MACH, 2004; CRENTSIL, 2005; KIBA, 2007).

Outras têm mostrado a possível relação da SII com os níveis de serotonina e polimorfismos do Transportador de Serotonina (SERT) (MAWE, 2006; JARRETT, 2007; COLUCCI, 2008; KOHEN, 2009). A serotonina é um neurotransmissor liberado pelas células enterocromafins (EC) e neurônios entéricos que exerce um papel chave na modulação de várias funções do trato gastrointestinal, incluindo secreção, motilidade e percepção visceral. E o SERT regula a intensidade e duração desta sinalização no intestino. Estes aspectos envolvem a sinalização da serotonina entre as células EC e a fibra nervosa sensorial da parede da mucosa do

intestino. Portanto, função ou expressão alterada da serotonina ou do SERT pode levar a alterações na motilidade e na sensibilidade, assim como pode ter relação com os sintomas de ansiedade e depressão observadas na SII (MAWE, 2006; JARRETT, 2007; COLUCCI, 2008; KOHEN, 2009).

A SII pode estar associada à distresse emocional e diminuição na qualidade de vida, e tem um impacto psicológico e social importante (MACH, 2004). Além disso, de acordo com Drossman e colaboradores (1993) há um impacto na produtividade e no absenteísmo nos locais de trabalho. Whitehead e colaboradores (1996) sugerem que o controle da ansiedade e do medo do paciente portador de SII é tão importante quanto o tratamento dos sintomas.

Por outro lado, a hipótese inflamatória é ainda sugerida e isto se deve à alta frequência de sintomas associados à SII em pacientes com DII (Doença Inflamatória Intestinal) em remissão (CRENTSIL, 2005; SPILLER, 2007); inflamações persistentes, resultantes do desequilíbrio das citocinas regulatórias como a IL-10 (GONSALKORALE, 2003); ao fato de que cerca de 7-31% dos pacientes desenvolvem SII após gastroenterite infecciosa (SPILLER, 2004; CRENTSIL, 2005; SPILLER, 2007); e ao dano na mucosa e rompimento do equilíbrio da microbiota comensal do intestino causada por infecções de organismos patogênicos. Todos estes fatores podem prolongar a disfunção intestinal e levar a SII pós- infecciosa (SII-PI) (SPILLER, 2007).

Apesar de a hipótese da SII- PI não ser nova, a investigação de seus mecanismos é relativamente recente, e alguns autores sugerem a existência de anormalidades na mucosa, contradizendo o dogma segundo o qual a SII é isenta de alterações estruturais (SPILLER, 2004; SPILLER, 2006).

Um achado interessante é o aumento do número de mastócitos nas mucosas do cólon, jejuno e íleo terminal, e linfócitos intraepiteliais no cólon de pacientes com SII, tanto pós- infecciosa como inespecífica; além da grande quantidade de mastócitos ativados na proximidade das terminações nervosas de pacientes com SII, o que pode explicar a hipersensibilidade visceral (dor abdominal) dos pacientes com SII (SPILLER, 2006; MEARIN, 2009). Desta forma, a ativação imune e inflamatória parece ser o fator desencadeante da SII pós- infecciosa (CRENTSIL, 2005).

A DII tem sido comparada a SII por alguns autores, sugerindo que a SII deveria ser classificada como mais um tipo de DII. Isto se deve a alguns fatores como a similaridade nos sintomas, relação com história familiar, e alguns fatores predisponentes em comum, como

história prévia de gastroenterite aguda. Além disso, alguns autores acreditam na presença de inflamação em ambas, o que contribui para a dificuldade e demora na conclusão do diagnóstico (NIELSEN, 1997; FOLEY, 2007; MEARIN, 2009).

Alguns dos fatores de risco conhecidos para SII são o gênero feminino, a duração da diarreia e gravidade da infecção inicial, a toxicidade bacteriana, o aumento na contagem de células enteroendócrinas e fatores psicológicos adversos como neuroses, hipocondria, ansiedade, depressão e somatização (SPILLER, 2004; SPILLER, 2006; SPILLER, 2007). Sendo a gastroenterite o fator de risco mais importante para o desenvolvimento da SII pós- infecciosa (SPILLER, 2004; AKIHO, 2005.1; COLLINS, 2005). Muitos marcadores genéticos têm sido associados com a SII, como por exemplo: IL-10, TNF, TGF- $\beta$ 1, SERT, receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e proteínas G (PARK, 2005).

Enquanto a inflamação e a ativação imune da mucosa podem ter um papel na SII, fatores psicológicos são comuns em alguns pacientes (BARKHORDARI, 2009).

A SII pode ser classificada (formas clínicas) de acordo com o hábito intestinal predominante que pode ser: a) Diarreia (forma diarreica – SII-D); b) Constipação ou obstipação (forma obstipante ou constipante - SII-C) e Alternante ou mista (alterna diarreia e constipação - SII-A) (TALLEY, 1995; QUILICI, 1999; GEERAERTS, 2006). Uma quarta forma clínica, menos comum, a SII não classificada, tem sido sugerida (HOTOLEANU, 2008).

A fisiopatologia da SII permanece não esclarecida e o tratamento é sintomático (paliativo), podendo envolver o uso de agentes antidiarreicos, laxantes, dieta rica em fibras, baixas doses de antidepressivos, antiespasmódicos para dor e terapias alternativas como psicoterapia e hipnoterapia (MACH, 2004; SPINELLI, 2007). O melhor tratamento é o que abrange aspectos clínicos, psicológicos e nutricionais (QUILICI, 1999).

Alguns estudos foram desenvolvidos com a finalidade de identificar possíveis marcadores genéticos de predisposição ou proteção ao desenvolvimento desta doença (GWEE, 2003; DINAN, 2006; AKIHO, 2005.1; PARK, 2005). Recentemente foi sugerida a existência de fatores genéticos associados à SII com base nos resultados de estudos com diferentes abordagens: a) de agregação familiar; b) estudos em gêmeos e c) de associação de polimorfismos genéticos (HOTOLEANU, 2008). Dentre os possíveis marcadores, foram realizados estudos para avaliar a associação de genes de citocinas pró-inflamatórias ou regulatórias e a SII (GWEE, 2003;

GONSALKORALE, 2003; WANG, 2006; PARK, 2005; DINAN, 2006; BARKHORDARI, 2009).

Os polimorfismos em genes de citocinas pró- e anti- inflamatórias estão dentre os vários mecanismos dependentes do hospedeiro que podem favorecer o desenvolvimento da SII (MEARIN, 2009). Alguns autores relatam associação entre polimorfismos em genes de citocinas e os níveis de produção destas moléculas, sugerindo papel na SII (GONSALKORALE, 2003; VAN DER VEEK, 2005; WANG, 2006; BARKHORDARI, 2009). A ancestralidade genética está entre os fatores que podem influenciar a herança do polimorfismo em genes de citocinas e consequentemente frequências alélicas de polimorfismos variam entre indivíduos de diferentes etnias (COX, 2001; HOFFMANN, 2002; VISENTAINER, 2008).

Não foi encontrado nenhum destes estudos em indivíduos brasileiros acometidos pela SII. Desta forma, uma abordagem molecular visando identificar fatores genéticos relacionados ao desenvolvimento da SII, particularmente em brasileiros, baianos, é muito relevante. Esta abordagem poderá contribuir para uma melhor compreensão da patogênese da doença, suas diferentes formas clínicas, o perfil étnico dos indivíduos acometidos pela SII e a identificação de potenciais marcadores de proteção ou suscetibilidade à doença.

### **1.1.1 Diagnóstico / Aspectos Clínicos**

O diagnóstico da SII é fundamentado numa série de critérios clínicos e investigações clínico/laboratoriais para excluir desordens orgânicas do intestino. O critério de Manning (MANNING, 1978) foi o primeiro critério criado para definir SII baseado em sintomas clínicos, seguido pelo critério de Kruis (KRUIS, 1984). Estes dois critérios deram suporte ao contemporâneo critério de Roma I, Roma II e, posteriormente, Roma III (LONGSTRETH, 2006). A classificação da consistência das fezes é baseada na escala Bristol de Forma das Fezes, que categoriza a consistência e correlaciona com o trânsito intestinal (HEATON, 1994; LEWIS, 1997).

Os critérios diagnósticos de Roma III, para desordens funcionais intestinais, são largamente utilizados em pesquisas e na clínica. O diagnóstico fundamenta-se na presença de dor ou desconforto abdominal recorrente por pelo menos três meses, não necessariamente consecutivas, sendo durante seis meses precedentes ao diagnóstico, na ausência de alterações



estrutural ou bioquímica, associado a dois ou mais fatores a seguir delineados (THOMPSON, 1999; DROSSMAN, 2006):

- (1) Alívio com defecação;
- (2) Início associado com uma mudança na frequência das fezes;
- (3) Início associado com uma mudança na forma (aparência) das fezes.

Os seguintes sintomas cumulativamente suportam o diagnóstico de SII:

- (1) Menos de 3 defecações/semana;
- (2) Mais de 3 defecações/dia;
- (3) Fezes duras ou grumosas;
- (4) Fezes moles ou aquosas;
- (5) Esforço durante movimento intestinal;
- (6) Urgência fecal;
- (7) Sensação de movimento intestinal incompleto;
- (8) Presença de muco nas fezes;
- (9) Plenitude ou aumento do volume abdominal.

Estes sintomas podem ser usados para classificar os pacientes em SII-D, SII-C ou SII-A. Os pacientes também podem queixar-se de pirose ou azia, dor de coluna, cefaléia, poliúria, dores musculares, menorrágia, dispareunia, ansiedade e depressão (QUILICI, 1999; MACH, 2004).

### **1.1.2 Dados Epidemiológicos**

A SII é um dos distúrbios funcionais digestivos mais frequentes e com maior impacto socioeconômico do mundo (MEARIN, 2009); Segundo a Associação Americana de Gastroenterologia, a SII constitui cerca de 28 % das consultas aos especialistas. Afeta 10% a 20% da população mundial e tem um grande impacto na qualidade de vida e no custo de atenção à saúde (MACH, 2004; PODOVEI, 2006; SPINELLI, 2007; HOTOLEANU, 2008 ).

Nos EUA (Estados Unidos da América), Europa e Ásia a prevalência é de cerca de 10% a 20%. Na América Latina, a prevalência oscila entre 9% a 18% (VALENZUELA, 2004).

Em geral, a SII pode afetar pessoas de todas as idades; com uma média de 42 anos. Aproximadamente 50% dos pacientes referem o início dos sintomas antes dos 35 anos, a primeira consulta ocorre entre 30 a 50 anos de idade, e diminui após a sexta década de vida. Em pessoas com idade superior a 60 anos, doenças orgânicas do trato gastrointestinal como, por exemplo, a DII, torna-se mais comuns. As mulheres são três a quatro vezes mais acometidas pela SII do que os homens; apresentam sintomas mais frequentes e mais graves e procuram assistência médica mais comumente (MACH, 2004; VALENZUELA, 2004).

Dados epidemiológicos da SII no Brasil são escassos. O único estudo nacional de magnitude encontrado foi realizado por Quilici e colaboradores (1999), e mostra que a prevalência da SII é de 10%, a idade dos pacientes com SII variou de 12 a 89 anos; foi observado predomínio do gênero feminino (58,6%) em relação ao masculino (41,4%); a dor abdominal foi o sintoma clínico mais relatado (95,2%) e a forma alternante (mista) foi a mais frequente (41%).

### **1.1.3 A Síndrome do Intestino Irritável em diferentes populações**

Alguns estudos mostram que a prevalência da SII é similar em brancos e negros, sugerindo que o grupo étnico não é um fator determinante para esta doença (MACH, 2004; PODOVEI, 2006).

Contudo, alguns trabalhos mostram diferenças na prevalência da SII em diferentes populações. Em estudo realizado por Lule (2002), a prevalência da SII nos 3472 negros Kenianos foi de 8%, maior em homens e a forma clínica mais prevalente foi a constipação. A média de idade foi 40 anos (11 - 75 anos), sendo mais prevalente na terceira década de vida.

Gwee e colaboradores (2004) estudaram 3000 indivíduos com SII em uma população de Cingapura (sul da Ásia). Não foi encontrada diferenças quanto à idade, o gênero e a distribuição racial em relação à população geral. A prevalência da SII foi cerca de 10% e as pessoas com idade inferior a 50 anos foram as mais atingidas. A forma constipante foi mais comum do que a diarréica (51% x 12,8%) nesta população.

A prevalência de SII em 1298 chineses de Hong Kong utilizando os critérios de Roma II foi de 3,6 % em homens e 3,8% em mulheres, sendo mais prevalente em indivíduos classificados com idade inferior a 30 anos (LAU, 2002). E em trabalho realizado por Dong e colaboradores (2005), a prevalência da SII em crianças e adolescentes da China (6 a 18 anos) foi de 13,25%,

sendo maior nas meninas e em indivíduos classificados como brancos. Estes mesmos autores observaram disparidade na prevalência entre populações de diferentes áreas geográficas: Heilongjiang (14%) e em Shanghai (12%).

Em uma população de 990 indivíduos (320 brancos e 670 afroamericanos) do estado americano Mississippi a SII foi 2,5 vezes mais prevalente em brancos quando comparados aos afroamericanos baseado nos critérios de Roma II (WIGINGTON, 2005).

A prevalência da SII segundo os critérios de Roma III foi relativamente baixa em iranianos adultos (1,1%). O gênero feminino foi o mais acometido, o sintoma mais relatado foi a dor abdominal que aliviava com a defecação e a mudança na aparência e frequência das fezes. A forma clínica mais comum foi a constipação (52%). (KHOSHKROOD-MANSOORI, 2009).

Além da influência da etnia, estas divergências podem ser atribuídas ao uso de diferentes critérios diagnósticos (LAU, 2002) e influências de fatores culturais e sociais (PODOVEI, 2006).

## 1.2 CITOCINAS

As citocinas são proteínas solúveis de baixo peso molecular que podem ser produzidas por quase todos os tipos de células e fazem parte de uma família de proteínas ou glicoproteínas reguladoras que modulam o crescimento, a multiplicação, a migração e a diferenciação das células, mais significativamente das células do sistema hematopoiético (HOFFMANN, 2002; AOKI, 2004)

As principais funções das citocinas se relacionam com modulação da resposta do sistema imune, com o crescimento e diferenciação celular e reações inflamatórias (LETTERIO, 1998; GARCIA, 1999). Estas são classificadas de acordo com a ação, em pró-inflamatórias (Th1) ou regulatórias (Th2); quanto à estrutura, em secundária ou terciária (HOLLOWAY, 2001). E são essenciais para o desenvolvimento e funcionalidade de ambas as respostas imunes inata e adaptativa (SMITH, 2009).

As citocinas estimulam ou inibem determinadas funções celulares a partir da ligação a receptores específicos na superfície da célula alvo, sendo iniciada a transdução de sinal e vias de segundo mensageiro dentro da célula (HANADA, 2002; KEEN, 2002.2; SMITH, 2009). As citocinas podem ter efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos. As suas funções têm sido

estudadas em diversas condições mórbidas do trato digestivo, participando de processos tais como: Quimiotaxia de leucócitos e reação inflamatória local e à distância (HONG-SHAN, 2003).

Os níveis de produção de citocinas podem ser influenciados pelos polimorfismos genéticos em seus genes. Polimorfismo genético é a coexistência de formas alélicas múltiplas para um mesmo *locus* cromossômico, como componentes estáveis, presente em pelo menos 1% da população. Alguns polimorfismos podem ser resultantes de uma mutação única ou constituírem uma série alélica. Algumas mutações podem ser funcionais, afetando o nível de expressão ou a ação da proteína; outras possibilitam o surgimento de proteínas com diferentes atividades ou, ainda, criam proteínas mutantes que não são funcionais (BIDWELL, 1999; HOLLOWAY, 2001).

Os genes de citocinas são polimórficos em sítios específicos e certas mutações localizadas dentro de regiões codificantes ou reguladoras estão associadas com baixa ou alta produção de determinada citocina. Inúmeros estudos de associação com doenças têm sido publicados, principalmente envolvendo diferentes SNP (Polimorfismo de único nucleotídeo). Os SNPs podem afetar a expressão de genes e a estabilidade ou estrutura da proteína (BIDWELL, 1999; BIDWELL, 2001; SMITH, 2009). É importante ressaltar que existem diferenças nas frequências alélicas em genes de citocinas em diferentes indivíduos ou populações, levando a diferentes níveis de expressão destas citocinas (COX, 2001; HAUKIM, 2002; HOFFMANN, 2002).

### **1.2.1 Fator de transformação do crescimento-beta 1 (TGF- $\beta$ 1)**

O TGF- $\beta$ 1 é uma proteína pleiotrópica que possui um papel significativo na modulação, no crescimento celular e diferenciação de uma grande variedade de tipos celulares e na produção e degradação de matriz celular. É produzida por leucócitos, incluindo linfócitos B e T, macrófagos, células dendríticas, atuando de maneira autócrina ou parácrina para controlar a diferenciação, a proliferação e o estado de ativação destas células imunes (LETTERIO, 1998). Também pode ser produzido por plaquetas, fibroblastos, osteoclastos e osteoblastos, atrócitos e células da micróglia (GOVINDEN, 2003). O TGF- $\beta$ 1 é um importante imunomodulador da resposta imune: atua como pró-inflamatório em baixas concentrações, e anti-inflamatório em altas concentrações (OMER, 2000; BROWN, 2002). Na condição de citocina pró-inflamatória modula a expressão de moléculas de adesão, promove a quimiotaxia dos leucócitos e fibroblastos até os locais de lesão. O TGF- $\beta$ 1

atua como anti-inflamatório e reparador de lesões, estimulando os macrófagos e os fibroblastos a aumentarem sua capacidade de síntese de proteínas da matriz extracelular e inibindo células uma vez que tenham se tornado ativadas; suprime a produção de TNF e de óxido nítrico pelos macrófagos, inibe a produção de IFN- $\gamma$  e TNF pelas células NK e possuem ação antagônica ao IFN- $\gamma$  (LETTERIO, 1998; BROWN , 2002). Além disso, é sugerida sua ação na contração do músculo liso por aumentar a expressão de COX-2 e produção de PGE2 (AKIHO, 2005.1). A produção aumentada do TGF- $\beta$ 1 tem sido associada com o desenvolvimento de doenças como câncer, aterosclerose, doenças fibróticas, doenças auto-imunes e susceptibilidade a infecções oportunistas (GRAINGER , 1999; BENDICHO , 2005).

O TGF- $\beta$ 1 é codificado por gene localizado no cromossomo humano no *locus* 19q13.1 (LETTERIO, 1998). Em estudos sobre a regulação genética na produção de TGF- $\beta$ 1, foram identificados alguns polimorfismos genéticos importantes (CAMBIEN , 1996; AWAD , 1998; GRAINGER , 1999). O polimorfismo +869 T>C do códon 10 (Leu>Pro) pode resultar na redução da produção da proteína TGF- $\beta$ , *in vivo*. Similarmente, o polimorfismo +915 G>C (Arg>Pro) do códon 25 também pode resultar na diminuição da produção de TGF- $\beta$  *in vitro*. Este tipo de polimorfismo altera a sequência de aminoácido da respectiva proteína (AWAD , 1998). As mutações no códon 10 e no códon 25 também foram associadas com o fenótipo de alto produtor de TGF-  $\beta$ 1 (HUTCHINSON, 1998; GRAINGER, 1999).

Quanto à associação deste fenótipo com a presença do alelo no códon 10 há divergências em alguns estudos (HUTCHINSON, 1998; SUTHANTHIRAN, 2000). Apesar dessas diferenças é aceito que os polimorfismos no códon 10 e 25 determinam o fenótipo de alto ou baixo produtor dessa citocina (HUTCHINSON, 1998; GRAINGER, 1999; STANCZUK , 2002).

Em estudo realizado por Awad e colaboradores (1998) foi encontrado que indivíduos com genótipo homozigoto GG (+915) produziam significativamente mais TGF- $\beta$  quando comparados com os heterozigotos.

### 1.2.2 Interferon-gama (IFN- $\gamma$ )

O IFN-  $\gamma$  é uma citocina produzida pelos linfócitos T auxiliares do tipo Th1, pelos linfócitos T citotóxicos e pelas células NK. O papel mais importante do IFN-  $\gamma$  encontra-se nas respostas

inflamatórias (PRAVICA, 1999). Sua atividade principal é a ativação dos macrófagos, levando a inibição de replicação de um amplo espectro de agentes infecciosos, particularmente de patógenos intracelulares. O IFN- $\gamma$  atua sobre os monócitos e os macrófagos e os ativam aumentando os mecanismos necessários para a lise intracelular dos microrganismos fagocitados, aumentando sua atividade tumoricida e os induzindo a liberar ao exterior uma maior quantidade de TNF (BOEHM, 1997). O IFN- $\gamma$  também suprime a ativação das células T auxiliares do tipo Th2 e favorece a diferenciação das células T CD4<sup>+</sup> virgens para um padrão de respostas Th1 em cooperação com a IL-12 (CARTWRIGHT, 1999).

O gene do IFN- $\gamma$  é localizado no cromossomo humano no *locus* 12q14. Foi descrito no homem um polimorfismo de número de repetições de dinucleotídeos CA, de comprimento variável, no primeiro íntron desse gene, a 875bp a jusante do sítio de início de transcrição da primeira região codificadora (HALLORAN, 1993).

Pravica e colaboradores (1999) descreveram um polimorfismo de único nucleotídeo no gene *IFNG* na posição +874 T>A, na porção 5' da região microssatélite de dinucleotídeos CA que se correlaciona com o alelo alto produtor de IFN- $\gamma$  *in vitro*. Foi descrita uma menor frequência do homozigoto T/T (altos produtores) no gene do IFN- $\gamma$  em um grupo de pacientes com tuberculose crônica (LIO, 2002).

### 1.2.3 Interleucina 6 (IL-6)

A interleucina (IL-6) é uma citocina multifuncional que possui uma função central na defesa do hospedeiro devido ao seu amplo espectro de atividade no sistema hematopoiético e imune, como diferenciação de células B para plasmócitos e de monócitos para macrófagos (BERGHE, 2000; DIEHL, 2002). Além disso, é uma importante mediadora da resposta de fase aguda (SMITH, 2009). É produzida por variados tipos de células, incluindo fibroblastos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, células endoteliais, células gliais e queratinócitos em resposta a estímulos diversos (DIEHL, 2002).

A expressão aumentada da IL-6 leva a uma série de eventos típicos da inflamação, compreendendo a leucocitose, trombocitose, ativação de linfócitos (BERGHE, 2000). A IL-6 é um potente ativador linfocitário, sendo a citocina que melhor serve como fator de diagnóstico precoce e predição de gravidade (GUEDES, 2004). A IL-6 é uma citocina predominantemente pró-

inflamatória, mas uma ação antiinflamatória pode ocorrer pela inibição da IL-1 $\beta$  e TNF (TILG, 1997; CUZZOCREA, 2002).

O gene da IL-6 está localizado no *locus* 7p21 do cromossomo humano. São descritos quatro polimorfismos na região promotora do gene da IL-6, incluindo o polimorfismo *IL6* - 174G>C (TERRY, 2000; ISHIHARA, 2002).

