



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

BRUNO LIMA RODRIGUES

**Avaliação e caracterização do estresse do retículo endoplasmático
na mucosa intestinal de pacientes com retocolite ulcerativa**

Campinas
2022

Bruno Lima Rodrigues

Avaliação e caracterização do estresse do retículo endoplasmático na mucosa intestinal de pacientes com retocolite ulcerativa

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

ORIENTADORA: Profa. Raquel Franco Leal

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO
ALUNO Bruno Lima Rodrigues, E ORIENTADA PELA
Profa. Dra. Raquel Franco Leal

CAMPINAS
2022

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

Rodrigues, Bruno Lima, 1989-

R618a Avaliação e caracterização do estresse do retículo endoplasmático na mucosa intestinal de pacientes com retocolite ulcerativa / Bruno Lima Rodrigues. – Campinas, SP : [s.n.], 2022.

Orientador: Raquel Franco Leal.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Retocolite ulcerativa. 2. Estresse do retículo endoplasmático. 3. Autofagia. 4. Apoptose. 5. Inflamação. I. Leal, Raquel Franco, 1977-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation and characterization of endoplasmic reticulum stress in the intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis

Palavras-chave em inglês:

Ulcerative colitis Endoplasmic
reticulum stress Autophagy
Apoptosis Inflammation

Área de concentração: Ciências da Cirurgia

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Raquel Franco Leal [Orientador]
Caroline Marcantonio Ferreira Cristina
Ribeiro de Barros Cardoso Carlos
Augusto Real Martinez
Luiz Roberto Lopes

Data de defesa: 11-01-2022

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5794-2950>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/0625326648880150>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO
BRUNO LIMA RODRIGUES

ORIENTADOR: Profa. Dra. Raquel Franco Leal

MEMBROS TITULARES:

1. PROFA. DRA. RAQUEL FRANCO LEAL

2. PROFA. DRA. CRISTINA RIBEIRO DE BARROS CARDOSO

3. PROF. DR. CARLOS AUGUSTO REAL MARTINEZ

4. PROF. DR. LUIZ ROBERTO LOPES

5. PROF. DRA. CAROLINE MARCANTONIO FERREIRA

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 11/01/2022

PÁGINA DE DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os pacientes com doença inflamatória intestinal do ambulatório do Gastrocentro da Unicamp e do Hospital Clinic, que participaram como voluntários deste estudo.

Dedico também, a todos os pacientes que sofrem desta doença. Espero que este trabalho possa ajudar futuramente em seu manejo clínico.

PÁGINA DE AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meus pais por todo o apoio, amor, carinho, atenção e paciência, não só durante o período deste estudo, mas por toda a vida. Sem dúvidas, não conseguiria alcançar tudo que almejo sem seu suporte e motivação. Eles, que tanto me disseram “podem tirar tudo de você, menos seu conhecimento”, me incentivaram aos estudos desde criança, sempre proporcionando uma vida digna para crescer, acreditando que tudo é possível, desde que sejamos honestos e íntegros de caráter. Vocês fizeram de mim a pessoa que hoje sou, e eu só tenho motivos para agradecer.

À Profa. Raquel Franco Leal, que me deu a honra de ser seu aluno e a confiança de conduzir este estudo. Sua orientação me fez estender meus limites e perceber que posso ser muito mais do que penso ser.

Aos demais estudantes e colaboradores do Laboratório de Investigação em Doenças Inflamatórias Intestinais (LabDII), em especial à Lívia Bittencourt Pascoal, que teve um auxílio fundamental no desenvolvimento desta Tese.

A todos do *Institut d'Investigacions Biomèdiques Augustt Pi i Sunyer* (IDIBAPS) que me acolheram tão bem e fizeram sentir bem-vindo em outro país. Em especial à Profa. Azucena Salas que me recebeu de braços abertos e disposta a me ajudar a ser um pesquisador melhor.