Alguns trabalhos foram realizados, buscando associações principalmente entre o polimorfismo *IL6*-174G>C e determinadas condições patológicas (ISHIHARA, 2002). Os indivíduos com genótipo homozigoto para o alelo G na posição -174G>C e heterozigoto G/C para este mesmo gene mostraram maiores níveis de IL-6 no plasma, alta atividade transcricional e maior indução de resposta do que indivíduos homozigotos para o alelo C (OLIVIERE, 2002). Ishihara (2002), não observou associação entre este polimorfismo e pacientes com DII.

#### **1.2.4 Interleucina 10 (IL-10)**

A IL-10 representa uma das mais importantes citocinas imunorregulatórias. É produzida por macrófagos, células B, células T e uma variedade de outras células como mastócitos, queratinócitos e algumas linhagens de células tumorais. O efeito da IL-10 na resposta imune é principalmente a inibição dos monócitos e macrófagos e inibição da síntese e atividade de muitas citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF (ZOU, 2001; MOCELLIN, 2003).

A IL-10, conhecida inicialmente pela sua propriedade de inibir a ativação e a ação efetora das células T, monócitos e macrófagos, é uma citocina multifuncional com efeitos diversos em diferentes células hematopoiéticas. Uma de suas principais funções é limitar a resposta inflamatória, porém, possui ações tanto imunoestimulatórias como imunossupressoras. Além disso, a IL-10 regula o crescimento e a diferenciação das células B, células NK, células T citotóxicas e auxiliares, mastócitos, granulócitos, células dendríticas, queratinócitos e células endoteliais (MOORE, 2001)

Foi observado que camundongos nocauteados para a IL-10 apresentavam aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e neles é frequente o aparecimento de doenças inflamatórias (CONTI, 2003). Os camundongos que não produzem IL-10 também não podem controlar a produção de citocinas pelos macrófagos estimulados com endotoxinas (toxinas

bacterianas). Por essa razão, têm níveis elevados de TNF, IL-1, IL-6 e IL-8 no soro (KOTENKO, 2002).

O gene da IL-10 está localizado no cromossomo no *locus* 1q31-q32. Este gene é altamente polimórfico e certos haplótipos estão associados com diferentes níveis de expressão dessa citocina (MÄURER, 2000). Foram descritos diversos polimorfismos, sendo que os que ocorrem nas posições -1082G>A, -819C>T e -592C>A influenciam a transcrição do gene e estão relacionados com maior ou menor produção da IL-10 (TURNER, 1997). Estes polimorfismos têm como consequência, modificar a atividade transcricional do gene. Devido ao desequilíbrio de ligação nas posições -819C>T e -592C>A, as possíveis combinações destes polimorfismos são os haplótipos GCC, ACC e ATA. O haplótipo GCC, quando em homozigose, confere o fenótipo previsto de alto produtor (TURNER, 1997); quando em heterozigose com os haplótipos ACC e ATA, confere o fenótipo previsto de produtor intermediário. Quanto aos haplótipos ACC e ATA, quando em homozigose ou heterozigose confere, o fenótipo previsto de baixo produtor (CRAWLEY, 1999).

### **1.2.5 Fator de necrose tumoral (TNF)**

O TNF é produzido especialmente por macrófagos e monócitos, embora também o seja por uma variedade de outras células como neutrófilos, linfócitos, células NK, mastócitos, células endoteliais e fibroblastos. O TNF é uma citocina pró-inflamatória com um espectro de atividade biológicas. O TNF estimula a ativação e a diferenciação de muitos tipos de células e possui um papel fundamental na patogênese de muitas condições inflamatórias, infecciosas e auto-imunes como sepse, artrite reumatóide e infecções causadas por micobactérias (WILSON, 1997). E tem sido apontada por exercer importante função nos estados inflamatórios crônicos como a doença inflamatória intestinal e é considerado um importante mediador de secreção colônica distal (RUGTVEIT, 1994).

Em estudo realizado por Wilson e colaboradores (1997), foi avaliado o papel do TNF em diversas infecções em camundongos nocauteados para produção de TNF. Os resultados deste estudo sugerem o importante papel do TNF na homeostasia de doenças infecciosas e da inflamação.



O gene do TNF está localizado na região de Classe III do MHC, altamente polimórfica, no *locus* 6p21.3 do cromossomo humano. A região 5' do *TNF* é altamente polimórfica, ocorrendo desequilíbrios de ligação, o que pode dificultar estudos do papel de um SNP isolado (HAJEE, 2001).

O polimorfismo *TNF* -308G>A tem como consequência, modificar a atividade transcricional do gene e foi designado TNF1 o alelo A e TNF2 o alelo G. O TNF2 foi associado ao fenótipo de alto produtor dessa citocina (WILSON, 1993).

### 1.2.6 Influência das citocinas no desenvolvimento da SII

O provável papel das citocinas na patogênese da SII começou a ser sugerido em dois estudos recentes. Wang e colaboradores (2004) mostraram, por meio de colonoscopias, o aumento da expressão do RNAm da IL-1 $\beta$  nas regiões do retossigmóide e íleo, de pacientes com SII pós-infecciosa. Gwee e colaboradores (2003) relataram aumento da expressão de IL-1  $\beta$  em biópsias retais de pacientes com gastroenterite aguda que desenvolveram SII, quando comparados com indivíduos que não desenvolveram SII após a gastroenterite. Mais tarde, o estudo realizado por Spiller (2007) mostra que os níveis de IL-1  $\beta$  estavam aumentados em pacientes que desenvolveram SII pós-infecciosa (SII-PI). Esses resultados sugerem uma regulação ineficiente da resposta inflamatória à infecção inicial em pacientes com SII-PI (COLLINS, 2005; SPILLER, 2007).

Em estudo realizado por Foley e colaboradores (2007) IFN- $\gamma$  e TNF foram associadas a diminuições significativas nos níveis de RNAm e proteína do SERT assim como nas funções deste transportador. Alterando a expressão do SERT, TNF e IFN- $\gamma$ , podem ter contribuído para presença de motilidade intestinal alterada vista em SII.

Resultados de um estudo realizado por Akiho e colaboradores (2005.1) sugerem que citocinas do tipo Th2 estimulam a hipercontratibilidade muscular durante a infecção aguda por ação direta no músculo liso. Esta alteração é mantida após a infecção, pela expressão aumentada de TGF- $\beta$  que estimulam a expressão do COX-2 (ciclooxigenase-2) e promove produção de PGE2 (prostaglandina E2) mantendo, desta forma, a hipercontração. O que sugere o papel do TGF- $\beta$ 1 na patogenia da SII-PI.

O'Mahony e colaboradores (2005) analisaram o perfil de citocinas pró- e anti-inflamatórias secretadas por monócitos periféricos e verificaram que o nível de secreção de IL-10, em relação a IL-12, uma citocina pró-inflamatória, foi menor em pacientes com SII quando comparados com os controles.

Dinan e colaboradores (2006) concluíram que a SII pode estar associada a níveis altos de cortisol e de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e a quimiocina IL-8, o que se relaciona com uma maior ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, principalmente em SII-C. Não foi observada diferença nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 entre os grupos.

Posteriormente, em estudo realizado por Liebrechts e colaboradores (2007) pacientes com SII-D apresentaram liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF, IL-1 $\beta$  e IL-6) aumentada, o que pode estar associado aos sintomas abdominais apresentados e à ansiedade amplamente identificada nestes pacientes.

Assim, evidências genotípicas e fenotípicas indicam que, em alguns pacientes com SII, há uma tendência a um estado pró-inflamatório crônico que provavelmente favorece a resposta Th1 pelo aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (COLLINS, 2005).

## 1.2 POLIMORFISMOS EM GENES DE CITOCINAS E A SII

A análise do polimorfismo dos genes das citocinas e a relação com a gravidade e a susceptibilidade a doenças podem contribuir com o entendimento da patogênese, heterogeneidade clínica e apontar novos alvos terapêuticos (OLLIER, 2004).

Há autores que discordam da possibilidade de que polimorfismos genéticos podem exercer algum papel na patogenia ou etiologia da SII (PARK, 2005). Entretanto, dados crescentes sugerem que desregulação na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, e anti-inflamatórias, como IL-10, podem estar associadas a polimorfismos herdados. Como consequência pode ocorrer má regulação do processo inflamatório, resultando numa inflamação persistente (COLLINS, 2005; CRENTSIL, 2005).

Van der Vek e colaboradores (2005) observaram maior prevalência do genótipo heterozigoto G/A da posição -308 (fenótipo previsto de alta produção da citocina TNF) em um grupo de pacientes com SII comparada ao grupo controle, enquanto que a frequência do genótipo homozigoto A/A (baixa secreção) foi similar entre SII e controle. Outro aspecto interessante é a

maior prevalência da combinação simultânea de genótipos responsáveis pela baixa secreção de IL-10 e alta secreção de TNF em indivíduos com SII comparados com controles e da SII-D quando comparada com as outras formas clínicas (COLLINS, 2005; VAN DER VEEK, 2005).

Gonsalkorale e colaboradores (2003), analisando genótipos de pacientes com SII e controles sadios, encontraram menores frequências do genótipo de alta produção de IL-10 (-1082 G/G) e maiores frequências do genótipo de baixa produção de IL-10 (-1082 A/A) em pacientes com SII. A frequência genotípica de polimorfismos do *TGFBI* (códon 10 e 25) também foi analisada, porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo de pacientes e o de indivíduos controles.

Wang e colaboradores (2006) investigaram a possível associação entre os polimorfismos *IL10* -1082, -819 e -592 e a SII-D. Comparados com pacientes sadios, pacientes com SII-D apresentaram maior frequência dos alelos -592 A e -819 T e genótipos da IL-10 (-819 T/T e -592 A/A) associados à predisposição genética à baixa produção desta citocina.

Recentemente, os resultados do estudo de Barkhordari e colaboradores (2009) com polimorfismos em genes de citocinas pro-inflamatórias (IL-6, TNF e IL-1), mostraram que o alelo G e o homozigoto G/G do polimorfismo *IL-6* -174 G>C foi maior enquanto que o heterozigoto G/C foi menor em pacientes com SII quando comparados com o controle. Sugerindo que este polimorfismo pode interferir na susceptibilidade à SII, podendo desempenhar um papel importante na patogênese desta doença.

#### 1.4 DISTRIBUIÇÃO ÉTNICO-GEOGRÁFICA DE POLIMORFISMOS DE CITOCINAS

Reynard e colaboradores (2000), estudaram os polimorfismos nos genes *TNF* -308 G>A, *IL2* -330 T>G, *IFNG* +874T>A, e *IL10* -1082 G>A, -819 C>T e -592 C>A em caucasianos do sudeste da Inglaterra. As frequências alélicas dos polimorfismos estudados foram semelhantes aos de outras populações caucasianas do Reino Unido. No entanto, diferenças foram observadas quando comparados com outros grupos: orientais, africanos e outras populações caucasianas.

Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes na distribuição dos alelos e genótipos de ambos os genes *IL2* e *IL6* -174 G>C em uma população americana de 102 indivíduos classificados como brancos e 43 como afro-americanos. Quanto aos genes *TNF*, *IL10*, *IFN* e *TGFBI* não foram encontradas diferenças (COX, 2001).

Poli e colaboradores (2002) compararam a genotipagem de polimorfismos nos genes *IL6*, *IL10*, *TNF*, e *IFNG* entre 363 italianos caucasianos e outras populações. As frequências dos alelos G e A do *TNF* -308 G>A foram estatisticamente significantes quando comparados com as populações japonesa e inglesa, e não foram significantes quando comparados com a africana. Para os alelos da IL-10 nas posições -1082 G>A, -819 C>T e -592 C>A as frequências foram estatisticamente significantes quando comparadas com as populações inglesa e chinesa. E as frequências da IL-6 foram significantes estatisticamente quando comparadas com a população inglesa. Esses dados sugerem que existe heterogenicidade nas frequências de polimorfismos de citocinas entre diferentes populações caucasianas.

Posteriormente, Hoffmann e colaboradores (2002) estudaram o padrão de herança dos polimorfismos nos genes *IL2*, *IL6*, *IL10*, *TNF*, *TGFB1* e *IFN* em uma população diversa etnicamente (216 brancos, 58 negros, 25 hispânicos e 31 asiáticos). Foram encontradas diferenças na distribuição dos polimorfismos de citocinas entre as diferentes populações étnicas. Negros, hispânicos e asiáticos, quando comparados a brancos, mostraram diferenças no perfil de herança do alelo G do *IL6* e do genótipo da *IL10*, ambos que resultam na alta expressão da respectiva citocina. Descendentes de asiáticos quando comparados a brancos apresentaram um aumento do genótipo *IFNG* +847 T/T que resulta em baixa expressão do INF- $\gamma$ . Em contraste, não foi encontrado diferenças significantes em relação ao *TNF*.

No estudo de Ness e colaboradores (2004) o genótipo G/G do polimorfismo *IL6* -174 G>C foi 36,5 vezes mais comum em afroamericanas, e os homozigotos do gene *IL10* -819 T/T e -1082 A/A foram menos frequentes quando comparadas às brancas.

Um estudo realizado por Visentainer e colaboradores (2008), mostra a distribuição das frequências dos polimorfismos dos genes *TNF*, *IFNG*, *IL6*, *IL10* e *TGFB1* em 108 indivíduos da região sul e 106 do sudeste brasileiro. Não foram observadas diferenças significantes nas distribuições alélicas e genótípicas de nenhum polimorfismo estudado em relação às duas populações brasileiras. Diferenças estatisticamente significante na distribuição dos alelos e genótipos dos genes *IL6* e *IL10* foram observadas entre a população africana e a brasileira. O alelo G e genótipo *IL6* -174 G/G, assim como os genótipos *IL10* -819 T/C e -592 A/C foram mais frequentes na população africana do que na população brasileira. Já o genótipo *IL10* -1082 G/G foi mais frequente na população brasileira.

Os resultados destes estudos mostram que o perfil de determinados polimorfismos em genes de citocinas são fortemente associados ou influenciados pela etnicidade.

### 1.5 MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE (AIMs)

Os brasileiros compõem uma das mais heterogêneas populações do mundo, sendo resultado de cinco séculos de cruzamento interétnicos entre povos de três continentes: os colonizadores Europeus, representados principalmente por portugueses, espanhóis, italianos e holandeses; escravos africanos e indígenas (chamados nativos americanos ou ameríndios) (ALVES-SILVA, 2000). Diversos estudos, utilizando marcadores moleculares informativos de ancestralidade, têm confirmado o processo de miscigenação (ABÉ- SANDES, 2004; PARRA, 2003; HUNEMEIER, 2007).

Estes marcadores moleculares autossômicos foram denominados por Shriver e colaboradores (2003) de marcadores informativos de ancestralidade (do inglês, AIMs – *Ancestry Informative Markers*). Um AIM pode ser compreendido como qualquer marcador genético que apresente alto diferencial de frequência alélica ( $\delta > 0,30$ ) entre duas ou mais populações distintas e bem definidas geográfica e/ou etnicamente (MARTÍNEZMARIGNAC, 2004; SHRIVER, 1997). Os AIMs são também conhecidos como alelos específicos de populações (do inglês, PSAs – *Population-specific alleles*) (PARRA, 1998).

Os AIMs são os marcadores ideais para estimativas eficazes de mistura populacional (PARRA, 1998; PARRA, 2003) e tornam possíveis estimativas de mistura individual (SHRIVER, 2003).

Recentemente vem crescendo o interesse em pesquisas para avaliar e estimar o nível de miscigenação de populações, visto que a aplicação dos AIMs fornece importantes esclarecimentos sobre a associação entre características genotípicas, fenotípicas e doenças (diabetes tipo 2, obesidade, câncer de próstata, demência e hipertensão) (BONILLA, 2004; MARTÍNEZ-MARIGNAC, 2006; PARRA, 1998; SHRIVER, 2003).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

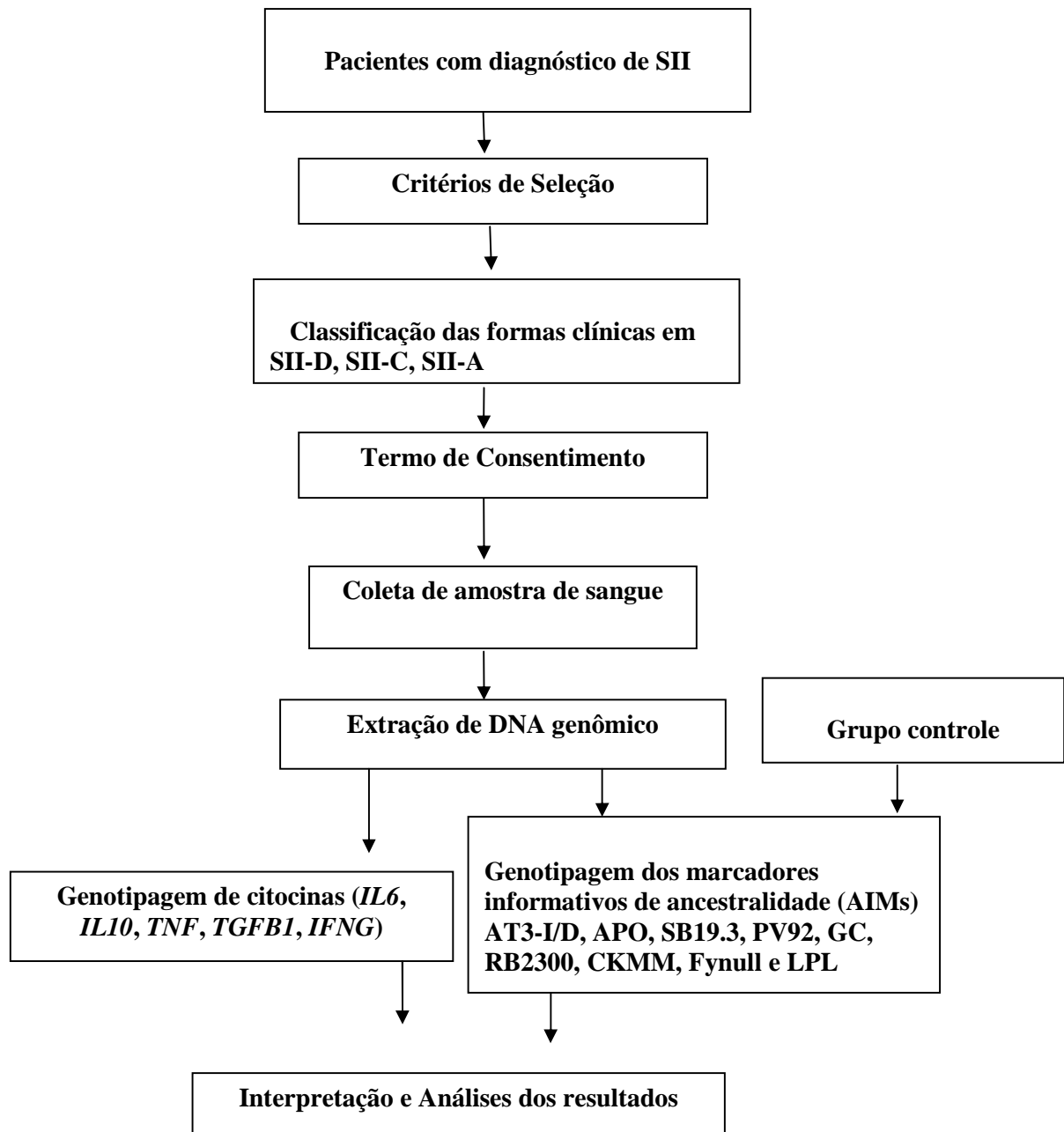
Estudar a possível associação entre os polimorfismos *TGFB1*, *IL6*, *IL10*, *TNF* e *IFNG* e a Síndrome do Intestino Irritável.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever as frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas de polimorfismos dos genes *TGFB1*, *IL6*, *IL10*, *TNF* e *IFNG* em uma amostra de pacientes com SII do Estado da Bahia;
2. Comparar as frequências observadas destes polimorfismos no grupo de pacientes com SII com aquelas observadas em um grupo controle;
3. Estimar e comparar a ancestralidade genômica do grupo de pacientes com SII e do grupo controle para verificar se são homogêneos do ponto de vista genético, utilizando marcadores moleculares informativos de ancestralidade (*AT3-I/D*, *APO*, *SB19.3*, *PV92*, *FY-null*, *LPL*, *CKMM*, *GC-\*1S*, *GC-\*1F* e *RB2300*);
4. Estimar e comparar a ancestralidade genômica entre os grupos de pacientes com diferentes formas clínicas da SII.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 DESENHO DO ESTUDO



### 3.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Este estudo é do tipo Caso-Controle, sendo o grupo caso constituído de 55 indivíduos com SII que atenderam aos critérios de inclusão e concordaram em participar da pesquisa mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A). Foram registrados em ficha individual os seguintes dados (APÊNDICE B):

- Dados demográficos: data de nascimento, gênero, etnia (baseado na classificação de Krieger , 1965), escolaridade, estado civil, ocupação;
- Dados clínicos referentes aos critérios diagnósticos. A avaliação clínica dos pacientes foi realizada no ambulatório do C-HUPES (Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos), na Clínica Gastro sob a supervisão do Dr. Jorge Guedes e na Clínica FTC (Faculdade de Tecnologia e Ciência) sob supervisão do Dr. Jardel Caetano. Os pacientes foram acompanhados por um período de dois anos consecutivos.

#### 3.2.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo os pacientes que satisfizeram os critérios de Roma III (DROSSMAN, 2006; LONGSTRETH, 2006) propostos para o diagnóstico de SII.

Os pacientes que tinham algum dos fatores de risco (idade superior a 60 anos; perda de peso superior a 1kg/mês; sangramento digestivo; febre ou outro sintoma sistêmico), só foram incluídos no estudo após comprovação da ausência de alterações estruturais na mucosa intestinal, mediante realização de um exame endoscópico (colonoscopia) ou enema baritado.

#### 3.2.2 Critérios de exclusão

- Idade inferior a 18 anos;
- Presença de co-morbidades (doença do colágeno; neoplasia; AIDS; doença celíaca; intolerância à lactose; pacientes submetidos a cirurgias abdominais; distúrbios tireoidianos);
- Mulheres grávidas
- Resultados de exames laboratoriais realizados no máximo um mês antes da consulta, com um dos seguintes achados: pesquisa de leucócitos fecais positiva; parasitológico de fezes



seriado (três amostras) positivo para helmintos ou protozoários; velocidade de hemossedimentação elevada; anemia.

### 3.2.3 Grupo Controle

O grupo controle histórico foi composto de 116 indivíduos aparentemente saudáveis, doadores de sangue do STS (Serviço de Transfusão de Sangue) (BENDICHO, 2004).

## 3.3 COLETA DE SANGUE

Foi coletado, de cada indivíduo, 5,0 mL de sangue total em tubo contendo EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético), que foi utilizado para obtenção de DNA genômico.