A todos os funcionários e aos residentes do Gastrocentro da Unicamp, que me ajudaram no recrutamento dos pacientes e coleta do material necessário para a pesquisa.

Às agências de fomento que foram indispensáveis na execução deste estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O trabalho também contou com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), sob o processo 2020//04407-1.

Resumo

A retocolite ulcerativa (RCU) é uma das formas mais comuns das doenças inflamatórias intestinais (DII), e é caracterizada por períodos de remissão e atividade da doença, acompanhada de diarreia, dor abdominal, perda de peso e desnutrição. A RCU é uma doença de origem multifatorial que acomete indivíduos geneticamente susceptíveis, nos quais uma resposta imunológica inadequada resulta de complexas interações ambientais, microbianas e do sistema imune inato e adaptativo, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias. Esta superprodução de citocinas prejudica o processamento estrutural proteico, deixando o lúmen do retículo endoplasmático (RE) repleto de proteínas mal formadas. O acúmulo de proteínas mal formadas no RE é chamado de estresse do retículo endoplasmático (ERE). A resposta ao acúmulo de proteínas mal formadas (*unfolded protein response* - UPR), iniciada pela ativação das vias IRE1/Xbp-1, PERK/eIF2 α e ATF6, e foi previamente associada à inflamação intestinal em modelos experimentais, estudos de associação gênômica (GWAS). Além de promover a degradação de proteínas e apoptose, a ativação do ERE também induz a transcrição de genes pró-inflamatórios. Dessa forma, o objetivo desse projeto foi investigar e caracterizar a ocorrência da ativação do ERE em mucosa intestinal de pacientes com RCU. Nossos resultados mostram que, através de técnicas de hibridização in situ e de imunohistoquímica, o ERE está ativado em pacientes com RCU por meio das vias PERK/eIF2 α e IRE1/Xbp-1, mas não via ATF6. A análise transcricional confirmou a ativação de PERK/eIF2 α , bem como o aumento da expressão de genes relacionados a UPR. Também foi observado que os genes pró-apoptóticos e de autofagia (*BAX* e *ATG16L1*, respectivamente), bem como os de citocinas pró-inflamatórias estavam modulados em pacientes com RCU. Além disso, foi observado que o ERE é ativado não apenas nas células epiteliais intestinais, mas também nas células da lâmina própria da mucosa colônica de pacientes com RCU. Como conclusão, tivemos que as vias de ERE e UPR estão ativadas na mucosa do cólon de pacientes com RCU. O aumento dos marcadores de apoptose e autofagia em pacientes com RCU reforçam ainda mais que o ERE está ativado, uma vez que são mecanismos dependentes, ativados para contrabalançar o dano ao tecido. Esses achados fornecem novos paradigmas sobre os mecanismos moleculares que mantêm o processo inflamatório na RCU.

Palavras-chave: Retocolite ulcerativa; Estresse do retículo endoplasmático; Autofagia; Apoptose; Inflamação.