## 3.4 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico pelo método de “salting-out” modificado (MILLER, 1988). O sangue coletado foi homogeneizado e transferido 500 µL para um tubo do tipo eppendorf de 2,0 mL. Em seguida foram adicionados 1,0 mL de solução de lise de eritrócitos (Sacarose 1,6M; Triton X-100 1M; MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 1M; Tris-HCl pH 7,5;1M) e, após centrifugação (10.000 x g durante 1 min), o sobrenadante foi descartado. Este mesmo procedimento foi repetido para lavar o sedimento em 1,0 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Após centrifugação e descarte do sobrenadante, foi adicionado 80µL de tampão proteinase K 5X (NaCl 5M; EDTA pH 8,0 0,5M), 30µL de proteinase K (20mg/mL), 20µL de SDS 20% e 240µL de dH<sub>2</sub>O. Os tubos foram incubados durante 30 min a 55°C em banho-seco, com leve agitação do tubo a cada 10 min. Os tubos foram deixados à temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foram adicionados 100µL de NaCl 6M e os tubos foram agitados vigorosamente por 15 segundos, com posterior centrifugação (10.000 x g), durante 6 min, para a precipitação e sedimentação das proteínas. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 2,0 mL. Após mais uma centrifugação (10.000xg durante 3 min) para a remoção de proteínas residuais, o sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5 mL. Foi então adicionado 1,0 mL de etanol 99,5%(v/v) para a precipitação do DNA e, após nova centrifugação, o DNA precipitado foi

lavado com etanol 70%(v/v). Após descarte do etanol, os tubos foram descansados em papel toalha para evaporar o restante de etanol. As amostras de DNA foram ressuspensas em 100µL de dH<sub>2</sub>O e, posteriormente, congeladas a -20°C.

### 3.5 GENOTIPAGEM DE CITOCINAS (*IL6*, *IL10*, *TNF*, *IFNG*, *TGFBI*)

Foi utilizado o kit para genotipagem de citocinas da One Lambda Incorporation - “*Cytokine Genotyping Tray*”, contendo, cada um, 16 tubos de PCR, sendo um tubo controle negativo e 15 tubos com dois pares de iniciadores: um par com sequências específicas que amplificam seletivamente regiões regulatórias polimórficas dentro dos genes *TNF* -308G>A, *TGFBI* (10T>C, 25G>C), *IL10* (-1082G>A, -819C>T, -592C>A) , *IL6* -174G>C e *IFNG* +874T>A; o segundo par de iniciadores amplifica uma sequência controle.

A mistura para as reações de PCR (Mix) foi preparada conforme as instruções do fabricante: 180 µL de D-Mix (solução fornecida pelo fabricante, contendo dNTPs, sal sódico de vermelho de fenol, sacarose, gelatina, KCl, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, Tris.HCl), aos quais foram adicionados cerca de 1,9 µg de DNA teste e 5U de Taq polimerase. Após misturar os reagentes com auxílio de um agitador de tubos, 10 µL do Mix é distribuído em cada um dos tubos, exceto no de controle negativo, ao qual foi acrescentado o Mix sem DNA . Os tubos foram, então, selados com filme apropriado (termo-resistente, fornecido pelo fabricante) e colocados no termociclador, o qual foi previamente programado para os seguintes parâmetros: Um ciclo de 96°C por 130 segundos seguidos de 63°C por 60 segundos; nove ciclos de 96°C por 10 segundos e 63°C por 60 segundos; vinte ciclos de 96°C por 10 segundos, 59°C por 50 segundos e 72°C por 30 segundos; ciclo final de 4°C.

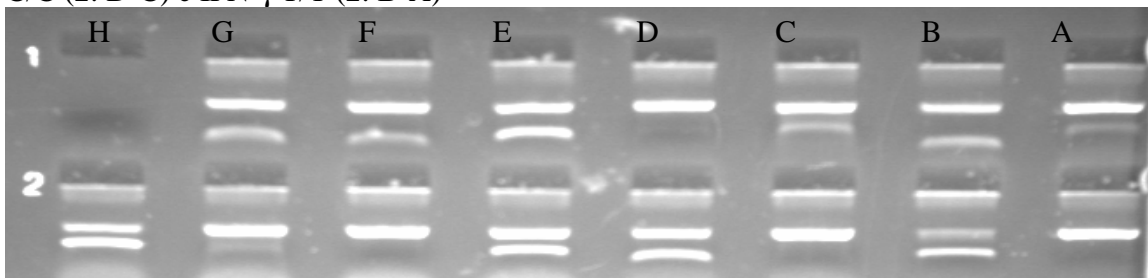
#### 3.5.1 Revelação do resultado em gel de agarose

Depois do processo de PCR, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados por coloração com brometo de etídio e exposição à luz ultravioleta. O gel de agarose 2,5% foi preparado com 0,75g de agarose (Invitrogen), 30 mL de tampão TBE1X (Tris-Borato 89mM; EDTA2mM pH 8.0), 10µL de brometo de etídio 1mg/mL. A cuba de eletroforese que é utilizada foi desenvolvida pela One Lambda de forma a

permitir a análise concomitante de 96 produtos de PCR em um curto tempo de migração. Assim, em um gel, foram analisados os resultados de PCR de seis diferentes amostras de DNA (16 reações para cada amostra de paciente). O gel foi recoberto com 10,0 mL de TBE 1X e o conteúdo de cada reação de PCR (10  $\mu$ L) foi transferido para o poço correspondente. A corrida eletroforética foi então realizada a 120-130V (~30 mA), durante 4 a 5 min.

Os resultados foram interpretados, com o uso de mapas para PCR-SSP fornecidos pelo fabricante do kit e está disponível no ANEXO A. A figura 1 mostra a imagem de um gel de agarose com a genotipagem de citocinas de um dos indivíduos do estudo.

Figura 1 - Imagem de gel de agarose a 1,5%, mostrando a genotipagem de um indivíduo: TNF G/A (1: G-F), TGF- $\beta$ 1 T/T e G/G (1: E-B), IL-10 GCC/GCC (1:A, 2: H-E), IL-6 C/C (2: D-C) e IFN- $\gamma$  T/T (2: B-A)



### 3.6 GENOTIPAGEM DOS MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE (AIMs)

Os marcadores utilizados neste estudo foram selecionados com base em dados da literatura a partir do diferencial de frequências alélicas ( $\delta$ ) em populações parentais Européia, Africana e Ameríndia. As frequências alélicas estão mostradas no Quadro 1 (SHRIVER , 2003).

Quadro 1- Frequências (alelo 1) dos AIMs estudados nas populações ancestrais.

	RB2300	AT3I/D	Sb19.3	APO	PV 92	FYnull	LPL	CKMM	GC-F	GC-S
Af	0,926	0,858	0,415	0,420	0,225	0,001	0,971	0,164	0,853	0,069
Eu	0,315	0,282	0,903	0,925	0,152	0,998	0,492	0,313	0,156	0,607
Am	0,175	0,061	0,645	0,977	0,792	1,000	0,442	0,904	0,339	0,542

Pop= População, Af = africano, Eu = europeu, Am= Ameríndio. Fonte = Shriver, 2003.

Foram analisados dez AIMs, sendo um polimorfismo do tipo inserção/deleção (indel): AT3-I/D; três inserções *Alu* (*APO*, *PV92*, *SB19.3*), e seis polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs): *CKMM*, *FY-null*, *LPL*, *RB2300*, *GC-1F* e *GC-1S* (APÊNDICE C). O Quadro 2 mostra a localização cromossômica dos *loci* analisados e populações parentais com maior frequência do alelo\*1. Por convenção, o alelo \*1 representa a presença da inserção para os polimorfismos indel e inserção *Alu* e a ausência do sítio de restrição para os SNPs (Parra , 1998). As regiões polimórficas dos *loci* *AT3-I/D*, *APO*, *PV92* e *SB19.3* foram amplificadas por PCR convencional (SAIKI , 1985; MULLIS , 1987). Os *primers* (iniciadores) utilizados estão mostrados no Quadro 3 e as condições de PCR foram: 1 ciclo com 94°C por 6 minutos e T° de pareamento por 2 minutos; seguido por 35 ciclos com 72°C por 1 minuto, 94°C por 30 segundos, T° de pareamento por 1 minuto e um ciclo final de 72°C por 10 minutos.

Os *loci* *GC* e *RB2300*, após a PCR convencional foram submetidos à digestão por PCR-RFLP (APÊNDICE D). As regiões polimórficas dos *loci* *LPL*, *FY-null* e *CKMM* foram analisadas por PCR em tempo real (RT-PCR) (APÊNDICE D). Os monitoramentos das fluorescências foram feitos no termociclador ABI Prism® 7700 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems). As condições do RT-PCR foram as seguintes: 1 ciclo a 50°C por 1 minuto; 1 ciclo a 94°C por 6 minutos; e, 40 ciclos a 94°C por 15 segundos/ 60°C 1 minuto. As sequências das sondas estão mostradas no Quadro 3.

Quadro 2 - Localização cromossômica dos *loci* analisados e populações parentais com maior frequência do alelo\*1

<i>Locus</i>	Tipo de polimorfismo	Número de RS	Localização cromossômica	População com maior frequência do Alelo*1
<i>AT3-I/D</i>	76bp indel	rs3138521	1q25.1	Africana
<i>Sb19.3</i>	Inserção <i>Alu</i>	rs3138524	19p12	Européia
<i>APO</i>	Inserção <i>Alu</i>	rs3138522	11q23.3	Européia
<i>PV92</i>	Inserção <i>Alu</i>	rs3138523	16q23.3	Ameríndia
<i>FY-Null</i>	A>G	rs2814778	1q23.2	Européia
<i>LPL</i>	T>C	rs285	8p21.3	Africana
<i>CKMM</i>	C>T	rs4884	19q13.32	Ameríndia
<i>GC-34nt**</i>	G>T	rs7041	4q13.3	
<i>GC-45nt**</i>	C>A	rs4588	4q13.3	
<i>RB2300</i>	C>T	rs2252544	13q14.2	Africana

\*\* = Estes dois diferentes polimorfismos no gene *GC*, um no nucleotídeo (nt) 34 e outro no 45, formam os alelos *GC\*1F* (mais frequente em africanos) , *GC\*1S* (mais frequente em europeus) e *GC\*2*.

Quadro 3 - Sequências de *primers* ou \*sondas e Temperatura de Pareamento (T°) da PCR dos *loci* estudados.

Locus	Sequência de <i>primers</i> ou sondas	Temperatura de Pareamento (T°)
<i>APO</i>	F: 5'-AAGTGCTGTAGGCCATTTAGATTAG-3' R: 5'-AGTCTTCGATGACAGCGTATACAGA-3'	50 °C
<i>PV92</i>	F: 5'-AACTGGGAAAATTTGAAGAGAAAGT-3' R: 5'-TGAGTTCTCAACTCCTGTGTGTTAG-3'	56 °C
<i>SB19.3</i>	F: 5'-TCTAGCCCCAGATTTATGGTAACTG-3' R: 5'-AAGCACAATTGGTTATTTTCTGAC-3'	63 °C
<i>AT3-1/D</i>	F: 5'-CCACAGGTGTAACATTGTGT-3' R: 5'-GAGATAGTGTGATCTGAGGC-3'	54 °C
<i>CKMM *</i>	5'-ACTTCTGGGCGGGGATCATGTCGTC[A/G] ATGGACTGGCCTTTCTCCA ACTTCT-3'	60 °C
<i>FY-null*</i>	5'-GGCCCTCATTAGTCCTTGGCTCTTA[C/T] CTTGGAAGCACAGGCGCTGACAGCC-3'	60 °C
<i>LPL*</i>	5'-AATTCAATGTCTCTTCATCTTTTAG[C/T] AGCTGTGGGGTTTTGTTGTTGTTCT-3'	60 °C
<i>RB2300**</i>	F: 5'-CCCGGGTGTGCGTAGGG-3' R: 5'-AACCCAGAATCCTGTCACCA-3'	60 °C
<i>GC-1F***</i>	F: 5'-AGATCTGAAATGGCTATTATTTTG-3' R: 5'-GGAGGTGAGTTTATGGAACAGC-3'	61 °C
<i>GC-1S****</i>	F: 5'-AGATCTGAAATGGCTATTATTTTG-3' R: 5'-GGAGGTGAGTTTATGGAACAGC-3'	61 °C

Enzima de restrição utilizada: \*\* Bam HI \*\*\* Sty I \*\*\*\* Hae III

### 3.7 ASPECTOS ÉTICOS

O Projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FTC (Faculdade de Tecnologia e Ciências) de Salvador/BA (ANEXO B). Todos os indivíduos incluídos no estudo assinaram o TCLE (APÊNDICE A).

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As frequências alélicas, a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg e a análise de diferenciação gênica foram realizadas pelo programa GENEPOP versão 3.4 (RAYMOND, 1995).

Com base nas frequências de populações ancestrais ameríndias, européias e africanas, calculadas a partir dos dados enviados pelo Dr. Mark D. Shriver, foram realizadas as análises de estimativas de mistura étnica pelo programa ADMIX (CHAKRABORTY, 1985).

As frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas dos polimorfismos em genes de citocinas foram comparadas com o controle pelo teste exato de Fisher, utilizando o programa GRAPHPAD INSTAT 3.

#### 4 RESULTADOS

O grupo de estudo foi composto de 55 indivíduos com SII selecionados no Ambulatório Magalhães Neto do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (C-HUPES), Clínica FTC e Clínica Gastro. O grupo controle foi constituído de 116 indivíduos doadores de sangue do Serviço de Transfusão de Sangue (STS).

A média da idade do grupo de pacientes com SII foi  $49,9 \pm 14,5$  anos e a mediana do grupo controle foi 40,04 anos. A SII foi mais frequente no gênero feminino (76%) que no masculino (24%) e a forma clínica mais comum foi a diarreica (51%). As características do grupo de pacientes e controle participantes do estudo estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 - Caracterização clínico-demográfica dos participantes do estudo

Características	SII (N=55)	Controle (N=116)	valor de p
<b>Idade</b>			
Média/Mediana	49,9±14,5	40,04	< 0.0001
IC 95% (idade)	46,0 – 53,9	36,8 – 40,6	
Mediana	-----	40.5 IQR	
<b>Gênero</b>			
Feminino	42 (76%)	37 (32%)	
Masculino	13 (24%)	79 (68%)	
<b>Forma Clínica</b>			
Diarreica	28 (51%)		
Obstipante	16 (29%)		
Mista	11 (20%)		
<b>Classificação fenotípica</b>			
Branco	15 (27%)	16 (14%)	
Mulato Claro	25 (45,5%)	38 (33%)	
Mulato Médio	12 (22%)	48 (41%)	
Mulato Escuro	03 (5,5%)	14 (12%)	

#### 4.1 POLIMORFISMO EM GENES DE CITOCINAS

As amostras de pacientes com SII e grupo controle foram genotipadas para os polimorfismos *TNF*-308 G>A, *IL10* (-1082G>A, -819C>T, -592C>A), *IL6* -174G>C, *IFNG* +874T>A e *TGFBI* (10T>C, 25G>C). Com base nas frequências encontradas para estes *loci* foi calculada a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os polimorfismos do *IFNG* e *IL10*-819C>T, -592C>A não aderiram ao equilíbrio de Hardy-Weinberg no grupo controle e no grupo de pacientes respectivamente.

##### 4.1.1 Distribuição de frequência dos polimorfismos do gene *TGFBI* (códon 10T>C; códon 25G>C)

###### 4.1.1.1 Códon 10 (T>C)

A distribuição das frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas para o polimorfismo no códon 10 T>C do gene *TGFBI*, observada nos grupos de pacientes com SII e controle, é mostrada na Tabela 2. A frequência observada do alelo T e C foi 0,53 e 0,47 tanto no grupo de pacientes com SII quanto no controle. A análise destes dados com o teste exato de Fisher revelou que a diferença entre as frequências observadas nos dois grupos não é significativa ( $p=0.729$ ). As frequências observadas para os genótipos TT e TC e CC foram 0,33, 0,42 e 0,25 respectivamente, no grupo de pacientes com SII e 0,3, 0,48 e 0,22 no grupo controle.

Tabela 2 - Distribuição das frequências alélicas e genotípicas para o polimorfismo do gene *TGFBI* (códon 10 T>C) em pacientes com SII e um grupo controle.

(N) Frequência do Alelo			
	Síndrome do Intestino Irritável	Indivíduos controle	p
T	(58) 0,53	(127) 0,53	
C	(52) 0,47	(105) 0,47	0,729
(N) Frequência do Genótipo			
TT	(18) 0,33	(34) 0,3	0,723 <sup>a</sup>
TC	(23) 0,42	(56) 0,48	0,512 <sup>b</sup>
CC	(14) 0,25	(26) 0,22	0,701 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> TT/TC+CC; <sup>b</sup> TC/TT+CC; <sup>c</sup> CC/TT+TC



#### 4.1.1.2 Códon 25 (G>C)

A distribuição das frequências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo do gene *TGFBI* no códon 25 (G>C), observada nos dois grupos, é mostrada na Tabela 3. As frequências observadas para os alelos G e C foram 0,94 e 0,06, no grupo de pacientes com SII, e de 0,9 e 0,1 no grupo controle. Esta diferença não é estatisticamente significativa ( $p=0,127$ ).

As frequências genóticas observadas foram 0,87, 0,13 e 0,0 no grupo de pacientes com SII e 0,8, 0,18 e 0,02 no grupo controle para os genótipos GG, GC e CC, respectivamente.

Tabela 3 - Distribuição das frequências alélicas e genóticas para o polimorfismo do gene *TGFBI* (códon 25G>C) em pacientes com SII e um grupo controle.

(N) Frequência do alelo			
	Síndrome do Intestino Irritável	Indivíduos controle	p
G	(103) 0,94	(204) 0,9	
C	(7) 0,06	(28) 0,1	0,127
(N) Frequência do genótipo			
GG	(48) 0,87	(94) 0,8	0,386 <sup>a</sup>
GC	(7) 0,13	(20) 0,18	0,508 <sup>b</sup>
CC	(0) 0,0	(02) 0,02	1,000 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>GG/GC+CC; <sup>b</sup>GC/GG+CC; <sup>c</sup>CC/GC+CC

#### 4.1.1.3 Distribuição das frequências fenóticas

A distribuição das frequências dos fenótipos previstos para o polimorfismo do gene *TGFBI* (códon 10T>C; códon 25G>C), analisada nos grupos de pacientes com SII e controle, é mostrada na Tabela 4.

As frequências fenóticas inferidas com base na análise dos genótipos foram 0,65, 0,3 e 0,05 tanto para o grupo de pacientes com SII quanto no grupo controle, para alto, intermediário e baixo produtor de TGF-  $\beta$ 1, respectivamente.

Tabela 4 - Distribuição das frequências genótípicas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo do gene *TGFBI* (códon 10T>C; códon 25G>C) em pacientes com SII e um grupo controle.

(N) Frequência do genótipo			
	Síndrome do Intestino Irritável	Indivíduos controle	
T/T G/G <sup>1</sup>	(18) 0,33	(34) 0,3	
T/C G/G <sup>1</sup>	(19) 0,34	(41) 0,35	
T/C G/C <sup>2</sup>	(5) 0,09	(15) 0,13	
C/C G/G <sup>2</sup>	(11) 0,2	(19) 0,16	
T/T G/C <sup>2</sup>	(0) 0,00	(0) 0,00	
C/C G/C <sup>3</sup>	(2) 0,04	(05) 0,04	
C/C C/C <sup>3</sup>	(0) 0,00	(02) 0,02	
T/T C/C <sup>3</sup>	(0) 0,00	(0) 0,00	
T/C C/C <sup>3</sup>	(0) 0,00	(0) 0,00	
	Fenótipo previsto		p
Alto produtor <sup>1</sup>	(36) 0,65	(76) 0,65	1,000 <sup>a,b,c</sup>
Intermediário <sup>2</sup>	(16) 0,3	(34) 0,3	
Baixo produtor <sup>3</sup>	(03) 0,05	(6) 0,05	

<sup>a</sup>Alto/ Intermediário+Baixo; <sup>b</sup>Intermediário/Alto+Baixo; <sup>c</sup>Baixo/ Intermediário+Alto

#### 4.1.2 Distribuição de frequência do polimorfismo do gene *IFNG* -308 T>A

A distribuição das frequências alélicas, genótípicas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo +874 (T>A) do gene *IFNG* observada nos grupos estudados é mostrada na Tabela 5. As frequências observadas para os alelos T e A foram 0,35 e 0,65 para o grupo de pacientes com SII e 0,4 e 0,6 para o grupo controle. A análise pelo teste exato de Fisher mostrou valor de p=0,904.

As frequências observadas dos genótipos TT, TA e AA foram, respectivamente, 0,11, 0,47 e 0,42 em pacientes com SII e 0,2; 0,35 e 0,46, no grupo controle.

As frequências dos fenótipos previstos foram 0,13, 0,47 e 0,4 para o grupo de pacientes com SII e 0,14, 0,41 e 0,45 no grupo controle, para altos, intermediários e baixos produtores de IFN- $\gamma$ , respectivamente.

Tabela 5 - Distribuição das frequências alélicas, genótípicas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo *IFNG* +874 T>A em pacientes com SII e um grupo controle.

(N) Frequência do Alelo			
	Síndrome do Intestino Irritável	Indivíduos Controle	P
T	(38) 0,35	(83) 0,4	0,904
A	(72) 0,65	(149) 0,6	
(N) Frequência do Genótipo			
TT	(7) 0,11	(21) 0,2	0,508 <sup>a</sup>
TA	(25) 0,47	(41) 0,35	0,240 <sup>b</sup>
AA	(23) 0,42	(54) 0,46	0,623 <sup>c</sup>
(N) Frequências dos Fenótipos previstos			
Alto produtor	(7) 0,13	(21) 0,18	0,387 <sup>d</sup>
Intermediário	(26) 0,47	(41) 0,36	0,181 <sup>e</sup>
Baixo Produtor	(22) 0,42	(52) 0,46	0,513 <sup>f</sup>

<sup>a</sup>TT/ TA+AA; <sup>b</sup>TA/ TT+AA; <sup>c</sup>AA/ TT+TA

<sup>d</sup>Alto/ Intermediário+Baixo; <sup>e</sup>Intermediário/Alto+Baixo; <sup>f</sup>Baixo/ Intermediário+Alto

#### 4.1.3 Distribuição de frequência dos polimorfismos do gene *IL6* -174G>C

A distribuição das frequências alélicas, genótípicas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo - 174G>C do gene *IL6* observada nos diferentes grupos estudados é mostrada na Tabela 6. As frequências observadas para os alelos G e C foram 0,77 e 0,23 para o grupo de pacientes com SII e 0,75 e 0,25 para o grupo controle respectivamente (p=0,687).

As frequências genótípicas observadas nos dois grupos foram 0,64, 0,27 e 0,09 em pacientes com SII e 0,57, 0,34 e 0,09 no grupo controle, para os genótipos GG, GC e CC, respectivamente.

As frequências dos fenótipos previstos foram 0,9 e 0,1 para o grupo de pacientes com SII e 0,92 e 0,08 no grupo controle para altos e baixos produtores de IL-6, respectivamente. As diferenças constatadas entre os dois grupos não são estatisticamente significantes (p=0,567).

Tabela 6 - Distribuição das frequências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo -174 G>C do gene de *IL6* em pacientes com SII e um grupo controle.

(N) Frequência do Alelo			
	Síndrome do Intestino Irritável	Indivíduos Controle	p
G	(83) 0,77	(172) 0,75	
C	(25) 0,23	(60) 0,25	0,687
(N) Frequência do genótipo			
GG	(35) 0,64	(66) 0,57	0,506 <sup>a</sup>
GC	(15) 0,27	(40) 0,34	0,385 <sup>b</sup>
CC	(5) 0,09	(10) 0,09	1,000 <sup>c</sup>
Frequências dos Fenótipos previstos			
Alto produtor	(49) 0,9	(106) 0,92	
Baixo produtor	(6) 0,1	(09) 0,08	0,567

<sup>a</sup>GG/GC+CC; <sup>b</sup>GC/GG+CC; <sup>c</sup>CC/GC+GG

#### 4.1.4 Distribuição de frequência dos polimorfismos do gene *IL10* -1082G>A; -819C>T; -592C>A

As possíveis combinações dos polimorfismos nas posições -1082, -819 e -592 formam os haplótipos GCC, ACC e ATA. Para a análise estatística, os genótipos foram agrupados de acordo com os fenótipos. Deste modo, foram agrupados os valores obtidos com os genótipos GCC/ACC e GCC/ATA (produtores intermediários), os valores adquiridos com os genótipos ACC/ACC, ACC/ATA e ATA/ATA (baixos produtores) e o genótipo GCC/GCC, que corresponde a altos produtores. A análise mostrou não haver diferenças significantes em nenhum dos três polimorfismos em relação às frequências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos, conforme análise dos dados representados na Tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição das frequências alélicas, genóticas e dos fenótipos previstos para os polimorfismos -1082G>A, -819C>T e -592C>A do gene *IL10* em pacientes com SII e um grupo controle. (continua)

(N) Frequência do Alelo			
	Síndrome do Intestino Irritável	Indivíduos Controle	p
-1082G	(35) 0,32	(85) 0,37	
-1082 <sup>a</sup>	(75) 0,68	(147) 0,63	0,399
-819 C	(67) 0,6	(150) 0,65	
-819 T	(43) 0,4	(82) 0,35	0,548

Tabela 7 - Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e dos fenótipos previstos para os polimorfismos -1082G>A, -819C>T e -592C>A do gene *IL10* em pacientes com SII e um grupo controle. (conclusão)

-592 C	(66) 0,6	(150) 0,65	
-592 A	(44) 0,4	(82) 0,35	0,404
(N) Frequência do genótipo			
GCC/GCC	(5) 0,1	(14) 0,12	
GCC/ACC	(15) 0,27	(27) 0,23	
GCC/ATA	(10) 0,18	(30) 0,26	
ACC/ACC	(4) 0,07	(07) 0,06	
ACC/ATA	(9) 0,16	(24) 0,21	
ATA/ATA	(12) 0,22	(14) 0,12	
(N) Frequências dos Fenótipos previstos			
Alto produtor	(5) 0,1	(14) 0,12	0,614 <sup>a</sup>
Intermediário	(25) 0,45	(57) 0,5	0,627 <sup>b</sup>
Baixo produtor	(25) 0,45	(44) 0,38	0,406 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Alto/ Intermediário+Baixo; <sup>b</sup>Intermediário/Alto+Baixo; <sup>c</sup>Baixo/ Intermediário+Alto

#### 4.1.5 Distribuição de frequência dos polimorfismos do gene *TNF* -308G>A

A distribuição das frequências alélicas, genotípicas e fenotípica para o polimorfismo no gene *TNF* -308G>A, nos grupos de pacientes com SII e controle, são mostradas na Tabela 8. As frequências observadas para os alelos G e A foram, respectivamente, de 0,9 e 0,1 no grupo de pacientes com SII e de 0,84 e 0,16 no grupo controle. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $p=0,138$ ).

As frequências observadas dos genótipos GG, GA e AA foram, respectivamente, 0,84, 0,14 e 0,02 em pacientes com SII e 0,73, 0,22 e 0,05 no grupo controle.

As frequências dos fenótipos previstos de alto e baixo produtores são 0,16 e 0,84 no grupo de pacientes com SII e 0,28 e 0,72 no grupo controle. A comparação das frequências entre os grupos não revelou diferença estatisticamente significativa ( $p=0,2108$ ).

Tabela 8 - Distribuição das frequências alélicas, genotípicas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo -308 G>A do gene *TNF* em pacientes com SII e um grupo controle. (continua)

	(N) Frequência do Alelo		P
	Síndrome do Intestino Irritável	Indivíduos Controle	
G	(99) 0,9	(194) 0,84	
A	(11) 0,1	(38) 0,16	0,138

Tabela 8 - Distribuição das frequências alélicas, genótípicas e dos fenótipos previstos para o polimorfismo -308 G>A do gene *TNF* em pacientes com SII e um grupo controle. (conclusão)

	(N) Frequência do genótipo		
GG	(46) 0,84	(84) 0,73	0,127 <sup>a</sup>
GA	(08) 0,14	(26) 0,22	0,306 <sup>b</sup>
AA	(01) 0,02	(6) 0,05	0,431
	(N) Frequências dos Fenótipos previstos		
Alto produtor	(9) 0,16	(32) 0,28	
Baixo produtor	(46) 0,84	(84) 0,72	0,127

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES COM SII E CONTROLE QUANTO À ANCESTRALIDADE GENÔMICA

As amostras de pacientes com SII e grupo controle foram caracterizadas quanto à ancestralidade genômica de acordo com a genotipagem de 10 marcadores moleculares informativos de ancestralidade, sendo um polimorfismo de inserção/deleção - *AT3-I/D*, três inserções *Alu* - *SB19.3*, *APO* e *PV92*, e seis *SNPs* - *FYnull*, *CKMM*, *LPL*, *GC-1F*, *GC-1S* e *RB2300*.

Com base nas frequências encontradas para estes *loci* foi calculada a aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os marcadores GC (europeu) e RB2300 (africano) não aderiram ao equilíbrio na amostra controle e de pacientes, respectivamente.

As frequências alélicas dos polimorfismos acima citados da amostra de pacientes foram comparadas com as frequências encontradas no grupo controle. Foi observada frequência significativamente maior do *locus AT3* (africano) na amostra de indivíduos com SII quando comparada ao grupo controle ( $p=0,0291$ ); e forte tendência à significância do *locus LPL*, em relação ao aumento da frequência no grupo controle ( $p= 0,059$ ).

Por outro lado, para os demais *loci*, as frequências observadas nos dois grupos foram semelhantes (Tabela 9).

Tabela 9 - Frequências do alelo\*1 em pacientes com SII e controle e análise de diferenciação gênica entre as duas populações.

Marcadores	SII	Controle	S.E	Valor de p
<i>RB2300</i>	0,410	0,440	0,005	0,7128
<i>AT3</i>	0,551	0,422	0,0024	0,0291
<i>Sb 19.3</i>	0,633	0,634	0,0066	0,6449
<i>APO</i>	0,816	0,789	0,0064	0,3158
<i>PV92</i>	0,200	0,280	0,0059	0,1896
<i>Fynull</i>	0,694	0,627	0,0063	0,2589
<i>LPL</i>	0,588	0,697	0,004	0,059
<i>CKMM</i>	0,282	0,309	0,0032	0,7372
* <i>GC-F</i>	0,480	0,458	0,0029	0,9248
* <i>GC-S</i>	0,357	0,358		

Valor de p – probabilidade; S.E. – erro padrão.

\* = Estes dois diferentes polimorfismos no gene GC, um no nucleotídeo (nt) 34 e outro no 45, formamos alelos GC\*1F (mais frequente em africanos), GC\*1S (mais frequente em europeus) e GC\*2.

A estimativa de mistura para os indivíduos com SII mostrou contribuição européia de 58%, 32% de contribuição africana, e 10% de contribuição ameríndia. Dados semelhantes foram obtidos na população controle ( $p=0,1158$ ;  $\chi^2$ ), com maior contribuição européia (46%), seguida da africana (35%) e ameríndia (19%) (Tabela 10; figura 2).

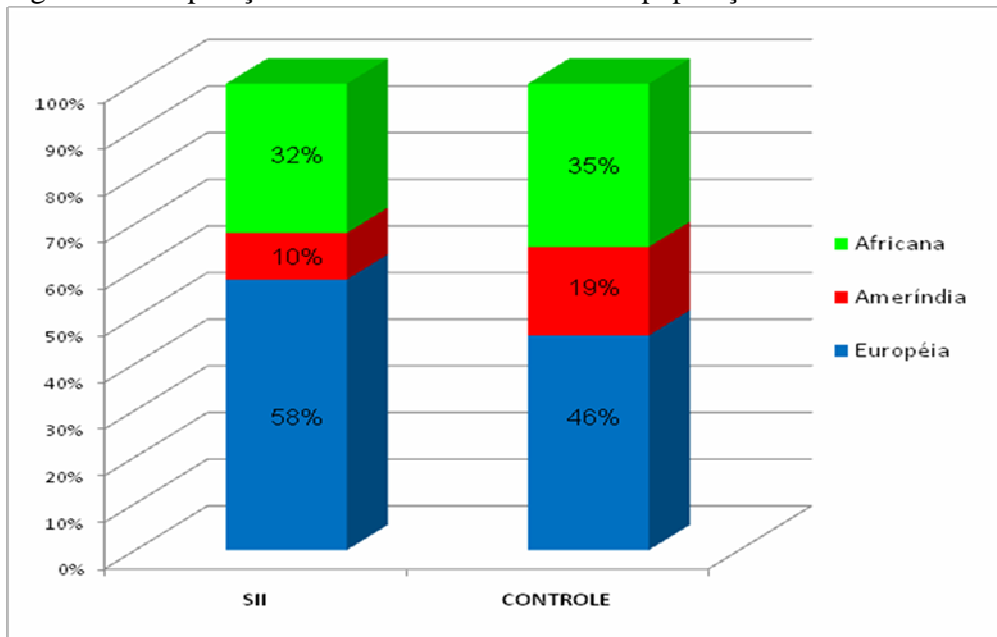
Por outro lado, a estimativa de mistura da população controle apresenta menor contribuição africana (35,2%) do que uma amostra randômica da população de Salvador (50%). Mas a comparação das estimativas de mistura destes dois grupos populacionais não revelou diferenças significativas entre os mesmos ( $p=0,0825$ ;  $\chi^2$ ), (Tabela 10). Contudo, a estimativa de mistura do grupo de pacientes com SII é estatisticamente diferente da amostra da população de Salvador ( $p=0,0158$ ;  $\chi^2$ ) (Tabela 10).

Tabela 10 - Proporções de contribuição africana, européia e ameríndia (estimativa de mistura) no grupo de pacientes com SII, controle e população de Salvador

Contribuição	Pacientes SII		Controle		Salvador	
	m	s.e	m	s.e	m	s.e
Africana	0,3186	0,001	0,3517	0,0013	0,5034	0,0012
Européia	0,5815	0,0037	0,4631	0,0047	0,3781	0,0048
Ameríndia	0,0999	0,0032	0,1853	0,004	0,1185	0,0044

m= índice de mistura; s.e.= erro padrão

Figura 2- Comparação da estimativa de mistura da população com SII e controle



As frequências alélicas observadas nos subgrupos de pacientes com SII, distribuídos de acordo com a forma clínica predominante, estão mostradas na Tabela 11. Há diferença estatisticamente significativa na frequência do *locus PV92*, entre os subgrupos, sendo maior entre os pacientes com a forma clínica SII-D em relação às formas SII-C e SII-A ( $p=0,012$ ) (Tabela 11).

As estimativas de mistura populacional nos subgrupos SII-D, SII-C e SII-A estão mostradas na Tabela 12 e na Figura 3. Uma proporção de 50% de contribuição europeia, 31% africana, e 19% ameríndia foram observadas na forma SII-D. As formas clínicas SII-C e SII-A foram bem semelhantes quanto às contribuições das populações ancestrais: 66% europeia, 31% africana e 3% ameríndia para a SII-C e 68% europeia, 30% africana e 2% ameríndia para a SII-A. A estimativa de mistura para as diferentes formas clínicas mostrou que todas apresentam maior contribuição europeia, seguida da africana e ameríndia. No entanto, a forma clínica SII-D apresenta menor contribuição europeia e maior ameríndia quando comparada às outras formas. Quando comparada as proporções da estimativa de mistura das formas SII-D e SII-C, a diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,01$ ;  $\chi^2$ ), assim como comparando as formas SII-D e SII-A ( $p=0,003$ ;  $\chi^2$ ). Mas não houve diferença entre as formas SII-A e SII-C ( $p=0,8842$ ;  $\chi^2$ ) (Tabela 12 e Figura 3).



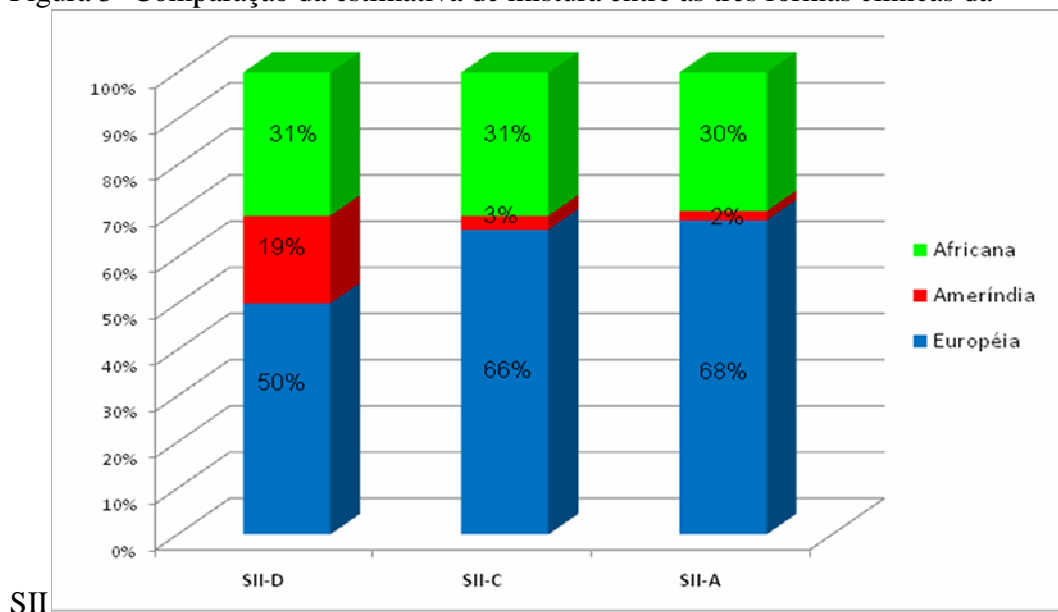
Tabela 11- Frequências do alelo\*1 em pacientes com SII e controle e análise de diferenciação gênica entre as formas clínicas SII-D, SII-C, SII-A.

Marcadores	SII-D	SII-C	SII-A	S.E	Valor de p
<i>RB2300</i>	0,407	0,367	0,500	0,0048	0,654
<i>AT3</i>	0,554	0,594	0,500	0,0031	0,815
<i>Sb 19.3</i>	0,714	0,594	0,636	0,0056	0,5269
<i>APO</i>	0,821	0,875	0,818	0,0027	0,788
<i>PV92</i>	0,321	0,094	0,091	0,0012	0,012
<i>Fynull</i>	0,714	0,700	0,636	0,003	0,819
<i>LPL</i>	0,580	0,567	0,636	0,0018	0,896
<i>CKMM</i>	0,304	0,205	0,273	0,002	0,887
<i>GC-F</i>	0,482	0,406	0,500	0,0032	0,884
<i>GC-S</i>	0,373	0,375	0,400		

Tabela 12- Proporções de contribuição africana, européia e ameríndia (estimativa de mistura) nos grupos das diferentes formas clínicas (SII-D, SII-C, SII-A)

Contribuição	SII-D		SII-C		SII-A	
	M	s.e	m	s.e	M	s.e
Africana	0,3085	0,0014	0,3087	0,0026	0,2999	0,0034
Européia	0,4997	0,0051	0,6626	0,0095	0,6807	0,0125
Ameríndia	0,1919	0,0043	0,287	0,004	0,0195	0,0106

Figura 3- Comparação da estimativa de mistura entre as três formas clínicas da



## 5 DISCUSSÃO

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a possível associação entre polimorfismos das citocinas TNF, TGF- $\beta$ , IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$  e a Síndrome do Intestino Irritável (SII), uma desordem heterogênea tanto na apresentação clínica como na patogênese (COLLINS, 2005); esta síndrome é, provavelmente, uma condição multifatorial com uma combinação de fatores influenciando o desencadeamento dos sintomas (GONSALKORALE, 2003).

As frequências dos polimorfismos *TNF*-308 G>A, *IL10* (-1082G>A, -819C>T, -592C>A), *IL6* -174G>C, *IFNG* +874T>A e *TGFBI* (10T>C, 25G>C) em um grupo de pacientes acompanhados no Ambulatório Magalhães Neto do C-HUPES, Clínica GASTRO e Clínica FTC foram comparadas com as frequências observadas em um grupo de doadores voluntários de sangue (grupo controle). Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para todos os polimorfismos estudados. Este resultado sugere que não há associação entre estes polimorfismos e a SII.

A hipótese de associação entre estes polimorfismos e a SII foi sugerida com base no papel destas citocinas na resposta imuno-inflamatória e de evidências que sugerem que mecanismos envolvidos com a regulação da resposta inflamatória têm um papel importante na SII (SPILLER, 2004; CRENTSIL, 2005; SPILLER, 2007), especialmente em pacientes com SII pós-infecção (COLLINS, 2005). As citocinas podem influenciar a função de células epiteliais, do músculo liso e de nervos entéricos; mudanças no perfil de secreção de citocinas nestes tecidos, podem promover alterações na secreção, permeabilidade, motilidade e sensibilidade gerando sintomas típicos da SII (COLLINS, 1996). Contudo, é importante salientar que outros autores sugerem que a etiopatogenia da SII não envolve a resposta imuno-inflamatória (MACH, 2004; CRENTSIL, 2005; MAWE, 2006; KIBA, 2007; JARRETT, 2007; COLUCCI, 2008; KOHEN, 2009).

A revisão da literatura revelou que até o momento, apenas quatro trabalhos publicados tiveram como objetivo avaliar a associação entre polimorfismos em genes de citocinas e SII (GONSALKORALE, 2003; VAN DER VEEK, 2005; WANG, 2006; BARKHORDARI, 2009).

Dinan e colaboradores (2006) não observaram diferenças significativas entre os níveis séricos das citocinas IL-10 e TNF em pacientes com SII; no entanto, foi observado aumento da IL-6 em todos os subgrupos de pacientes com SII quando comparados com indivíduos controle. Mais recentemente, Liebrechts e colaboradores (2007) mostraram que pacientes com SII

apresentaram níveis basais significativamente mais elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF quando comparados com indivíduos controle.

Os dados obtidos no presente trabalho não revelaram diferenças estatisticamente significantes em relação às frequências alélicas, genóticas e fenóticas dos polimorfismos nos códons 10 e 25 do *TGFBI*. Estes achados concordam com os descritos previamente na literatura por Gonsalkorale e colaboradores (2003) que também não encontraram associação do *TGFBI* nos códon 10 e códon 25. O TGF- $\beta$  é uma citocina multifuncional com várias ações biológicas e patológicas, produzida por plaquetas, macrófagos, células epiteliais (MAGNAN, 1994) e células do músculo liso (PELTON, 1991). Esta citocina pode estar associada ao aumento da contração muscular (KITA, 1997) e os achados de Akiho e colaboradores (2005.1) sugerem que a persistência dos níveis do TGF- $\beta$ 1 pós-infecção é responsável por manter o estado de hipercontratibilidade do músculo liso, o que pode explicar uma possível associação desta citocina no desencadeamento da SII-PI. Um achado semelhante foi mostrado por e Gwee e colaboradores (2003), que relataram que a expressão da IL-1 $\beta$  permaneceu elevada durante três meses em indivíduos que desenvolveram SII- PI em comparação aos indivíduos que não desenvolveram SII após a infecção.

Em relação ao polimorfismo no gene *IL10*, os presentes dados corroboram os resultados de van der Veek e colaboradores (2005) que não encontraram diferenças de frequência dos polimorfismos da *IL10* (-1082G>A, -819C>T) no grupo de SII quando comparados a um grupo controle. Por outro lado, Gonsalkorale e colaboradores (2003) observaram diferenças estatisticamente significantes em relação as frequências dos polimorfismos no gene *IL10* -1082G>A,. Foi encontrado menor frequência dos genótipos de alta produção (-1082 G/G) em indivíduos com SII, e esta diferença foi estatisticamente significativa (p=0,004), divergindo do presente estudo.

O mais recente estudo encontrado de polimorfismo em genes de citocinas e SII mostrou diferenças significantes nas frequências do polimorfismo *IL6* -174G>C entre pacientes e controle, sendo oposto aos resultados do presente trabalho em relação a não significância da IL-6 (BARKHORDARI ,2010). Estes mesmos autores não encontraram diferenças quanto ao TNF (-308G>A), corroborando nossos resultados e contrastando com o artigo previamente publicado na literatura (VAN DER VEEK, 2005), em que foi observada maior prevalência do genótipo heterozigoto G/A em um grupo de pacientes com SII comparada ao grupo controle.

Nenhum estudo foi encontrado relacionando polimorfismos do *IFNG* e SII. O IFN- $\gamma$  é uma citocina produzida pelos linfócitos T auxiliares do tipo Th1, pelos linfócitos T citotóxicos e pelas células NK. O papel principal do IFN- $\gamma$  é a ativação de macrófagos (BOEHM, 1997; PRAVICA, 1999). Foley e colaboradores (2007) sugeriram que esta citocina teria um papel relevante no aumento da motilidade intestinal em pacientes com SII.

O tamanho da amostra de pacientes (55) deste estudo pode ter contribuído para a não observação de diferenças significativas entre as frequências destes polimorfismos nos dois grupos. Os trabalhos publicados na literatura que também estudaram o polimorfismo em genes de citocinas e SII foram realizados com diferentes números de pacientes: 230 (GONSALKORALE, 2003); 111 (VAN DER VEEK, 2005); 43 (WANG, 2006) e 75 (BARKHORDARI, 2010). Um dos fatores que contribuíram para o número inferior de pacientes deste estudo foi o uso de rigorosos critérios de seleção da amostra que incluíam, além dos critérios de Roma III, exames laboratoriais e de imagem, além da não inclusão de pacientes com co-morbidades como, por exemplo, outras doenças do trato gastrointestinal e infecção por HIV. Desta forma, é possível concluir que a amostra deste estudo foi mais bem caracterizada com relação à SII. Os parâmetros demográficos da amostra estudada, como idade e gênero, são semelhantes aos observados em outras populações (MACH, 2004; VALENZUELA, 2004).

Os resultados divergentes encontrados em diferentes trabalhos que estudaram os mesmos polimorfismos podem também, serem atribuídos aos diferentes grupos étnicos estudados, tendo em vista que as diferenças geográficas podem ser associadas às variações étnicas, e estas por sua vez, podem afetar as frequências dos SNPs (VAN DER VEEK, 2005). Recentemente foi sugerida a necessidade de um estudo deste gênero em diferentes grupos étnicos e o uso de um controle com o mesmo perfil étnico dos pacientes (BARKHORDARI, 2009).

Este é o único estudo de associação entre polimorfismos genéticos de citocinas e SII cujas amostras dos grupos de pacientes e controle foram caracterizadas quanto a marcadores genéticos informativos de ancestralidade (Quadro 1, Tabelas 9 e 10). Os resultados mostram que os pacientes apresentaram maior contribuição europeia do que ameríndia ou africana, concordando com dados da literatura, segundo os quais, indivíduos classificados como brancos são mais acometidos pela SII (DONG, 2005; WIGINGTON, 2005). Quando comparados ao grupo controle, a contribuição africana é semelhante entre os dois grupos, mas mostra diferenças entre a contribuição europeia e, principalmente, ameríndia, porém, as diferenças não são estatisticamente

significantes ( $p=0,1158$ ;  $\chi^2$ ). Desta forma, é possível afirmar que os dois grupos são semelhantes no que se refere à ancestralidade genômica e que o grupo controle utilizado é adequado para as comparações feitas neste estudo. Por outro lado, a comparação das frequências dos AIMS observadas em uma amostra populacional randômica da população de Salvador (Machado, 2008) e no grupo controle revelou menor contribuição africana neste último, mas a diferença não é estatisticamente significativa ( $p= 0,0825$ ;  $\chi^2$ ).