ABSTRACT

Ulcerative colitis (UC) is one of the most common forms of inflammatory bowel disease (IBD), and is characterized by periods of remission and disease activity, accompanied by diarrhea, abdominal pain, weight loss and malnutrition. UC is a disease of multifactorial origin that affects genetically susceptible individuals, in which an inadequate immune response results from complex environmental, microbial and innate and adaptive immune system interactions, leading to the production of pro-inflammatory cytokines. This overproduction of cytokines impairs structural protein processing, leaving the lumen of the endoplasmic reticulum (ER) full of malformed proteins. The accumulation of malformed proteins in the ER is called endoplasmic reticulum stress (ERE). The response to the accumulation of malformed proteins (unfolded protein response - UPR), initiated by the activation of the IRE1/Xbp-1, PERK/eIF2 α and ATF6 pathways, and was previously associated with intestinal inflammation in experimental models, gene association studies (GWAS). In addition to promoting protein degradation and apoptosis, ERE activation also induces transcription of pro-inflammatory genes. Thus, the aim of this project was to investigate and characterize the occurrence of ERE activation in the intestinal mucosa of UC patients. Our results showed that, through in situ hybridization and immunohistochemistry techniques, ERE is activated in UC patients through the PERK/eIF2 α and IRE1/Xbp-1 pathways, but not via ATF6. Transcription analysis confirmed the activation of PERK/eIF2 α , as well as the increased expression of UPR-related genes. We observed that pro-apoptotic and autophagy genes (*BAX* and *ATG16L1*, respectively), as well as pro-inflammatory cytokines were modulated in patients with UC. Furthermore, ERE is activated not only in intestinal epithelial cells, but also in cells of the lamina propria of the colonic mucosa of UC patients. In conclusion, we found that the ERE and UPR pathways are activated in the UC colonic mucosa. Increased markers of apoptosis and autophagy further reinforce that ERE is activated, as they are dependent mechanisms activated to counteract tissue damage in UC. These findings may provide new paradigms on the molecular mechanisms that maintain the inflammatory process in UC.

Keywords: Ulcerative colitis; Endoplasmic reticulum stress; Autophagy; Apoptosis; Inflammation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Formas de acometimento da retocolite ulcerativa.....	17
Figura 2 - Perda da função da barreira da mucosa intestinal e ativação do sistema imunológico.....	21
Figura 3 - Conceitos imunológicos da patogênese da RCU.....	23
Figura 4 - Imagens endoscópicas de RCU e avaliação pelo índice UCEIS e pelo score de Mayo.....	31
Figura 5 - Achados endoscópicos da retocolite ulcerativa.....	34
Figura 6 - Cascata de ativação da do ERE e da UPR.....	48
Figura 7 - Análise transcricional de citocinas pró e antiinflamatórias em pacientes com RCU.....	59
Figura 8 - Ativação da via PERK na mucosa do cólon de pacientes com RCU.....	61
Figura 9 - Ativação da via IRE1 na mucosa do cólon de pacientes com RCU.....	63
Figura 10 - A análise transcricional de ATF6 em pacientes com RCU.....	64
Figura 11 - Ativação de genes responsivos a UPR e modulação de chaperonas.....	66
Figura 12 - Apoptose e autofagia estão modulados em pacientes com RCU.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Escore de Mayo para avaliação da atividade da retocolite ulcerativa.....	32
Tabela 2 – Genes relacionados à ativação do ERE que influenciam a indução e/ou manutenção da colite experimental.	49
Tabela 3 – Dados clínicos e demográficos dos pacientes com retocolite ulcerativa e seus respectivos controles incluídos no estudo.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ASA – mesalazina
ADA – adalimumabe
AGR2 - gradiente anterior 2
APC – células apresentadoras de antígenos
ATF4 – fator de transcrição de ativação 4
ATF6 - fator de transcrição ativador 6
AVD – receptor de vitamina D
BiP - proteína de imunoglobulina de ligação
CCR – câncer colorretal
CD – células dendríticas
CDP870 – certolizumabe pegol
CE - colangite esclerosante
CEI – células epiteliais intestinais
CHOP - C/EBP proteína homóloga
DC – doença de Crohn
DDIT3 – transcrição 3 induzida por dano ao DNA
DII – doenças inflamatórias intestinais
DSS - sulfato de dextrano sódico
eIF2 α - fator de iniciação de tradução eucariótica 2
ERAD – via degradação de proteínas
ERE – estresse do retículo endoplasmático
FADD - proteína de domínio de morte associada ao Fas
FasL – ligante do Fas
FFEP – fixado em formalina embebido em parafina
GALT – tecido linfoide associado ao intestino
GRP78 – proteína regulada por glicose 78-kDa
GWAS – estudo de associação genômica ampla
HLA – antígeno leucocitário humano
ICAM1 – molécula de adesão intracelular 1
IFN – interferon
IFX – infliximabe
IL – interleucina