Nenhum dado foi encontrado caracterizando as diferentes formas clínicas da SII quanto à ancestralidade genômica, portanto este também é o primeiro trabalho a fazer este tipo de caracterização. Os resultados preliminares mostram que indivíduos com a forma clínica diarréica apresentam menor contribuição européia e, principalmente, maior contribuição ameríndia em relação às outras formas clínicas (forma constipada e mista). Esta observação provavelmente é verdadeira, pois a frequência dos marcadores específicos da população ameríndia (CKMM e PV92) e que melhor diferenciam ameríndios de europeus e de africanos é maior em pacientes com a forma diarréica quando comparada com as demais. Esta diferença é extremamente significativa para o marcador PV92 ( $p<0,0001$  OR=0,2102 IC95% 0,09409-0,4695). Então, pode ser que indivíduos com maior contribuição ameríndia tenham maior susceptibilidade ao desenvolvimento da forma clínica SII-D do que as demais formas na população estudada. Esta observação não foi publicada na literatura em nenhuma outra população. Os dados de van der Veek e colaboradores (2005) em uma população européia (holandesa) mostra que a forma diarréica foi mais frequente do que as demais formas clínicas e corroboram dois estudos em população caucasiana que também mostram a forma diarréica como a mais comum (DINAN, 2006; LIEBREGTS, 2007).

No presente trabalho a forma constipada e mista foram bem semelhantes em relação à estimativa de mistura, apresentando, ambas maiores contribuição européia (Figura 3). Gonsalkorale e colaboradores (2003) mostram que as formas clínicas diarréicas e mistas (ou alternante) são igualmente frequentes na população inglesa estudada, sendo a forma constipada menos frequente. Mais tarde, Spiller e colaboradores (2007) colaboram com o achado de que a forma constipada (ou obstipada) foi menos frequente na população inglesa estudada e a forma diarréica foi muito mais frequente seguida da forma alternante. Estes dados discordam do estudo realizado em uma população de negros kenianos em que a constipação foi a forma clínica mais comum (LULE, 2002) assim como em uma população asiática (GWEE, 2004). Os achados do

presente trabalho e a comparação com dados de outros grupos sugerem que além do desenvolvimento da SII, a predominância das diferentes formas clínicas também podem ser influenciadas pelas diferenças étnicas.

A não aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg dos marcadores informativos de ancestralidade GC e RB2300 assim como dos polimorfismos do *IFN* e *IL10* foram gerados por excesso de homozigotos. Isto pode ter sido devido à coleta de uma amostra de conveniência tanto do controle, que foram doadores de sangue, quanto da amostra de pacientes. Outra explicação para o excesso de homozigotos seria o casamento preferencial entre indivíduos de um mesmo grupo étnico direcionando o fluxo gênico para a manutenção desses genótipos na população (AZEVEDO, 1986).

## 6 CONCLUSÃO

Os polimorfismos dos genes *IFNG* (+874T>A), *TNF* (-308G>A), *IL6* (-174G>C) *IL10* (-1082G>A, -819C>T e -592C>A) e *TGFB1* (+869 T>C e +915 G>C) não parecem ser marcadores de predisposição ou proteção ao desenvolvimento da SII.

A maior contribuição da ancestralidade européia, analisada por marcadores moleculares informativos de ancestralidade, pode ser um fator de predisposição ao desenvolvimento da SII.

A maior contribuição da ancestralidade ameríndia, analisada por marcadores moleculares informativos de ancestralidade, em indivíduos com SII-D em comparação com as demais formas clínicas, pode ser um fator de predisposição ao desenvolvimento da forma diarréica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABÉ-SANDES, K.; SILVA, J. R. W. A.; ZAGO, M. A. **Heterogeneity of the Y Chromosome in Afro-Brazilian Populations.** Human Biology. v. 76, n. 1, p. 77-86, 2004.
- AKIHO, H. et al. **Mechanisms Underlying the Maintenance of Muscle Hypercontractility in a Model of Postinfective Gut Dysfunction.** Gastroenterol. v.129, p.131-141, 2005.
- AKIHO, H. et al. **Interleukin-4 and interleukin-13 induced hypercontractility of human intestinal muscle cells-implication for motility changes in Crohn's disease.** Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, v.288: G609-615, 2005.
- ALVES-SILVA, J. et al. **The ancestry of Brazilian mtDNA lineages.** Am J Hum Genet, v.67: 444-461, 2000.
- AOKI, N.; Z. XING. **Use of cytokines in infection.** Expert Opin Emerg Drugs, v.9: 223-36, 2004.
- ARCOT, S. S. et al. **High-resolution cartography of recently integrates human chromosome 19-specific Alu fossils.** J Mol Biol 4; 281(5):843-56. Sep 1998.
- AWAD, M.T. et al. **Genotypic variation in the transforming growth factor- beta 1 gene: association with transforming growth factor- beta 1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis alter lung transplantation.** Transplantation, v.66: 1014-1020, 1998.
- AWAD, M. et al. **CA repeat allele polymorphism in the first intron of the human interferon-gamma gene is associated with lung allgraft fibrosis.** Hum Immunol, v.60: 343-6, 1999.
- AWATA T. et al. **Association of polymorphism in the interferon-gamma gene with IDDM.** Diabetologia, v. 37: 1159-62, 1994.
- BALDING, J. et al. **Inflammatory bowel disease: the role of inflammatory cytokine gene polymorphisms.** Mediators of inflammation, v. 13(3): 181-7, 2004.
- BARBARA, G.; VALANCE B. A.; COLLINS S. M. **Persistent intestinal neuromuscular dysfunction after acute nematode infection in mice.** Gastroenterology, v.113: 1224-1232, 1997.
- BARKHORDARI, E. et al. **Proinflammatory Cytokine Gene Polymorphisms in Irritable Bowel Syndrome.** J Clin Immunol, v.30 ,Jan 2010; (74-9. Epub 2009 Oct 21).
- BARRET, S. **Polymorphisms in tumor necrosis factor-  $\alpha$ , transforming growth factor- $\beta$ , interleukin-10, interleukin 6, interferon-gamma, and outcome of hepatitis C virus infection.** J Med Virology, v. 71: 212-8, 2003.



- BATZER, M. A. et al. **African origin of human-specific polymorphic Alu insertions.** Proc Nati Acad Sci U S A 6;91(25): 12288-92. 1994
- BENDICHO, M. T. **Estudo do polimorfismo de genes das citocinas (TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$ ) em indivíduos com pancreatite crônica.** Dissertação de mestrado. 2004. Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004
- BENDICHO, M. T., J. C. et al. **Polymorphism of cytokine genes (TGF-beta1, INF-gamma, IL-6, IL-10, and TNF-alpha) in patients with chronic pancreatitis.** Pâncreas, v.30: 333-6, 2005.
- BERGHE, W. V. et al. **Signal Transduction by Tumor Necrosis Factor and Gene Regulation of the Inflammatory Cytokine Interleukin-6.** Biochemical Pharmacology, v.60: 1185-1195, 2000.
- BIDWELL, J. et al. **Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases.** Genes and Immunity, v. 1: 3-19, 1999.
- BOCKUS, H. L. et al. **Neurogenic mucous colitis.** Am J Med Sci v.176: 813-823, 1928.
- BOEHM, U. et al. **Cellular responses to Interferon-gamma.** Annu Rev Immunol, v.15:749-795, 1997.
- BONILLA, C et al. **Ancestral proportions and their association with skin pigmentation and bone mineral density in Puerto Rican women from New York city.** Hum Genet. v.115, p. 57-68, 2004.
- BOOKSTEIN, R. et al. **PCR-based detection of a polymorphic BamHI site in intron 1 of the human retinoblastoma (RB) gene.** Nucleic Acids Res, 18:1666, 1990.
- BRAUN, A.; BICHMAIER, R.; CLEVE, H. **Molecular analysis of the gene for the human vitamin-D-binding protein (group-specific component): allelic differences of the common genetic GC types.** Hum Genet 89:401-406, 1992.
- BROWN, R. A., et al. **Enhanced Fibroblast Contraction of 3D Collagen Lattices and Integrin Expression by TGF- $\beta$ 1 and  $\beta$ 3: Mechanoregulatory Growth Factors?** Exp Cell Res, v. 274: 310-322, 2002.
- CAMBIEN, F. et al. **Polymorphism of the transforming growth factor-beta1 gene in relation to myocardial infarction and blood pressure.** The Etude Cas-Temoin de l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study. Hipertension, v.28: 881-7, 1996.

- CANTAGREL, A. et al. **Interleukin-1 receptor antagonist, interleukin-4, and interleukin-10 gene polymorphisms: Relationship to occurrence and severity of Rheumatoid Arthritis.** *Arthritis Rheum*, v.42: 1093-1100, 1999.
- CANTOR, M. J.; NICKERSON P.; BERNSTEIN C. N. **The role of cytokine gene polymorphism in determining disease susceptibility and phenotype in inflammatory bowel disease.** *Am J Gastroenterol*, v.100(5): 1134-42, 2005.
- CARTWRIGHT, N. et al. **A study of cytokine protein secretion, frequencies of cytokine expressing cells and IFN- $\gamma$  gene polymorphisms in normal individuals.** *Transplantation*, v.68: 1546-1552, 1999.
- CHAKRABORTY, R.; KAMBOH, M. I.; FERRELL, R. E. **“Unique” alleles in admixed populations: a strategy for determining hereditary population differences of disease frequencies.** *Ethn Dis*, 1:245-256, 1991.
- CHAUDHARY, N. A.; TRUELOVE, S. C. **The irritable colon syndrome.** *Q J Med*, v.123: 307-322, 1962.
- COLLINS, S. M. **The immunomodulation of enteric neuromuscular function: Implications for motility and inflammatory disorders.** *Gastroenterology*, v.111: 1683-1699, 1996.
- COLLINS, S. M. **A case for an immunological basis for irritable bowel syndrome.** *Gastroenterology*, v.122: 2078-2080, 2002.
- COLLINS-SCHRAMM, H. E. et al. **Ethnic-Difference Markers for Use in Mapping by Admixture Linkage Disequilibrium.** *Am J Hum Genet*. v. 70, p. 737-750, 2002.
- COLLINS, S. M. **Dysregulation of peripheral cytokine production in irritable bowel syndrome.** *Am J Gastroenterology*, v.100: 2517–2518, 2005.
- COLUCCI, R. et al. **The genetics of the serotonin transporter and irritable bowel syndrome.** *Trends Mol Med* v.14(7):295-304, 2008.
- CONTI, P. et al. **IL-10, an inflammatory/inhibitory cytokine, but not always.** *Immunol Letters*, v. 86: 123-129, 2003.
- COX, E.D. et al. **Cytokine polymorphic analyses indicate ethnic differences in the allelic distribution of interleukin-2 and interleukin-6.** *Transplantation*, v.72: 720-726, 2001.
- CRAWLEY, E. et al. **Polymorphic haplotypes of the interleukin-10. 50 flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis.** *Arthritis Rheum* 1999; 42:1101–8.

- CRENTSIL, V. **Will Corticosteroids and other anti-inflammatory agents be effective for diarrhea-predominant irritable bowel syndrome?** *Medical Hypotheses*, v.65: 97-102, 2005.
- CUNHA, M. Cd. Introdução a uma história indígena. In: CUNHA, M. Cd (Ed.). *História dos índios no Brasil*. São Paulo: Companhia das Letras, 1998.
- CUMMING, W. **Electro-galvanism in a peculiar affection of the mucous membrane of the bowels.** *London Medical Gazette*, 1849:969-973.
- CUZZOCREA, S. et al. **Absence of endogenous interleukin-6 enhances the inflammatory response during acute pancreatitis induced by cerulein in mice.** *Cytokine*, 18(5): 274–285, 2002.
- DAWSON, D. M.; EPPERBERGER, H. M.; EPPERBERGER, M. E. **Multiple molecular forms of creatine kinases.** *Ann N Y Acad Sci* 151: 616-626, 1968
- DIEHL, S.; RINCON, M. **The two faces of IL-6 on TH1/TH2 differentiation.** *Mol Immunol*, v.39: 531-6, 2002.
- DINAN, T. G. et al. **Hypothalamic-pituitary-gut axis dysregulation in irritable bowel syndrome plasma cytokines as a potential biomarker?** *Gastroenterology*, v.130 (2): 304-11, 2006.
- DONG, L. et al. **An epidemiologic study of irritable bowel syndrome in adolescents and children in China: a school-based study.** *Pediatrics*, v.116(3):e393-6, 2005 .
- DROSSMAN, D. A. et. al. **US householder survey of functional gastrointestinal disorders. Prevalence, sociodemography, and health impact.** *Dig Dis Sci*, v.38: 1569-1580, 1993.
- DROSSMAN, D.A. **The functional gastrointestinal disorders and the Rome II process.** *Gut*, v.45 (Suppl 2):II1-II5, 1999.
- DROSSMAN, D. A.; DUMITRASCU, D. L. **Rome III: New standard for functional gastrointestinal disorders.** *J Gastrointestin Liver Dis*, v.15(3): 237-41, 2006.
- ELOVIC, A. E. et al. **IL-4-dependent regulation of TGF- $\alpha$  e TGF- $\beta$  expression in human eosinophils.** *J Immunol*, v.160: 6121-6127, 1998.
- ESKDALE, J. et al. **Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes.** *Proc Nati Acad Sci U S A*, v.95: 9465-70, 1998.
- FERNANDEZ, L. et al. **Interleukin-10 polymorphism in Spanish with IBD.** *Inflammatory bowel diseases*, v.11(8): 739-43, 2005.

- FISHMAN, D. et al. **The effect of novel polymorphism in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and na association with systemic-onset juvenile chronic arthritis.** *J Clin Invest*, v.102: 1369-76, 1998.
- FOLEY, K. F. et al. **IFN-gamma and TNF-alpha decrease serotonin transporter function and expression in Caco2 cells.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, v.292: G779-84, 2007.
- GARCIA, P. M.; SAKAMOTO, K. M. **Cell Signaling Defects and Human Disease.** *Molecular Genetics and Metabolism*, v. 66: 143-171, 1999.
- GEERAERTS, B. et al. **Serotonin transporter gene polymorphisms in irritable bowel syndrome. Neurogastroenterology and motility: the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society**, v.18 (11): 957-9, 2006.
- GILKIN, R. J. **The spectrum of irritable bowel syndrome: A clinical review.** *Clin Ther*, v.27(11): 1696-709, 2005.
- GONSALKORALE, W. M. et al. **Interleukin-10 genotype in irritable bowel syndrome: evidence for an inflammatory component?** *Gut* , v.52: 91-3, 2003.
- GOVINDEN, R.; BHOOLA, K. D. **Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- $\beta$ 1.** *Pharmacology & Therapeutics*; 98: 257-265, 2003.
- GRAINGER, D. J. et al. **Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta 1.** *Hum Mol Genet*, v.8: 93-7, 1999.
- GRALNEK, I. M. et al. **Racial differences in the impact of irritable bowel syndrome on health-related quality of life.** *J Clin Gastroenterol*, v.38(9):782-9, 2004.
- GUEDES, J. C.; BENDICHO, M. T.; LEMAIRE, D.C. **Citocinas e imunomodulação: novos avanços no tratamento das pancreatites.** *R. Ci. Méd. biol*, v.3: 242-251, 2004.
- GWEE, K. A. et al. **Increased rectal mucosal expression of Interleukin 1 beta in recently acquired post-infectious irritable bowel syndrome.** *Gut*, v.52: 523-6, 2003.
- GWEE, K. A. et al. **The prevalence, symptom characteristics, and impact of irritable bowel syndrome in an asian urban community.** *Am J Gastroenterol*. v.99(5):924-31, 2004.
- HADLEY, T. J. et al. **Identification of an erythrocyte component carrying the Duffy blood group Fy-a antigen.** *Science*. 223: 597-599. 1984
- HADLEY, S. K.; GAARDER, S. M. **Treatment of irritable bowel syndrome.** *Am Fam Physician*, v.72(12): 2501-6, 2005. Review.
- HAJEER, A. H. et al. **IL-10 gene promoter polymorphisms in rheumathoid arthritis.** *Sand J Rheumatol*, v.27: 142-145, 1998.

- HAJEER, A. H; HUTCHINSON, I. V. **Influence of TNF- $\alpha$  Gene Polymorphisms on TNF- $\alpha$  Production and Disease.** Hum Immunol, v.62: 1191-1199, 2001.
- HALLORAN, P.; GOES, N. **Interferon-gamma and its receptor.** Transplantation Science, v.3: 92, 1993.
- HANADA, T.; YOSHIMURA, A. **Regulation of cytokine signaling and inflammation.** Cytokine & Growth Factor Reviews, v.13: 413-421, 2002.
- HAUKIM, N.; BIDWELL, J. L. **Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases supplement 2.** Genes and immunity, v.3: 313-30, 2002.
- HEATON, K. W.; O'DONNELL, L. J. D. **An office guide to whole-gut transit time. Patients' recollection of their stool form.** J Clin Gastroenterol, v.19(1):28-30, 1994.
- HOFFMANN, S. C. et al. **Ethnicity Greatly Influences Cytokine Gene Polymorphism Distribution.** Am J of Transplantation, v.2: 560-567, 2002.
- HOLLANDER, E. **Mucous colitis due to food allergy with a report of five cases.** Am J Sci, v.176: 813-823, 1927.
- HOLLOWAY, A. F.; RAO, S.; SHANNON, M. F. **Regulation of cytokine gene transcription in the immune system.** Mol Immunol, v.38: 567-580, 2001.
- HOLTMANN, G. **IBS: A syndrome or many diseases?** Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, v.18: 91-97, 2004.
- HONG-SHAN, L. et al. **Effect of NF- $\kappa$ B and p38 MAPK in activated monocytes/macrophages on pro-inflammatory cytokines of rats with acute pancreatitis.** World J. Gastroenterol, v.9, n.11, 2513-2518, 2003.
- HOTOLEANU, C. et al. **Genetic determination of irritable bowel syndrome.** World J Gastroenterol; 14(43): 6636-6640, 2008.
- HÜNEMEIER, T. et al. **Niger-Congo Speaking Populations and the formation of the Brazilian Gene Pool: mtDNA and Y-Chromosome Data.** Am J of Phys Anthropol. v. 133, p. 854-867, 2007.
- HUTCHINSON, I. V. et al. **Cytokine Genotypes in Allograft rejection: Guidelines for Immunosuppression.** Transplantation proceedings v.30:3991-3992, 1998.
- ISHIHARA, K.; T. HIRANO. **IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease.** Cytokine Growth Factor Rev, v.13: 357-68, 2002.

JANEWAY, C. A. **O sistema imunológico na saúde e na doença.** Artmed, 4.ed. Porto Alegre, 2000.

JARRETT, M. E. et al. **Relationship of SERT polymorphisms to depressive and anxiety symptoms in irritable bowel syndrome.** Biol Res Nurs, v. 9(2):161-9, 2007.

KARATHANASIS, S. K. ; ZANNIS, V. I.; BRESLOW, J. L. **Characterization of the apolipoprotein A-I-C-III gene complex.** Methods Enzymol. 128:712-26, 1986.

KEEN, L. J. **The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism.** Transplant Immunology, v.10: 143-146, 2002.

KHOSHKROOD-MANSOORI, B. et al. **Irritable bowel syndrome: a population based study.** J Gastrointestin Liver Dis, v.18(4): 413-8, 2009.

KIBA, T. **Relationships between the Autonomic Nervous System, Humoral Factors and Immune Functions in the Intestine.** Digestion, v.74 (3-4): 215-227, 2007.

KITA, S. et al. **Platelets enhance contractility in perfused rat mesenteric arteries: involvement of endothelin-1.** Eur J Pharmacol, v.340: 209-215, 1997.

KOHEN, R. et al. **The Serotonin Transporter Polymorphism rs25531 Is Associated with Irritable Bowel Syndrome.** Dig Dis Sci. Jan 1, 2009.

KOTENKO, S. V. **The family of IL-10 related cytokines and their receptors: related, but to what extent?** Cytokine Growth Factor Reviews, v.13: 223-240, 2002.

KRIEGER, H. et al. **Racial admixture in North-eastern Brazil.** Ann. Hum. Genet, v. 29:113-125, 1965.

KRUIS, W. et al. **A diagnostic score for the irritable bowel syndrome: its value in the exclusion of organic disease.** Gastroenterology, v.87: 1-7, 1984.

LAZARUS, M. et al. **Genetic variation in the interleukin 10 gene promoter and systemic lupus erythematosus.** J Rheumatol, v.24: 2314 –2317, 1997.

LAU, E. M. et al. **Epidemiology of irritable bowel syndrome in Chinese.** Dig Dis Sci. v.47(11):2621-4, 2002.

LEWIS, S. J.; HEATON, K. W. **Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time.** Scand J Gastroenterol, 32(9): 920-4, 1997.

LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. **Regulation of immune responses by TGF-beta.** Annu Rev Immunol, v.16: 137-61, 1998.

LIEBREGTS, T. et al. **Immune activation in patients with Irritable Bowel Syndrome.** *Gastroenterology*, v.132 (3): 913-20, 2007.

LIM, S. et al. **Haplotype associated with low interleukin-10 production in patients with severe asthma [letter].** *Lancet*, v 352: 113, 1998.

LIO, D. et al. **Genotype frequencies of the +874T→A single nucleotide polymorphism in the first intron of the interferon- gamma  $\gamma$  gene in a sample of Sicilian patients affected by tuberculosis.** *Europ J Immunogenetics*, v.29: 371-374, 2002.

LIU, Y. et al. **Linkage disequilibrium between two loci (5'untranslated exon 1 and intron 5-DdeI) of the antithrombin III gene in three ethnic groups in Singapore.** *Hum Hered.* 45 (4): 192-8. Jul-Aug 1995.

LONGSTRETH, G. F. et al. **Related Articles, Links Functional bowel disorders.** *Gastroenterology*, v.130 (5): 1480-91, 2006. Review

LUCAS, A. et al. **Disturbed in vitro adrenergic modulation of cytokine production in inflammatory bowel diseases remission.** *J. Neuroimmunol*, v.182: 195- 203, 2006.

LULE, G. N.; AMAYO, E. O. **Irritable bowel syndrome in Kenyans.** *East Afr Med J*, v.79 (7):360-3, 2002.

MACH, T. **The brain-gut axis in irritable bowel syndrome – clinical aspects.** *Med Sci Monit*, v.10(6): RA125-131, 2004.

MACHADO, T. M. B. **Ancestralidade em Salvador Bahia.** 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Curso de Pós-graduação – Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2008.

MAES, M. et al. **The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety.** *Cytokine*, v.10(4): 313-8, 1998.

MANNING, A. P. et al. **Towards positive diagnosis of the irritable bowel.** *Br Med J*, v.2: 653-654, 1978.

MARINO, M. W. et al. **Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice.** *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94: 8093-8098, 1997.

MARTÍNEZ-MARIGNAC, V.L. et al. **Characterization of Admixture in an Urban Sample from Buenos Aires, Argentina, Using Uniparentally and Biparentaly Inherited Genetic Markers.** *Human Biology.* v.76, n.4, p. 543-557, 2004.

MARTINEZ-MARIGNAC, V.L. et al. **Admixture in Mexico City: implications for admixture mapping of Type 2 diabetes genetic risk factors.** *Hum Genet.* v. 120, n. 6, p. 807-819, 2006.

MATTOSO, K. M. Q. **Ser escravo no Brasil**. São Paulo: Brasiliense, 1982.

MÄURER, M .et al. **Genetic variation at position – 1082 of interleukin 10 (IL10) promotor and outcome of multiple sclerosis**. J Neuroimmunol, v.104: 98-100, 2000.

MAWE, G. M. et al. **Review article: intestinal serotonin signalling in irritable bowel syndrome**. Aliment Pharmacol Ther. v. 15;23(8):1067-76, 2006.

MEARIN, F.; PERELLÓ, A.; BALBOA, A. **Síndrome del intestine irritable y enfermedad inflamatoria intestinal: alguna conexión?**. Gastroenterología y Hepatología, v.32 (5): 364-372, 2009

MILLER, S. A. et al. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells**. Nucleic Acids Res, v.16, n.3, p. 1215, Feb 11, 1988.

MOCELLIN, S. et al. **The dual role of IL-10**. Trends in Immunology, v.24: 36-43, 2003.

MOK, C. C. et al. **Interleukin-10 promoter polymorphisms in Southern Chinese patients with systemic lupus erythematosus**. Arthritis and Rheumatism, v.41: 1090-1095, 1998.

MOORE, K. W. et al. **Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor**. Annu Rev Immunol, v.19: 683-765, 2001.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. **Specific Synthesis of DNA in vitro via a Polymerase-catalyzed Chain Reaction**. Methods Enzymol., v. 155: 335, 1987.

NEAL, K. R.; BARKER, L.; SPILLER, R. C. **Prognosis in post-infective irritable bowel syndrome: A six year follow up study**. Gut, v.51:410-13, 2002.

NESS, R. B. et al. **Differential distribution of allelic variants in cytokine genes among African Americans and White Americans**. Am J Epidemiol.v.160 (11):1033-8, 2004.

NIELSEN, O. H. et al. **Intestinal interleukin-8 concentration and gene expression in inflammatory bowel disease**. Scand J Gastroenterol, v. 32(10): 1028-1034,1997.

OLIVIERE, F. et al. **The –174 C/G locus affects in vitro/invivo IL-6 production during aging**. Experimental Gerontology, v. 37: 309-314, 2002.

OLLIER, W. E. R. **Cytokine genes and disease susceptibility**. Cytokine 28:174-178, 2004.

O'MAHONY, L. et al. **Lactobacillus and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles**. Gastroenterology, v.128(3): 541-51, 2005.

OMER, F. M. et al. **Maintaining Immunological Balance in Parasitic Infections: A Role for TGF- $\beta$ ?** Parasitology Today; 16: 18 -23, 2000.



- PARK, M. I.; CAMILLERI, M. **Genetics and genotypes in irritable bowel syndrome: implications for diagnosis and treatment.** *Gastroenterol Clin North Am* v.34(2): 305-17, 2005.
- PARRA, E. J. et al. **Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles.** *Am J Hum Genet*, 63:1839-1851, 1998.
- PARRA, F. C. et al. **Color and genomic ancestry in Brazilians.** *PNAS*. v. 100, n. 1, p. 177-182, 2003.
- PENA, S. D. J. **Homo Brasilis: Aspectos genéticos, lingüísticos, históricos e socioantropológicos da formação do povo brasileiro.** FUNDEC, Ribeirão Preto/SP, 2002.
- PRAVICA, V. et al. **In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene.** *Eur J Immunogenet*, v.26: 1-3, 1999.
- PODOVEI, M.; KUO, B. **Irritable Bowel Syndrome: A practical review.** *Southern medical journal*, v.99 (11): 1235-42, 2006.
- POLI, F. et al. **Allele frequencies of polymorphisms of TNFA, IL-6, IL-10 and IFNG in an Italian Caucasian population.** *Eur J Immunogenet*, v.29(3):237-40, 2002.
- QUIGLEY, E. M. **Irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease: interrelated diseases?** *Chin J Dig Dis*, v.6(3): 122-32, 2005.
- QUILICI, F. A. et al. **Síndrome do intestino irritável – Um consenso nacional.** *Rev Bras Coloproct*, v.19(4): 286- 296, 1999.
- REYNARD, M. P.; TURNER, D.; MAVARRETE, C. V. **Allele frequencies of polymorphisms of the tumour necrosis factor-alpha, interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-2 genes in a North European Caucosoid group from the UK.** *Eur J Immunogenet*, v.27(4):241-9, 2000.
- RUGTVEIT, J. et al. **Increased macrophage subset in inflammatory bowel disease: apparent recruitment from peripheral blood monocytes.** *Gut*, v.35(5):669-74, 1994.
- ROSENBERG, N. A. et al. **Genetic structure of human populations.** *Science*, v.298, n.5602, p.2381-5, Dec 20, 2002.
- ROSENBERG, N. A. et al. **Informativeness of genetic markers for inference of ancestry.** *Am J Hum Genet*, v.73, n.6, p.1402-1422, Dec, 2003.
- RYLE J, A. **Chronic spasmodic affections of tthe colon.** *Lancet* v.2: 1115-1119, 1928.
- SAIKI, R. K. et al. **Enzymatic amplification of b-globulin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.** *Science*, v. 230: 1350-1354, 1985.

- SALZANO, F. M. **Em busca das raízes**. *Ciência Hoje*, 5: 48-53, 1986.
- SANDFORD, A. J.; WEIR, T. D.; PARÉ, P. D. **Genetic risk factors for chronic obstructive Pulmonary disease**. *Eur Respir J* 10 (6): 1380-91. Jun 1997.
- SEYFERTH, G. **Colonização, imigração e a questão racial no Brasil**. *Revista USP*, v.53, p.117-49, 2002.
- SHRIVER, M. D. et al. **Ethnic-affiliation estimation by use of population-specific DNA markers**. *Am J Hum Genet*, v. 60, n.4, p.957-64, Apr, 1997.
- SHRIVER, M. D. et al. **Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping**. *Hum Genet*. v.112, p. 387-399, 2003.
- SMITH, A. J. P; HUMPHRIES, S. E. **Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality**. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 20 : 43–59, 2009.
- SONG, Y. et al. **Correlation between a gene polymorphism of tumor necrosis and inflammatory bowel disease**. *Chinese journal of digestive diseases*, v.6(4): 170-4, 2005.
- SPILLER, R.; CAMPBELL, E. **Post-infectious irritable bowel syndrome**. *Current Opinion in Gastroenterology*, v.22: 13–17, 2006.
- SPILLER, R. C. **Inflammation as a basis for functional GI disorders**. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v.18(4): 641– 661, 2004.
- SPILLER, R. C. **Role of infection in irritable bowel syndrome**. *Journal of gastroenterology*, 42 (Suppl 17): 41-7, 2007.
- SPINELLI, A. **Irritable Bowel Syndrome**. *Clinical drug investigation*, v.27(1): 15-33, 2007.
- STANCZUK, G. A. et al. **Polymorphism in codons 10 and 25 of the transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) gene in patients with invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix**. *Eur J Immunog*, v.29: 417-421, 2002.
- STEPANOV, V. A.; LEMZA, S. V. **PvuII restriction fragment length polymorphism of lipoprotein lipase in Russians**. *Hum Hered* 43(6):388-90. Nov-Dec 1993.
- SUTHANTIRAN, M. et al. **Transforming growth factor- $\beta$ 1 hyperexpression in African-American hypertensive: a novel mediator of hypertension and/or target organ damage**. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v.97: 3479-3484, 2000.
- TAGKALIDIS, P. P.; GIBSON, P.; BHATHAL, O. S. **Microscopic colitis demonstrates a TH1 mucosal cytokine profile**. *Journal of Clinical Pathology* June 14th, 2006.

- TAGORE, A. et al. **Interleukin-10 genotype and susceptibility to inflammatory bowel disease.** *Immunology, Microbiology, and Inflammatory Disorders*, v.A1087, 1998.
- TERRY, C. F. et al. **Cooperative influence of genetic polymorphisms interleukin 6 transcriptional regulation.** *J Biol Chem*, v.275: 18138-44, 2000.
- THOMPSON, W. G et al. **Functional bowel disorders and functional abdominal pain.** *Gastroenterol Int*, v.5: 75-91, 1992.
- THOMPSON, W. G. et al. **Functional bowel disorders and functional abdominal pain.** *Gut*, v.45 (Suppl II): II43–II47, 1999.
- TILG, H.; DINARELLO, C.A.; MIER, J.W. **IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators.** *IMUNOLOGY TODAY*. 18(9):428-432, 1997.
- TOURNAMILLE, C. et al. **Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals.** *Nature Genet.* 10:224-228. 1995.
- TSUKAMOTO, K. et al. **A highly polymorphic CA repeat marker at the human tumor necrosis factor alpha (TNFA alpha) locus.** *J Hum Genet*, v.43: 278-9, 1998.
- TURNER, D. M. et al. **An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter.** *Eur J Immunogenet*, v. 24: 1-8, 1997.
- UDALOVA, I. A. et al. **Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphism markers.** *Genomics*, v.16: 180-6, 1993.
- VALENZUELA J. et al. **Un consenso latinoamericano sobre el síndrome del intestino irritable.** *Gastroenterol Hepatol*, v.27(5): 325-43, 2004.
- VAN DER VEEK, P. P. et al. **Role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin 10 gene polymorphisms in irritable bowel syndrome.** *Am. J. Gastroenterol* , v.100: 2510–6, 2005.
- VISENTAINER, J. E. et al. **TNF, IFNG, IL6, IL10 and TGFB1 gene polymorphisms in South and Southeast Brazil.** *Int J Immunogenet*.v35(4-5):287-93, 2008.
- WANG, L. H.; FANG, X. C.; PAN, G. Z. **Bacillary dysentery as a causative factor of irritable bowel syndrome and its pathogenesis.** *Gut*, v.53: 1096–1101, 2004.
- WANG, B. M. et al. **A study of interleukin-10 gene polymorphism in irritable bowel syndrome.** *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, v.45(4): 289-92, 2006.
- WHITEHEAD, W. E. et al. **Impact of irritable bowel syndrome on quality of life.** *Dig Dis Sci*, v.41: 2248-2253, 1996.

WIGINGTON, W.C.; JOHNSON, W. D.; MINICHA, A. **Epidemiology of irritable bowel syndrome among African Americans as compared with whites: a population-based study.** Clin. Gastroenterol. Hepatol, v.3(7): 647-53, 2005.

WRIGHTON, S. A.; STEVENS, J. C. **The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolism.** Crit Rev Toxicol 22: 1-21, 1992.

WILSON, A. G. et al. **An allelic Polymorphism within the Human Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ -Promotor Region Is Strongly Associated with HLA A1, B8, and DR3 Alleles.** J. Exp. Med; 177: 557-560, 1993.

WILSON, A. G, et al. **Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation.** Proc Natl Acad Sci: 94; 3195-3199, 1997.

ZOU, W. G. et al. **Human Interleukin 10 Gene Therapy Decreases the Severity and Mortality of Lethal Pancreatitis in Rats.** J Surg Res, v.103: 121- 126, 2001.

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

POLIMORFISMO DE GENES DAS CITOCINAS *TNF*, *IFN- $\gamma$* , *TGF- $\beta$ 1*, *IL-10* E *IL-6* E  
MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE EM INDIVÍDUOS COM  
SÍNDROME DO INTESTINO IRRITÁVEL

Durante a leitura do documento abaixo fui informado (a) que posso interromper para fazer qualquer pergunta com objetivo de tirar dúvidas e ter melhor esclarecimento.

Posso também levar para casa para leitura mais detalhada antes de assinar.

EU, \_\_\_\_\_, fui convidado (a) por membro da equipe de Pesquisa do Serviço de Gastroenterologia e Hepatologia do HUPES, uma instituição pública de saúde, a participar de um projeto sobre a importância dos exames de laboratório na Síndrome do Intestino Irritável.

O objetivo do projeto é identificar a variação em material genético (DNA), na produção de citocinas, substâncias envolvidas na inflamação, que podem estar relacionadas aos sintomas e à evolução da minha doença. Essa predisposição não é o único fator determinante de minha doença, nem o mais importante. Estou ciente de que essa pesquisa não interferirá no curso da minha condição clínica, nem trará benefícios ou prejuízos no tratamento a que estou sendo submetido.

Durante a pesquisa um membro da equipe coletará dados pessoais meus, a história da doença e amostra de sangue para realização de exames genéticos. A retirada de sangue da veia será feita com material inteiramente descartável e poderá causar dor de fraca intensidade ou pequeno hematoma que é geralmente absorvido depois, sem problemas. O material de DNA extraído será utilizado EXCLUSIVAMENTE para fins de pesquisa clínica, sendo identificado apenas por um código, NÃO podendo ser empregado em pesquisas de paternidade ou com fins relacionados à reprodução humana.

Terei o direito de saber os resultados desta pesquisa, os quais somente serão divulgados em revistas científicas nacionais ou internacionais, documentos de trabalhos, relatórios, congressos científicos, etc. A equipe médica garantiu-me que jamais poderei ser identificado (a) como participante desta pesquisa e os dados serão publicados em revista médica SEM constar o meu nome (ou as iniciais do meu nome ou o meu endereço). Fui assegurado de que a pesquisa não apresenta qualquer tipo de risco ou constrangimento.

Caso não queira participar, não terei nenhum prejuízo em relação ao meu atendimento nesta instituição. Se aceitar, caso tenha alguma dúvida, poderei ser esclarecido pessoalmente pelos pesquisadores no Hospital Prof. Edgard Santos, Salvador - Bahia, ou pelo telefone (71) 3339-6191/6090 em ligação a cobrar.

Assim, considero-me satisfeito (a) com as explicações dadas e concordo em participar como voluntário (a) deste estudo. Como tenho dificuldade para ler SIM ( ) NAO ( ), atesto que um dos membros da equipe leu esse documento e esclareceu as minhas dúvidas e, como aceito participar do estudo, coloquei a minha assinatura (ou impressão digital).

Salvador (BA), \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

Impressão datiloscópica (quando se aplicar):



Testemunhas:

1. Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura

2. Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura

## APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA

Nº |\_|\_|\_|\_|

**Identificação**

1 Nome \_\_\_\_\_

2 Data de nascimento \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_

3 Idade (anos) |\_|\_|

4 Sexo |\_| (1) Feminino (2) Masculino

5 Etnia |\_| (1) Branca (2) Mulato claro (3) Mulato Médio (4) Mulato escuro  
(5) Negro (6) Outro (especificar) \_\_\_\_\_

6 Estado civil |\_| (1) Solteiro (2) Casado (3) Divorciado (4) Viúvo

7 Escolaridade |\_| (1) Analfabeto (2) 1º grau incompleto (3) 1º grau completo  
(4) 2º grau incompleto (5) 2º grau completo (6) Superior incompleto (7) Superior completo

Contato \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_

Cidade \_\_\_\_\_ |\_|\_| Telefones \_\_\_\_\_

Naturalidade \_\_\_\_\_ |\_|\_| Ocupação \_\_\_\_\_ |\_|

**Aspectos clínicos:**

Serviço médico \_\_\_\_\_ |\_|\_| N° do prontuário |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

Data da primeira consulta \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ |\_|\_|\_|\_|\_|\_|\_|

**8 Início dos primeiros sinais e sintomas (mês e ano)** \_\_\_/\_\_\_ |\_|\_|\_|\_|**9 Apresentação clínica** |\_| (1) Diarréia (2) Constipação (3) Mista**10 Escala Bristol de Forma das Fezes** |\_|

(1) Carochos duros e isolados, como castanhas (2) Forma de salsicha, mas encaroçada (3) Forma de salsicha, com rachaduras na superfície (4) Forma de salsicha ou cobra, macia e lisa (5) Porções moles, com margens nítidas (6) Porções moles, com margens mal definidas (7) Aquosas, sem porções sólidas

**11 Outros sinais e sintomas (1) Sim (2) Não**

Dor abdominal Difusa  Desconforto abdominal  Distensão abdominal

**12 Critérios de Roma (1) Sim (2) Não**

Alívio com defecação  Início associado com mudança na frequência das fezes  Início associado com mudança na forma (aparência) das fezes

**13 Sinais de Alerta (1) Sim (2) Não**

Idade superior a 60 anos  Perda de peso superior a 1kg/mês   
Sangramento digestivo  Febre ou outro sintoma sistêmico

**14 Diarréia aguda prévia  (1) Sim (2) Não**

**15 Antecedentes Médicos**

**16 História familiar de SII  (1) Sim (2) Não**

**17 Fatores Psicossociais (1) Sim (2) Não**

Stress  Distúrbios do sono  Depressão  Ansiedade   
Distúrbios psiquiátricos  quais? \_\_\_\_\_

**18 Tratamentos em uso**

**19 Exames Complementares**

**Hemograma** (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) Resultado \_\_\_\_\_

**VHS** (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

Resultado \_\_\_\_\_

**PCR** (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) Resultado \_\_\_\_\_

**Parasitológico de Fezes** (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_) Resultado \_\_\_\_\_

**T4 e TSH** (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

Resultado \_\_\_\_\_

**Outros** \_\_\_\_\_ (\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_)

**20 Caso (1) Controle (2)**



## APÊNDICE C – MARCADORES INFORMATIVOS DE ANCESTRALIDADE

### **Inserção/Deleção (*AT3-I/D*)**

A antitrombina III (AT3) é o mais importante inibidor irreversível da trombina e outras proteinases da coagulação como fatores IXa, Xa, XIIa. É um membro da família dos inibidores das serina proteinases. O gene da AT3 localiza-se no cromossomo 1 (1q25.1), possui 19kb e sete éxons (Liu *et al.* 1995). O polimorfismo analisado (inserção/deleção) tem 76bp de comprimento na região 5' do éxon 1 (Liu *et al.*, 1995). A presença desta inserção gera um fragmento de 572bp que é mais freqüente na população africana e caracteriza o alelo *AT3-I/D\*1*.

### **Inserção Alu (*SB19.3*)**

A inserção Alu Sb19.3 pertence a subfamília Yb8 e está localizada no cromossomo 19p12 (Arcot *et al.*, 1998). A presença da inserção Alu gera um fragmento de aproximadamente 457pb que caracteriza o alelo *Sb19.3\*1*. Este alelo apresenta freqüência elevada em europeus e nativo-americanos.

### **Inserção Alu (*APO*)**

O locus Alu APO está próximo ao complexo de genes da apolipoproteína AI-CIII-AIV no braço longo do cromossomo 11 (Karathanasis *et al.*, 1986). A presença da inserção Alu gera um fragmento de aproximadamente 409pb e caracteriza o alelo *APO\*1*, bastante freqüente em nativo-americanos e europeus.

### **Inserção Alu (*PV-92*)**

O Alu PV-92 localiza-se no cromossomo 16 (Batzer *et al.*, 1994) e a caracterização do alelo *PV92\*1* dar-se pela presença da inserção Alu que gera um fragmento de aproximadamente 400pb, mais prevalente em populações asiáticas.

### **SNP *FY-null* (antígeno Duffy)**

O gene DARC (do inglês, *Duffy antigen receptor for chemokines*) é composto por um único exon e uma única substituição (T>46C) na região promotora do gene cria um alelo *FY\*B* silencioso, também chamado nulo ou *FY\*O*. Esta mutação confere resistência a malária *vivax* por abolir a expressão do RNAm, visto que o antígeno do grupo sanguíneo Duffy funciona como receptor eritrocitário para o parasita da malária *Plasmodium vivax* (Tournamille *et al.* 1995).

Os antígenos Duffy são proteínas multiméricas da membrana de eritrócitos compostas por diferentes subunidades. Uma glicoproteína de 35 a 45 kD nomeada GPD é a subunidade principal da proteína complexa e tem as determinantes antigênicas definidas por anti-Fy (a), anti-Fy (b), e os anticorpos anti-Fy6 (Hadley *et al.*, 1984). O fenótipo Fy (a-b-) fornece a proteção completa para infecção pelo *Plasmodium vivax*. A variante a ser analisada neste estudo está relacionada com o fenótipo Fy (a-b-) que teve sua base molecular demonstrada por Tournamille *et al.* (1995). Esta é uma transição de uma adenina (A) para uma Guanina (G) na posição -46 da região promotora deste gene. A população européia praticamente possui apenas o alelo A, convencionalmente chamado de alelo *FY-null\*1*, juntamente com os nativos americanos, enquanto que os africanos apresentam apenas o alelo G.

*FY-Null* é um marcador quase perfeito para diferenciar a ancestralidade européia e africana, pois seu alelo nulo é praticamente fixo nas populações do norte da África, e raramente encontrado em não africanos. Em africanos, o fenótipo dominante é o Fy(a-b-), no qual os eritrócitos não possuem os antígenos Fya e Fyb e resistem à invasão pelo *Plasmodium vivax*.

### **SNP *LPL***

A lipoproteína lipase (LPL) desempenha um papel importante no metabolismo de triglicérides, pois, está envolvida no catabolismo de partículas como quilomícrons e VLDL (do inglês, very low density lipoproteins) (Stepanov & Lemza 1993). A variante a ser estudada no locus *LPL* é uma transição de uma timina (T) para uma citosina (C). Está localizada no intron 6 do gene da lipoproteína lipase (LPL), onde o alelo T, também conhecido como alelo *LPL\*1*, encontra-se mais frequente em populações africanas e o alelo C em populações asiáticas, sendo que as populações européias apresentam frequências semelhantes desses alelos.

### **SNP CKMM**

A creatina cinase existe como um dímero: a enzima do músculo (MM) consiste em 2 subunidades idênticas de M, e a do cérebro (BB) consiste em 2 subunidades idênticas de B (Dawson et al., 1968). Outros tecidos mostram uma terceira, a enzima híbrida MB. As isozimas dimericas da creatina cinase estão envolvidas na manutenção dos níveis intracelulares de ATP, particularmente nos tecidos que têm demandas de energia elevada. A isozima MM da creatina cinase é encontrada exclusivamente em músculo estriado; a isozima BB é encontrada no músculo liso, cérebro e nervos; CKMB é encontrado no coração humano.

O gene da creatina cinase está localizado no cromossomo 19q13.32 e o polimorfismo estudado neste gene consiste em uma transição C>T, no éxon 8. Sendo o alelo C prevalente nas populações européias e africanas e o T, ou alelo CKMM\*1, na asiática.

### **SNP GC**

A proteína ligadora de vitamina D tem seu gene localizado no cromossomo 4. Neste foram identificadas duas mutações no éxon 11, uma na posição 34, uma transição de G para T, que leva a troca de um ácido aspártico para um ácido glutâmico na cadeia polipeptídica, no códon 416. E outra no nucleotídeo 45, a substituição de uma C por uma A com conseqüente alteração de um aminoácido treonina para uma lisina no códon 420 (Braun et al., 1992).

A combinação dessas mutações gera três diferentes isoformas da proteína ligadora de vitamina D (Sandford et al., 1997). Cada isoforma corresponde a um alelo: \*1F (T para o nucleotídeo 34 e C para o 45), mais freqüente em africanos, \*1S (G para o 34 e C para 45), mais freqüente em europeus, e o 2 (com uma T na posição 34 e A na 45).