IRE1 - quinase transmembranar/endonuclease 1 que requer inositol

JAK – quinase Janus

MAdCAM1 – molécula 1 de adesão celular de adressina vascular da mucosa

mRNA – RNA mensageiro

NK – *natural killers*

NOD – oligomerização de nucleotídeos

p-eIF2 α - fator de iniciação de tradução eucariótica 2 fosforilado

P13K – quinase fosositado classe III

PAMP – padrão molecular associado à patógenos

PCR – proteína C reativa

PERK - quinase pancreática RE eIF2 α

PRRs – receptores de reconhecimento padrão

RCU – retocolite ulcerativa

RE – retículo endoplasmático

S1P - protease site-1

S2P - protease site-2

Th – células T *helper*

TLR – receptores *toll-like*

TNF – fatores de necrose tumoral

TRADD - domínio de morte associado ao receptor de fator de necrose tumoral

Treg – células T reguladoras

UCEIS - Índice de Gravidade Endoscópica da Retocolite Ulcerativa

UPR – resposta às proteínas mal formadas

VHS – velocidade de hemossedimentação

XBP1 - proteína de ligação 1 do fator de transcrição X-box

XBP1s – versão *spliced* da proteína de ligação 1 do fator de transcrição X-box

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1 <i>Considerações Gerais</i>	16
1.2 <i>Fisiopatologia</i>	18
1.2.1 Fatores genéticos	18
1.2.2 Barreira da mucosa intestinal	19
1.2.3 Microbioma	21
1.2.4 Fatores imunológicos	22
1.2.4.1 Sistema imunológico inato	23
1.2.4.2 Sistema imunológico adaptativo	24
1.2.5 Fatores ambientais	25
1.2.5.1 Dieta	26
1.2.5.2 Tabagismo	27
1.2.5.3 Apendicectomia	27
1.3 <i>Manifestações clínicas</i>	28
1.4 <i>Classificação da RCU</i>	30
1.5 <i>Diagnóstico da RCU</i>	33
1.5.1 Exame endoscópico	33
1.5.2 Avaliação Histopatológica	35
1.5.3 Avaliação laboratorial	36
1.6 <i>Tratamento da RCU</i>	38
1.6.1 Agentes biológicos	39
1.6.1.1 Terapia com anti-TNF- α	39
1.6.1.2 Terapia com anti-integrinas	41
1.6.2 Terapia com pequenas moléculas	41
1.6.3 Intervenção cirúrgica	42
1.7 <i>Mecanismos moleculares envolvidos na RCU</i>	43
1.7.1 Apoptose	43
1.7.2 Autofagia	44
1.7.3 Estresse do retículo endoplasmático (ERE)	46
1.7.3.1 IRE1	50
1.7.3.2 PERK	51
1.7.3.3 ATF6	52
2. Objetivos	53
2.1 <i>Objetivo geral:</i>	53
2.2 <i>Objetivos específicos:</i>	53
3. Casuística e Metodologia	54
3.1 <i>Casuística</i>	54
3.2 <i>Metodologia</i>	55

3.2.1 Extração de RNA e produção do cDNA	55
3.2.2 PCR quantitativo (qPCR) – Real Time PCR	56
3.2.3 Imunohistoquímica.....	56
3.2.4 Hibridização in situ (ISH)	57
3.3. <i>Análise estatística</i>	57
4. Resultados	58
4.1 <i>Perfil de citocinas pró-inflamatórias na mucosa do cólon de pacientes com RCU</i>	58
4.2 <i>Caracterização das vias de ativação do ERE</i>	60
4.3 <i>Avaliação de chaperonas e genes responsivos à ativação de UPR</i>	64
4.4 <i>Análise transcricional de apoptose e genes relacionados à autofagia em pacientes com RCU</i>	68
5. Discussão	70
6. Conclusão	74
7. Referências bibliográficas.....	75
8. Anexos	98
8.1 <i>Anexo 1 – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp</i>	98
8.2 <i>Anexo 2 – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Clinic</i>	101