### **SNP RB2300**

Os primers utilizados para o *locus* RB2300 flanqueiam uma região de 180bp no intron 1 do gene do Retinoblastoma (RB) (Bookstein *et al.* 1990). A presença de um sítio de restrição da enzima *Bam*HI nesta região permite a detecção de dois fragmentos após a reação de restrição: 130bp e 50bp. A ausência do sítio da *Bam*HI, e conseqüentemente a presença do fragmento de 180bp após a reação de restrição caracterizam o alelo *RB2300\*1*.

## APÊNDICE D – REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

### **Análise do Polimorfismo do Tamanho dos Fragmentos de Restrição (PCR RFLP)**

Após a PCR convencional dos SNPs nos *loci* RB2300, GC-1F e GC-1S foi realizada a técnica de PCR-RFLP. Nesta técnica, o produto da PCR é submetido à ação de endonucleases de restrição (enzimas de restrição) que cortam os fragmentos em locais específicas e pontuais já bem descritos na literatura, que chamamos de sítios de restrição. Como os *primers* da reação de PCR são desenhados de forma a flanquearem a região do gene que contém o sítio de restrição, caso o indivíduo tenha a mutação, a enzima hidrolisa o fragmento. O indivíduo pode ser homozigoto para presença ou para ausência do sítio de restrição e heterozigoto.

Os tubos foram então colocados em termociclador a temperatura de 37°C (específica para atividade as enzimas de restrição utilizadas) por um período de 3 horas.

### **Análise dos produtos de PCR e PCR-RFLP em gel de poliacrilamida**

Após a amplificação, e/ou digestão por enzima de restrição (PCR ou PCR-RFLP), todos os produtos foram checados na eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (9,743 mL de água deionizada; 6,667 mL de acrilamida + bis-acrilamida (29 g de acrilamida recristalizada + 1 g de bisacrilamida recristalizada, em 100 ml de água deionizada); 1,4 ml de glicerol; 2,0 mL de tampão TBE 10x (Tris/HCl 0,9 M pH 8,0; EDTA; Ácido Bórico); 15 uL de TEMED (N, N, N', N', tetrametiletilenodiamina); 300 uL de persulfato de potássio (100 mg/ml).

Um volume de 5µL do produto amplificado foi misturado com 5µL do tampão de amostra 2x (0,06 g de xileno cianol, 0,06 g de azul de bromofenol e 20g de glicerol). A cuba de eletroforese foi então conectada a uma fonte de alta voltagem e tanto a voltagem quanto a amperagem foram ajustadas conforme o fragmento a ser checado.

Após a corrida eletroforética, o gel era corado de acordo com o protocolo adaptado (Sanguinetti et al., 1994). O gel era então colocado num recipiente limpo contendo 100 mL de solução fixadora (50 mL de etanol + 2,0 mL de ácido acético + água destilada qsp. 200mL) e colocado num agitador por 5 min. Em seguida, o gel foi transferido para um recipiente contendo

0,3g de nitrato de prata diluído em água destilada qsp. 200 mL e novamente foi colocada num agitador por 5 min. A solução foi descartada e o gel lavado duas vezes em água destilada. Posteriormente, foi adicionado a solução reveladora (4,5g de NaOH + 1mL de formaldeído + água destilada qsp. 200 mL) e o gel foi agitado até o aparecimento das bandas. Para finalizar, a reação foi bloqueada adicionando-se a mesma solução fixadora utilizada anteriormente.

### **PCR em tempo real (*Real Time PCR*)**

Para a genotipagem dos SNPs nos *loci* LPL, CKMM e Fy null foi realizado o *Real Time – PCR* (RT-PCR). Esta técnica permite distinguir os alelos por conta da quantificação da fluorescência emitida por cada sonda específica (TaqMan® MGBprobes). A sonda hibridiza a região complementar do DNA alvo depois dos sítios de ligação dos primers. Cada sonda é marcada com um fluoróforo diferente denominado reporter (R) na extremidade 5' que emite fluorescência e outro fluoróforo na extremidade 3' denominado quencher (Q) cuja função é absorver a emissão de fluorescência do reporter. Então, como durante a PCR ocorre a hibridização dos primers e da sonda no fragmento de DNA alvo, a enzima Taq DNA polimerase começa a extensão a partir dos primers. Quando a atividade de extensão chega ao local onde está a sonda, a atividade exonucleásica 5'-3' da Taq cliva a sonda a partir da extremidade 5'. Assim, a fluorescência emitida pelo repórter não será mais absorvida pelo quencher podendo então ser detectada.

A intensidade da fluorescência aumenta proporcional ao número de cópias que foram amplificadas.

As reações de amplificação foram feitas em um volume final de 25 µL, composto por 10,25 µL de água estéril, 12,3 µL da solução *Universal PCR Master Mix TaqMan®* (Applied Biosystems), 1,25 µL do primer com a sonda (*TaqMan® – Applied Biosystems*) e 5-15µg de DNA. Todas as reações foram realizadas em placas de microtitulação de 96 poços de polipropileno. As condições do RT-PCR foram as seguintes: 1 ciclo de 50°C por 1 minuto; 1 ciclo de 94°C por 6 min; 40 ciclos de 94°C por 15 seg/60°C 1 min.

APÊNDICE E- MANUSCRITO PARA PUBLICAÇÃO

**Polimorfismo de genes das citocinas *TNF*, *IFN- $\gamma$* , *TGF- $\beta$ 1*, *IL-10* e *IL-6* e Marcadores Informativos de Ancestralidade em indivíduos com Síndrome do Intestino Irritável do estado da Bahia**

Lopes, MPP<sup>1</sup>; Abe-Sandes, K<sup>1,2,3</sup>; Machado, TMB<sup>1,2</sup>; Guedes, JC<sup>4</sup>; Bendicho, MT<sup>1</sup>; Meyer, R<sup>1</sup>; Lemaire, DC<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciências da Saúde - Laboratório de Imunologia – UFBA – Bahia; <sup>2</sup> Laboratório Avançado de Saúde Pública – LASP/CPqGM/FIOCRUZ; <sup>3</sup> Departamento de Ciências da Vida – Universidade do Estado da Bahia – UNEB; <sup>4</sup> Faculdade de Medicina- Universidade Federal da Bahia

**Introdução:** A Síndrome do Intestino Irritável (SII) é uma desordem funcional do trato gastrointestinal, caracterizada por dor abdominal e alteração da motilidade e sensibilidade intestinal, acompanhada por desconforto. A patogenia da SII é complexa e pouco entendida. Estudos genéticos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de identificar possíveis marcadores de predisposição ou proteção ao desenvolvimento desta doença. Alguns trabalhos sugerem que a predisposição ao desequilíbrio na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias tem um importante papel na SII. Este é o primeiro estudo que avalia Marcadores Informativos de Ancestralidade (do inglês *Ancestry Informative Marker* - AIMs) em indivíduos com SII.

**Objetivo:** Estudar a associação entre SII e polimorfismos nos genes das citocinas *TNF*, *TGF- $\beta$ 1*, *IL-10*, *IL-6*, *IFN- $\gamma$* ; e estimar a associação da ancestralidade genômica com o desenvolvimento da SII utilizando os AIMs: *PV92*, *AT3*, *Sb19.3*, *APO*, *CKMM*, *Fynull*, *LPL*, *GC* e *RB2300*. **Material e Métodos:** Foram selecionados 55 pacientes com SII obedecendo aos critérios de Roma III e exclusão de co-morbidades, e 116 controles. O DNA genômico foi extraído dos leucócitos do sangue periférico pelo método de *Salting-out* (extração salina) e a genotipagem dos AIMs foi feita por PCR convencional, PCR-RFLP ou PCR Real Time e das citocinas por PCR-SSP utilizando o kit “*Cytokine Genotyping Tray*” (*One Lambda Incorporation*).

**Resultados:** Não houve diferenças significantes nas frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas dos polimorfismos em genes de citocinas entre os grupos. A mistura étnica genômica global foi semelhante em ambos os grupos. Houve maior tendência (sem significância estatística) de contribuição européia no grupo SII. Foram observadas diferenças significantes do *locus* isolado *AT3* (africano) no grupo SII, comparado ao controle ( $p=0,0291$ ); e na frequência do *locus* *PV92* (ameríndio) em pacientes com SII forma diarréica em relação às demais formas ( $p=0,012$ ).

**Conclusões:** Polimorfismos nos genes das citocinas não mostraram associação com a SII. A forma clínica diarréica apresentou maior ancestralidade ameríndia, quando comparada às outras formas. A maior contribuição da ancestralidade ameríndia pode ser um fator de predisposição à forma diarréica de SII.

**Palavras-chaves:** Síndrome do Intestino Irritável. Polimorfismos genéticos. Citocinas. Marcadores Informativos de Ancestralidade.

## INTRODUÇÃO

Síndrome do Intestino Irritável (SII) é uma desordem gastrointestinal funcional e multifatorial caracterizada pela presença de dor abdominal ou desconforto contínuo ou remitente (aliviando após defecação), plenitude ou distensão abdominal, alteração no ritmo intestinal, hipersensibilidade intestinal e ausência de marcadores específicos. Os sintomas não são explicados por nenhuma causa orgânica, mecânica, química ou inflamatória. Esta doença, muitas vezes, não faz parte do raciocínio clínico de muitos dos médicos. Desta forma, o diagnóstico de SII normalmente é feito após a exclusão de outras desordens gastrointestinais mais complexas (DINAN et al., 2006; GILKIN, 2005; SPINELLI, 2007; BARKHORDARI et al., 2009).

A SII pode ser classificada (formas clínicas) de acordo com o hábito intestinal predominante que pode ser: a) Diarréia (forma diarréica – SII-D); b) Constipação ou obstipação (forma obstipante ou constipante - SII-C) e Alternante ou mista (alterna diarréia e constipação - SII-A) (TALLEY et al., 1995; QUILICI et al., 1999; B.GEERAERTS et al., 2006). Uma quarta forma clínica, menos comum, a SII não classificada, tem sido sugerida (HOTOLEANU et al., 2008).

A SII é um dos distúrbios funcionais digestivos mais frequentes e com maior impacto socioeconômico do mundo (MEARIN et AL., 2009); Segundo a Associação Americana de Gastroenterologia, a SII constitui cerca de 28% das consultas aos especialistas. Afeta 10% a 20% da população mundial e tem um grande impacto na qualidade de vida e no custo de atenção à saúde (MACH, 2004; PODOVEI & KUO, 2006; SPINELLI, 2007; HOTOLEANU et al., 2008 ). Nos EUA (Estados Unidos da América), Europa e Ásia a prevalência é de cerca de 10% a 20%. Na América Latina, a prevalência oscila entre 9% a 18% (VALENZUELA et al., 2004). As mulheres são três a quatro vezes mais acometidas pela SII do que os homens; apresentam sintomas mais frequentes e mais graves e procuram assistência médica mais comumente (MACH, 2004; VALENZUELA et al., 2004).

Dados epidemiológicos da SII no Brasil são escassos. O único estudo nacional de magnitude encontrado foi realizado por Quilici e colaboradores (1999), e mostra que a prevalência da SII é de 10%, a idade dos pacientes com SII variou de 12 a 89 anos; foi observado predomínio do gênero feminino (58,6%) em relação ao masculino (41,4%); a dor abdominal foi o sintoma clínico mais relatado (95,2%) e a forma alternante (mista) foi a mais frequente (41%).

A SII pode estar associada à distresse emocional e diminuição na qualidade de vida, e tem um impacto psicológico e social importante (Mach, 2004). Além disso, de acordo com Drossman e colaboradores (1993) há um impacto na produtividade e no absenteísmo nos locais de trabalho.

A associação dos sintomas que define a SII tem sido descrita desde o século XIX (CUMMING, 1849). A maioria das hipóteses atuais para explicar a etiologia e fisiopatologia da SII parecem ter sido formulada antes de 1950: Influência hormonal (RYLE, 1928), intolerância alimentar (HOLLANDER, 1927), pós-infecção (RYLE, 1928) e hipersensibilidade do trato gastrointestinal (BOCKUS et al., 1928).

A patogênese exata da SII não está claramente identificada, mas outras prováveis hipóteses também são estudadas como: influência da dieta, mudanças no estilo de vida, (SPINELLI, 2007; HOTOLEANU et al., 2008); motilidade gastrointestinal alterada, inflamação, desequilíbrio de neurotransmissores e fatores psicológicos como o estresse (Gilkin, 2005; VAN DER VEEK et al., 2005; Dinan et al., 2006; Spiller, 2007; BARKHORDARI et al., 2009).

A hipótese inflamatória é ainda sugerida e isto se deve à alta frequência de sintomas associados à SII em pacientes com DII (Doença Inflamatória Intestinal) em remissão (Crentsil, 2005; spiller, 2007); inflamações persistentes, resultantes do desequilíbrio das citocinas regulatórias como a IL-10 (GONSALKORALE et al., 2003); ao fato de que cerca de 7-31% dos pacientes desenvolvem SII após gastroenterite infecciosa (Spiller et al., 2004; Crentsil, 2005; spiller, 2007); e ao dano na mucosa e rompimento do equilíbrio da microbiota comensal do intestino causada por infecções de organismos patogênicos. Todos estes fatores podem prolongar a disfunção intestinal e levar a SII pós- infecciosa (SII-PI) (spiller, 2007).

Alguns estudos foram desenvolvidos com a finalidade de identificar possíveis marcadores genéticos de predisposição ou proteção ao desenvolvimento desta doença (GWEE et al., 2003; DINAN, 2006; AKIHO et al., 2005.1; PARK & CAMILLERI, 2005). Recentemente foi sugerida a existência de fatores genéticos associados à SII com base nos resultados de estudos com diferentes abordagens: a) de agregação familiar; b) estudos em gêmeos e c) de associação de polimorfismos genéticos (HOTOLEANU et al., 2008). Dentre os possíveis marcadores, foram realizados estudos para avaliar a associação de genes de citocinas pró-inflamatórias ou regulatórias e a SII (GWEE et al., 2003; GONSALKORALE et al., 2003; WANG et al., 2006; PARK&CAMILLERI, 2005; DINAN et al., 2006; BARKHORDARI et al., 2009).



### *Polimorfismo em genes de citocinas e SII*

Os polimorfismos em genes de citocinas pró- e anti- inflamatórias estão dentre os vários mecanismos dependentes do hospedeiro que podem favorecer o desenvolvimento da SII (MEARIN et al., 2009). Alguns autores relatam associação entre polimorfismos em genes de citocinas e os níveis de produção destas moléculas, sugerindo papel na SII (GONSALKORALE et al., 2003; VAN DER VEEK et al., 2005; WANG et al., 2006; BARKHORDARI et al., 2009). A ancestralidade genética está entre os fatores que podem influenciar a herança do polimorfismo em genes de citocinas e conseqüentemente frequências alélicas de polimorfismos variam entre indivíduos de diferentes etnias (COX et al., 2001; HOFFMANN et al., 2002; VISENTAINER et al., 2008).

A análise do polimorfismo dos genes das citocinas e a relação com a gravidade e a susceptibilidade a doenças podem contribuir com o entendimento da patogênese, heterogeneidade clínica e apontar novos alvos terapêuticos (OLLIER, 2004).

Há autores que discordam da possibilidade de que polimorfismos genéticos podem exercer algum papel na patogenia ou etiologia da SII (PARK & CAMILLERI, 2005). Entretanto, dados crescentes sugerem que desregulação na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF, e anti-inflamatórias, como IL-10, podem estar associadas a polimorfismos herdados. Como consequência pode ocorrer má regulação do processo inflamatório, resultando numa inflamação persistente (COLLINS, 2005; CRENTSIL, 2005).

Van der Vekk e colaboradores (2005) observaram maior prevalência do genótipo heterozigoto G/A da posição -308 (fenótipo previsto de alta produção da citocina TNF) em um grupo de pacientes com SII comparada ao grupo controle, enquanto que a frequência do genótipo homozigoto A/A (baixa secreção) foi similar entre SII e controle. Outro aspecto interessante é a maior prevalência da combinação simultânea de genótipos responsáveis pela baixa secreção de IL-10 e alta secreção de TNF em indivíduos com SII comparados com controles e da SII-D quando comparada com as outras formas clínicas (COLLINS, 2005; VAN DER VEEK et al., 2005).

Gonsalkorale e colaboradores (2003), analisando genótipos de pacientes com SII e controles sadios, encontraram menores frequências do genótipo de alta produção de IL-10 (-1082 G/G) e maiores frequências do genótipo de baixa produção de IL-10 (-1082 A/A) em pacientes com SII.

A frequência genotípica de polimorfismos do *TGFBI* (códon 10 e 25) também foi analisada, porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo de pacientes e o de indivíduos controles.

Wang e colaboradores (2006) investigaram a possível associação entre os polimorfismos *IL10* -1082, -819 e -592 e a SII-D. Comparados com pacientes saudáveis, pacientes com SII-D apresentaram maior frequência dos alelos -592 A e -819 T e genótipos da IL-10 (-819 T/T e -592 A/A) associados à predisposição genética à baixa produção desta citocina.

Recentemente, os resultados do estudo de Barkhordari e colaboradores (2009) com polimorfismos em genes de citocinas pro-inflamatórias (IL-6, TNF e IL-1), mostraram que o alelo G e o homozigoto G/G do polimorfismo *IL-6* -174 G>C foi maior enquanto que o heterozigoto G/C foi menor em pacientes com SII quando comparados com o controle. Sugerindo que este polimorfismo pode interferir na susceptibilidade à SII, podendo desempenhar um papel importante na patogênese desta doença.

### ***A Síndrome do Intestino Irritável em diferentes populações***

Alguns estudos mostram que a prevalência da SII é similar em brancos e negros, sugerindo que o grupo étnico não é um fator determinante para esta doença (Mach, 2004; PoDOVEI & KUO, 2006).

Contudo, alguns trabalhos mostram diferenças na prevalência da SII em diferentes populações. Em estudo realizado por Lule & Amayo (2002), a prevalência da SII nos 3472 negros Kenianos foi de 8%, maior em homens e a forma clínica mais prevalente foi a constipação. A média de idade foi 40 anos (11 - 75 anos), sendo mais prevalente na terceira década de vida.

Gwee e colaboradores (2004) estudaram 3000 indivíduos com SII em uma população de Cingapura (sul da Ásia). Não foi encontrada diferenças quanto à idade, o gênero e a distribuição racial em relação à população geral. A prevalência da SII foi cerca de 10% e as pessoas com idade inferior a 50 anos foram as mais atingidas. A forma constipante foi mais comum do que a diarreica (51% x 12,8%) nesta população.

A prevalência de SII em 1298 chineses de Hong Kong utilizando os critérios de Roma II foi de 3,6 % em homens e 3,8% em mulheres, sendo mais prevalente em indivíduos classificados com idade inferior a 30 anos (LAU et al., 2002).

E em trabalho realizado por Dong e colaboradores (2005), a prevalência da SII em crianças e adolescentes da China (6 a 18 anos) foi de 13,25%, sendo maior nas meninas e em indivíduos classificados como brancos. Estes mesmos autores observaram disparidade na prevalência entre populações de diferentes áreas geográficas: Heilongjiang (14%) e em Shanghai (12%).

Em uma população de 990 indivíduos (320 brancos e 670 afroamericanos) do estado americano Mississippi a SII foi 2,5 vezes mais prevalente em brancos quando comparados aos afroamericanos baseado nos critérios de Roma II (WIGINGTON et al, 2005).

A prevalência da SII segundo os critérios de Roma III foi relativamente baixa em iranianos adultos (1,1%). O gênero feminino foi o mais acometido, o sintoma mais relatado foi a dor abdominal que aliviava com a defecação e a mudança na aparência e frequência das fezes. A forma clínica mais comum foi a constipação (52%). (KHOSHKROOD-MANSOORI et al., 2009).

Além da influência da etnia, estas divergências podem ser atribuídas ao uso de diferentes critérios diagnósticos (LAU et al., 2002) e influências de fatores culturais e sociais (PODOVEI & KUO, 2006).

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Seleção da amostra***

A seleção e avaliação clínica dos pacientes foram realizadas no ambulatório do C-HUPES (Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos), na Clínica Gastro e na Clínica FTC (Faculdade de Tecnologia e Ciência) na cidade de Salvador- Bahia- Brasil. Os pacientes foram acompanhados por um período de dois anos e seis meses consecutivos.

Foram selecionados 55 pacientes com SII, obedecendo aos critérios de Roma III e excluídas a presença de co-morbidades (doença do colágeno, neoplasias, AIDS, doença celíaca, intolerância à lactose, distúrbios tireoidianos). Pacientes com resultados de exames laboratoriais realizados no máximo um mês antes da consulta, com um dos seguintes achados: pesquisa de leucócitos fecais positiva, parasitológico de fezes seriado (três amostras) positivo para helmintos ou protozoários, velocidade de hemossedimentação elevada, anemia, mulheres grávidas e pacientes submetidos a cirurgias abdominais também foram excluídas do estudo. Os pacientes que concordaram em participar da pesquisa foram convidados a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

O grupo controle histórico foi composto de 116 indivíduos aparentemente saudáveis, doadores de sangue do STS (Serviço de Transfusão de Sangue) (BENDICHO, 2004).

### ***Coleta de sangue***

Foi coletado, de cada indivíduo, 5,0 mL de sangue total em tubo contendo EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético), que foi utilizado para obtenção de DNA genômico pelo método de *salting-out* modificado (MILLER, 1988).

### ***Polimorfismos genéticos***

Os polimorfismos selecionados para o presente estudo foram: *TNF* -308G>A, *TGFBI* (10T>C, 25G>C), *IL10* (-1082G>A, -819C>T, -592C>A), *IL6* -174G>C e *IFNG* +874T>A. A genotipagem foi realizada pelo método da PCR-SSP (*Sequence Specific Primer*) utilizando o kit *Cytokine Genotyping Tray* da *One Lambda Incorporation*. Depois do processo de PCR-SSP, os fragmentos de DNA amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,5% e visualizados por coloração com brometo de etídio após exposição à luz ultravioleta.

### ***Marcadores Informativos de Ancestralidade***

Foram analisados dez AIMs, sendo um polimorfismo do tipo inserção/deleção (indel): AT3-I/D; três inserções Alu (APO, PV92, SB19.3), e seis polimorfismos de único nucleotídeo (SNPs): CKMM, FY-null, LPL, RB2300, GC-1F e GC-1S. As regiões polimórficas dos *loci* AT3-I/D, APO, PV92 e SB19.3 foram amplificadas por PCR convencional (SAIKI et al., 1985; MULLIS et al., 1987). Os *loci* GC e RB2300, após a PCR convencional foram submetidos à digestão por PCR-RFLP. As regiões polimórficas dos *loci* LPL, FY-null e CKMM foram analisadas por PCR em tempo real (RT-PCR).

## **RESULTADOS**

### ***Dados demográficos e clínicos***

Um total de 55 indivíduos com SII e 116 controles (indivíduos doadores de sangue do Serviço de Transfusão de Sangue) foram incluídos no estudo. A média da idade do grupo de pacientes com SII foi 49,9±14,5 anos e a mediana do grupo controle foi 40,04 anos. A SII foi mais frequente no

gênero feminino (76%) que no masculino (24%) e a forma clínica mais comum foi a diarreica (51%), seguida da obstipante (29%) e alternante ou mista (20%).

### ***Frequências fenotípicas do TGF-β1***

A distribuição das frequências dos fenótipos previstos para o polimorfismo do gene *TGFBI* (códon 10T>C; códon 25G>C), analisada nos grupos de pacientes com SII e controle, é mostrada na Tabela 1. As frequências fenotípicas inferidas com base na análise dos genótipos foram 0,65, 0,3 e 0,05 tanto para o grupo de pacientes com SII quanto para o grupo controle, para alto, intermediário e baixo produtor de TGF-β1, respectivamente.

Tabela 1- Distribuição das frequências fenotípicas para o polimorfismo do gene *TGFBI* (códon 10T>C; códon 25G>C) em pacientes com SII e o grupo controle.

	SII (N=55) N / %	Controle (N=116) N / %	valor de p
Alto produtor	(36) 0,65	(76) 0,65	1,000 <sup>a,b,c</sup>
Intermediário	(16) 0,3	(34) 0,3	
Baixo produtor	(03) 0,05	(6) 0,05	

<sup>a</sup>Alto/ Intermediário+Baixo; <sup>b</sup>Intermediário/Alto+Baixo; <sup>c</sup>Baixo/ Intermediário+Alto

### ***Frequências fenotípicas do INF-γ***

As frequências dos fenótipos previstos foram 0,13, 0,47 e 0,4 para o grupo de pacientes com SII e 0,14, 0,41 e 0,45 para o grupo controle, para altos (T/T), intermediários (T/A) e baixos (A/A) produtores de IFN-γ, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2- Distribuição das frequências fenotípicas para o polimorfismo do gene *IFNG* +874 T>A em pacientes com SII e o grupo controle.

	SII (N=55) N / %	Controles (N=116) N / %	valor de p
Alto produtor	(7) 0,13	(21) 0,18	0,387 <sup>d</sup>
Intermediário	(26) 0,47	(41) 0,36	0,181 <sup>e</sup>
Baixo Produtor	(22) 0,42	(52) 0,46	0,513 <sup>f</sup>

<sup>d</sup>Alto/ Intermediário+Baixo; <sup>e</sup>Intermediário/Alto+Baixo; <sup>f</sup>Baixo/ Intermediário+Alto

### ***fenotípicas da IL-6***

As frequências dos fenótipos previstos foram 0,9 e 0,1 para o grupo de pacientes com SII e 0,92 e

0,08 para o grupo controle para altos (G/G e G/C) e baixos produtores (C/C) de IL-6, respectivamente. Estes valores estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3- Distribuição das frequências fenotípicas para o polimorfismo do gene *IL-6* -308 G>A em pacientes com SII e o grupo controle.

	SII (N=55) N / %	Controle (N=116) N / %	valor de p
Alto produtor	(49) 0,9	(106) 0,92	0,567
Baixo produtor	(6) 0,1	(09) 0,08	

#### ***Frequências fenotípicas da IL-10***

As possíveis combinações dos polimorfismos nas posições -1082, -819 e -592 formam os haplótipos GCC, ACC e ATA. Para a análise estatística, os genótipos foram agrupados de acordo com os fenótipos. Deste modo, os genótipos GCC/ACC e GCC/ATA são produtores intermediários, os genótipos ACC/ACC, ACC/ATA e ATA/ATA são baixos produtores e o genótipo GCC/GCC corresponde a altos produtores. A tabela 4 mostra os valores da distribuição das frequências do fenótipo previsto para a IL-10 neste estudo.

Tabela 4- Distribuição das frequências fenotípicas para os polimorfismos -1082G>A, -819C>T e -592C>A do gene *IL10* em pacientes com SII e um grupo controle.

	SII (N=55) N / %	Controle (N=116) N/%	valor de p
Alto produtor	(5) 0,1	(14) 0,12	0,614 <sup>a</sup>
Intermediário	(25) 0,45	(57) 0,5	0,627 <sup>b</sup>
Baixo produtor	(25) 0,45	(44) 0,38	0,406 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Alto/ Intermediário+Baixo; <sup>b</sup>Intermediário/Alto+Baixo; <sup>c</sup>Baixo/ Intermediário+Alto

#### ***Frequências fenotípicas do TNF***

A Tabela 5 mostra as frequências dos fenótipos previstos para o TNF. As frequências dos fenótipos previstos de alto (G/A e A/A) e baixo (G/G) produtores são 0,16 e 0,84 no grupo de pacientes com SII e 0,28 e 0,72 no grupo controle. A comparação das frequências entre os grupos não revelou diferença estatisticamente significativa (p=0,2108).

Tabela 5- Distribuição das frequências fenotípicas para o polimorfismo do gene  $-308 G>A$  do gene *TNF* em pacientes com SII e um grupo controle.

	SII (N=55)		Controle (N=116)		valor de p
	N / %		N/%		
Alto produtor	(9)	0,16	(32)	0,28	
Baixo produtor	(46)	0,84	(84)	0,72	

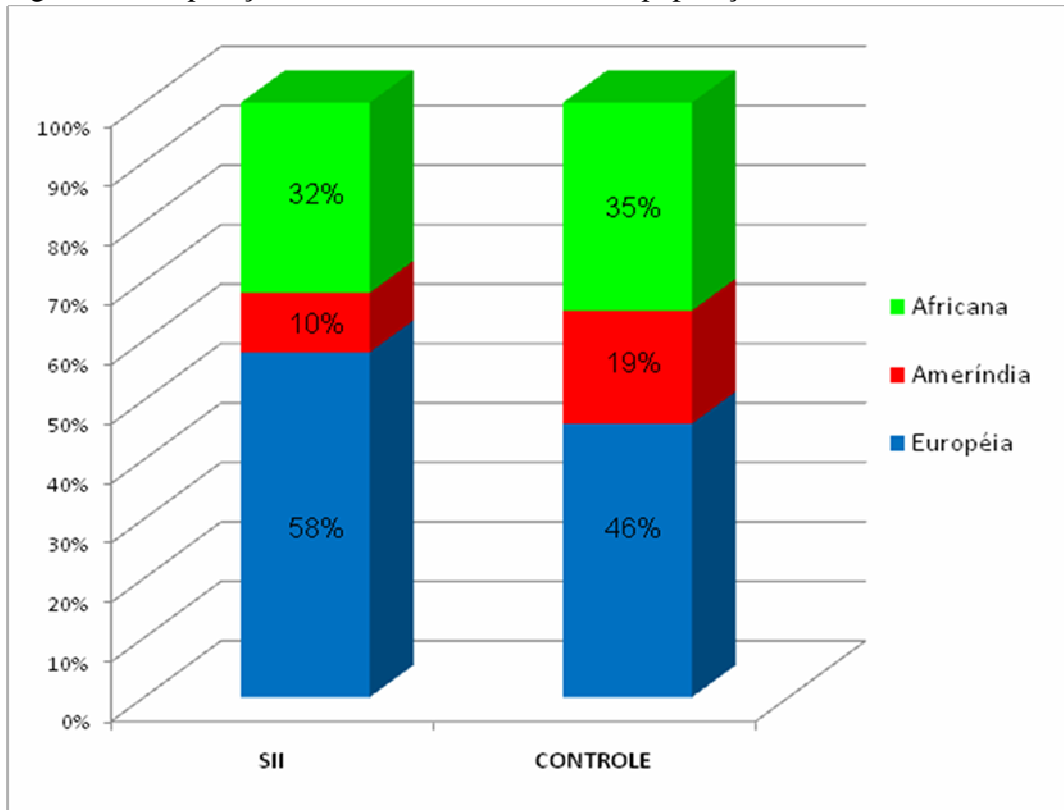
***Caracterização do grupo de pacientes com SII e do grupo controle em relação aos Marcadores Informativos de Ancestralidade (estimativa de mistura)***

A estimativa de mistura para os indivíduos com SII mostrou contribuição europeia de 58%, 32% de contribuição africana, e 10% de contribuição ameríndia. Dados semelhantes foram obtidos na população controle ( $p=0,1158$ ;  $\chi^2$ ), com maior contribuição europeia (46%), seguida da africana (35%) e ameríndia (19%) (Tabela 6; figura 1).

Tabela 6- Proporções de contribuição africana, europeia e ameríndia (estimativa de mistura) no grupo de pacientes com SII e controle

Contribuição	SII-D		SII-C		SII-A	
	M	s.e	m	s.e	M	s.e
Africana	0,3085	0,0014	0,3087	0,0026	0,2999	0,0034
Europeia	0,4997	0,0051	0,6626	0,0095	0,6807	0,0125
Ameríndia	0,1919	0,0043	0,287	0,004	0,0195	0,0106

Figura 1- Comparação da estimativa de mistura da população com SII e controle



As estimativas de mistura populacional nos subgrupos SII-D, SII-C e SII-A estão mostradas na Tabela 7 e na Figura 2. Uma proporção de 50% de contribuição européia, 31% africana, e 19% ameríndia foram observadas na forma SII-D. As formas clínicas SII-C e SII-A foram bem semelhantes quanto às contribuições das populações ancestrais: 66% européia, 31% africana e 3% ameríndia para a SII-C e 68% européia, 30% africana e 2% ameríndia para a SII-A. A estimativa de mistura para as diferentes formas clínicas mostrou que todas apresentam maior contribuição européia, seguida da africana e ameríndia. No entanto, a forma clínica SII-D apresenta menor contribuição européia e maior ameríndia quando comparada às outras formas. Quando comparada as proporções da estimativa de mistura das formas SII-D e SII-C, a diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,01$ ;  $\chi^2$ ), assim como comparando as formas SII-D e SII-A

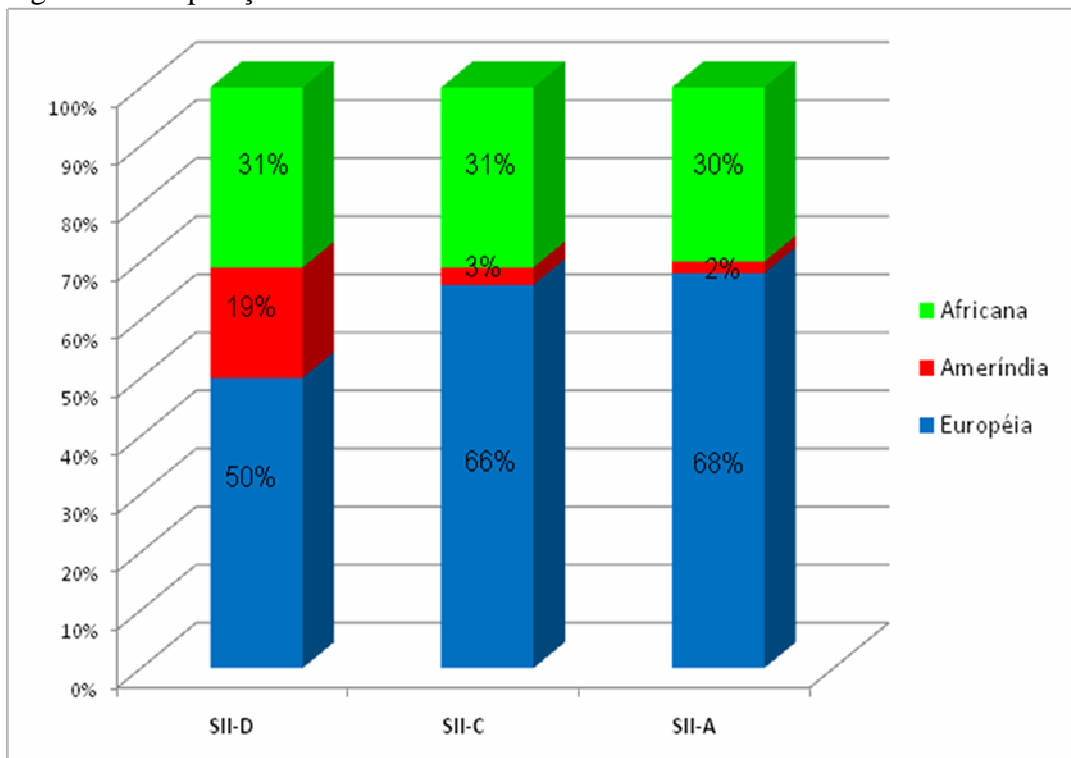


( $p=0,003$ ;  $\chi^2$ ). Mas não houve diferença entre as formas SII-A e SII-C ( $p=0,8842$ ;  $\chi^2$ ) (Tabela 7 e Figura 2).

Tabela 12- Proporções de contribuição africana, europeia e ameríndia (estimativa de mistura) nos grupos das diferentes formas clínicas (SII-D, SII-C, SII-A)

Contribuição	SII-D		SII-C		SII-A	
	M	s.e	m	s.e	M	s.e
Africana	0,3085	0,0014	0,3087	0,0026	0,2999	0,0034
Europeia	0,4997	0,0051	0,6626	0,0095	0,6807	0,0125
Ameríndia	0,1919	0,0043	0,287	0,004	0,0195	0,0106

Figura 3- Comparação da estimativa de mistura entre as três formas clínicas da SII



## DISCUSSÃO

O presente estudo mostra que as frequências fenotípicas dos polimorfismos *TNF*-308 G>A, *IL10* (-1082G>A, -819C>T, -592C>A), *IL6* -174G>C, *IFNG* +874T>A e *TGFBI* (10T>C, 25G>C) no grupo de pacientes ao serem comparadas com as frequências observadas em um grupo de doadores voluntários de sangue (grupo controle) não apresentaram diferenças estatisticamente significantes. Este resultado sugere que não há associação entre estes polimorfismos e a SII.

Dinan e colaboradores (2006) não observaram diferenças significativas entre os níveis séricos das citocinas IL-10 e TNF em pacientes com SII; no entanto, foi observado aumento da IL-6 em todos os subgrupos de pacientes com SII quando comparados com indivíduos controle. Mais recentemente, Liebrechts e colaboradores (2007) mostraram que pacientes com SII apresentaram níveis basais significativamente mais elevados das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF quando comparados com indivíduos controle.

Os dados obtidos no presente trabalho não revelaram diferenças estatisticamente significantes em relação às frequências alélicas, genotípicas e fenotípicas dos polimorfismos nos códons 10 e 25 do *TGFBI*. Estes achados concordam com os descritos previamente na literatura por Gonsalkorale e colaboradores (2003) que também não encontraram associação do *TGFBI* nos códon 10 e códon 25. O TGF- $\beta$  é uma citocina multifuncional com várias ações biológicas e patológicas, produzida por plaquetas, macrófagos, células epiteliais (MAGNAN et al., 1994) e células do músculo liso (PELTON et al., 1991). Esta citocina pode estar associada ao aumento da contração muscular (KITA et al., 1997) e os achados de Akiho e colaboradores (2005.1) sugerem que a persistência dos níveis do TGF- $\beta$ 1 pós-infecção é responsável por manter o estado de hipercontratilidade do músculo liso, o que pode explicar uma possível associação desta citocina no desencadeamento da SII-PI. Um achado semelhante foi mostrado por Gwee e colaboradores (2003), que relataram que a expressão da IL-1  $\beta$  permaneceu elevada durante três meses em indivíduos que desenvolveram SII-PI em comparação aos indivíduos que não desenvolveram SII após a infecção.

Em relação ao polimorfismo no gene *IL10*, os presentes dados corroboram os resultados de van der Veek e colaboradores (2005) que não encontraram diferenças de frequência dos polimorfismos da *IL10* (-1082G>A, -819C>T) no grupo de SII quando comparados a um grupo controle. Por outro lado, Gonsalkorale e colaboradores (2003) observaram diferenças

estatisticamente significantes em relação as frequências dos polimorfismos no gene *IL10* -1082G>A,. Foi encontrado menor frequência dos genótipos de alta produção (-1082 G/G) em indivíduos com SII, e esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,004$ ), divergindo do presente estudo.

Um recente estudo encontrado de polimorfismo em genes de citocinas e SII mostrou diferenças significantes nas frequências do polimorfismo *IL6* -174G>C entre pacientes e controle, sendo oposto aos resultados do presente trabalho em relação a não significância da *IL-6* (BARKHORDARI et al., 2010). Estes mesmos autores não encontraram diferenças quanto ao TNF (-308G>A), corroborando nossos resultados e contrastando com o artigo previamente publicado na literatura(VAN DER VEEK et al., 2005), em que foi observada maior prevalência do genótipo heterozigoto G/A em um grupo de pacientes com SII comparada ao grupo controle.

Nenhum estudo foi encontrado relacionando polimorfismos do *IFNG* e SII. O IFN-  $\gamma$  é uma citocina produzida pelos linfócitos T auxiliares do tipo Th1, pelos linfócitos T citotóxicos e pelas células NK. O papel principal do IFN- $\gamma$  é a ativação de macrófagos (BOEHM et al., 1997; PRAVICA et al., 1999). Foley e colaboradores (2007) sugeriram que esta citocina teria um papel relevante no aumento da motilidade intestinal em pacientes com SII.

O tamanho da amostra de pacientes (55) deste estudo pode ter contribuído para a não observação de diferenças significativas entre as frequências destes polimorfismos nos dois grupos. Os trabalhos publicados na literatura que também estudaram o polimorfismo em genes de citocinas e SII foram realizados com diferentes números de pacientes: 230 (GONSALKORALE et al., 2003); 111 (VAN DER VEEK et al., 2005); 43 (WANG et al., 2006) e 75 (BARKHORDARI et al., 2010). Um dos fatores que contribuíram para o número inferior de pacientes deste estudo foi o uso de rigorosos critérios de seleção da amostra que incluíam, além dos critérios de Roma III, exames laboratoriais e de imagem, além da não inclusão de pacientes com co-morbidades como, por exemplo, outras doenças do trato gastrointestinal e infecção por HIV. Desta forma, é possível concluir que a amostra deste estudo foi mais bem caracterizada com relação à SII. Os parâmetros demográficos da amostra estudada, como idade e gênero, são semelhantes aos observados em outras populações (Mach, 2004; Valenzuela et al., 2004).

Os resultados divergentes encontrados em diferentes trabalhos que estudaram os mesmos polimorfismos podem também, serem atribuídos aos diferentes grupos étnicos estudados, tendo em vista que as diferenças geográficas podem ser associadas às variações étnicas, e estas por sua vez, podem

afetar as frequências dos SNPs (VAN DER VEEK et al., 2005). Recentemente foi sugerida a necessidade de um estudo deste gênero em diferentes grupos étnicos e o uso de um controle com o mesmo perfil étnico dos pacientes (BARKHORDARI et al., 2009).

Este é o único estudo de associação entre polimorfismos genéticos de citocinas e SII cujas amostras dos grupos de pacientes e controle foram caracterizadas quanto a marcadores genéticos informativos de ancestralidade (Quadro I, Tabelas 9 e 10). Os resultados mostram que os pacientes apresentaram maior contribuição européia do que ameríndia ou africana, concordando com dados da literatura, segundo os quais, indivíduos classificados como brancos são mais acometidos pela SII (DONG et al., 2005; WIGINGTON et al., 2005). Quando comparados ao grupo controle, a contribuição africana é semelhante entre os dois grupos, mas mostra diferenças entre a contribuição européia e, principalmente, ameríndia, porém, as diferenças não são estatisticamente significantes ( $p=0,1158$ ;  $\chi^2$ ). Desta forma, é possível afirmar que os dois grupos são semelhantes no que se refere à ancestralidade genômica e que o grupo controle utilizado é adequado para as comparações feitas neste estudo. Por outro lado, a comparação das frequências dos AIMS observadas em uma amostra populacional randômica da população de Salvador (Machado, 2008) e no grupo controle revelou menor contribuição africana neste último, mas a diferença não é estatisticamente significativa ( $p=0,0825$ ;  $\chi^2$ ).

Nenhum dado foi encontrado caracterizando as diferentes formas clínicas da SII quanto à ancestralidade genômica, portanto este também é o primeiro trabalho a fazer este tipo de caracterização. Os resultados preliminares mostram que indivíduos com a forma clínica diarreica apresentam menor contribuição européia e, principalmente, maior contribuição ameríndia em relação às outras formas clínicas (forma constipada e mista). Esta observação provavelmente é verdadeira, pois a frequência dos marcadores específicos da população ameríndia (CKMM e PV92) e que melhor diferenciam ameríndios de europeus e de africanos é maior em pacientes com a forma diarreica quando comparada com as demais. Esta diferença é extremamente significativa para o marcador PV92 ( $p<0,0001$  OR=0,2102 IC95% 0,09409-0,4695). Então, pode ser que indivíduos com maior contribuição ameríndia tenham maior susceptibilidade ao desenvolvimento da forma clínica SII-D do que as demais formas na população estudada. Esta observação não foi publicada na literatura em nenhuma outra população. Os dados de van der Veen e colaboradores (2005) em uma população européia (holandesa) mostra que a forma diarreica foi mais frequente do que as demais formas clínicas e corroboram dois estudos em

população caucasiana que também mostram a forma diarréica como a mais comum (DINAN et al., 2006; LIEBREGTS et al., 2007).

No presente trabalho a forma constipada e mista foram bem semelhantes em relação à estimativa de mistura, apresentando, ambas maiores contribuição européia (Figuras 3). Gonsalkorale e colaboradores (2003) mostram que as formas clínicas diarréicas e mistas (ou alternante) são igualmente frequentes na população inglesa estudada, sendo a forma constipada menos frequente. Mais tarde, Spiller e colaboradores (2007) colaboram com o achado de que a forma constipada (ou obstipada) foi menos frequente na população inglesa estudada e a forma diarréica foi muito mais frequente seguida da forma alternante. Estes dados discordam do estudo realizado em uma população de negros kenianos em que a constipação foi a forma clínica mais comum (LULE & AMAYO, 2002) assim como em uma população asiática (GWEE et al., 2004). Os achados do presente trabalho e a comparação com dados de outros grupos sugerem que além do desenvolvimento da SII, a predominância das diferentes formas clínicas também podem ser influenciadas pelas diferenças étnicas.

A não aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg dos marcadores informativos de ancestralidade GC e RB2300 assim como dos polimorfismos do *IFN* e *IL10* foram gerados por excesso de homozigotos. Isto pode ter sido devido à coleta de uma amostra de conveniência tanto do controle, que foram doadores de sangue, quanto da amostra de pacientes. Outra explicação para o excesso de homozigotos seria o casamento preferencial entre indivíduos de um mesmo grupo étnico direcionando o fluxo gênico para a manutenção desses genótipos na população (AZEVEDO et al., 1986).

## CONCLUSÃO

Os polimorfismos dos genes *IFNG* (+874T>A), *TNF* (-308G>A), *IL6* (-174G>C) *IL10* (-1082G>A, -819C>T e -592C>A) e *TGFBI* (+869 T>C e +915 G>C) não parecem ser marcadores de predisposição ou proteção ao desenvolvimento da SII.

A maior contribuição da ancestralidade européia, analisada por marcadores moleculares informativos de ancestralidade, pode ser um fator de predisposição ao desenvolvimento da SII. Assim como maior contribuição da ancestralidade ameríndia, analisada por marcadores moleculares informativos de ancestralidade, em indivíduos com SII-D em comparação com as

demais formas clínicas, pode ser um fator de predisposição ao desenvolvimento da forma diarréica.

Abordagens genéticas referentes à SII ajuda a definir a patogênese da doença, a ocorrência de diferentes formas clínicas, o perfil étnico dos indivíduos acometidos e a identificação de potenciais marcadores de proteção ou suscetibilidade à doença. Nosso estudo colabora para melhor compreensão da influência de polimorfismos genéticos, em particular em genes de citocinas, para o desenvolvimento da SII. Além de ser o primeiro estudo a associar marcadores genéticos informativos de ancestralidade com o desencadeamento da SII, bem como suas diferentes formas clínicas. Futuros estudos com um número maior de pacientes e controles, de diferentes etnias poderá contribuir para o melhor entendimento dos aspectos étnico-geográficos.