1. Introdução

1.1 Considerações Gerais

A retocolite ulcerativa (RCU), juntamente com a doença de Crohn (DC), é uma das principais formas de manifestação das doenças inflamatórias intestinais (DII), uma condição imunomediada de caráter crônico, que afeta o trato gastrointestinal. Diferentemente da DC, o acometimento da RCU se limita à mucosa intestinal do cólon e do reto (Rubin et al., 2019).

As manifestações clínicas da RCU envolvem dor abdominal, diarreia, sangramento retal e consequente anemia, urgência e incontinência para evacuação, além de tenesmo (Rubin et al., 2019). Na fase ativa da doença, além destes sintomas agravarem, alguns pacientes também enfrentam problema psicológico como ansiedade e depressão, levando a diminuição nas interações sociais, o que piora a qualidade de vida (Regueiro et al., 2017). Ademais, quando a RCU se mantém ativa por um período muito longo, há um risco de displasia e câncer colorretal, que se acredita estar relacionado ao processo de inflamação persistente não controlado (Colman and Rubin, 2016; Rubin et al., 2013).

A RCU pode se manifestar em qualquer idade, porém geralmente é iniciada entre os 15 e 30 anos de idade (Cosnes et al., 2011). Entretanto, alguns estudos têm sugerido que cerca de 20% dos casos novos de DII ocorrem em pacientes com mais de 60 anos, com incidência de 4 - 6/100.000 casos novos para DC e 5 - 8/100.000 casos novos para RCU (Ananthakrishnan et al., 2016; Butter et al., 2018).

Devido ao consumo de alimentos industrializados ser considerado um dos fatores de desencadeamento da doença, as DII eram tradicionalmente consideradas uma condição de nações ocidentalizadas, com maior taxa de incidência e prevalência na América do Norte (mais 1,5 milhão de pessoas) e na Europa ocidental (aproximadamente 2 milhões de pessoas) (Burisch et al., 2013). Entretanto, novos estudos epidemiológicos sugerem que a incidência pode estar aumentando rapidamente na América do Sul, Europa Oriental, Ásia e África, devido ao rápido crescimento socioeconômico destas regiões (Ng et al., 2019, 2017; Quaresma et al., 2019). Na América Latina, foi observado, segundo uma revisão sistemática, aumento da prevalência de 15 para 24 novos casos a cada 100.000 pessoas nos últimos 18 anos (Selvaratnam et al., 2019).

No Brasil, apesar de ser considerado um dos países recém industrializados com maior aumento da incidência de DII, não há um sistema integrado de notificação

de diagnóstico de DII, portanto, os dados epidemiológicos são limitados (Zaltman et al., 2021). Entre 1988 a 2012, houve um aumento de 11,1% novos casos de DC e de 14,9% de RCU no Brasil (Ng et al., 2017; Selvaratnam et al., 2019).

Estudo publicado em 2018 relatou que, dentre 22.638 pacientes diagnosticados com DII no estado de São Paulo, 46,16% apresentavam DC e 53,84% apresentavam RCU. Foi observado também que há predominância de acometimento em mulheres, correspondendo a quase 60% dos pacientes totais, sendo 57,9% para DC e 61,3% para RCU (Gasparini et al., 2018).

A RCU apresenta caráter de períodos de recidiva e remissão, e diversos fatores estão presente em sua etiologia. No momento do diagnóstico, aproximadamente 40% dos pacientes apresentam a RCU na forma de proctite, ou seja, apenas na região retal (figura 1A), 30% apresentam na forma de colite de cólon descendente (colite esquerda) (figura 1B) e 30% na forma de pancolite (figura 1C), acometendo todo o cólon (Fumery et al., 2018) (figura 1).

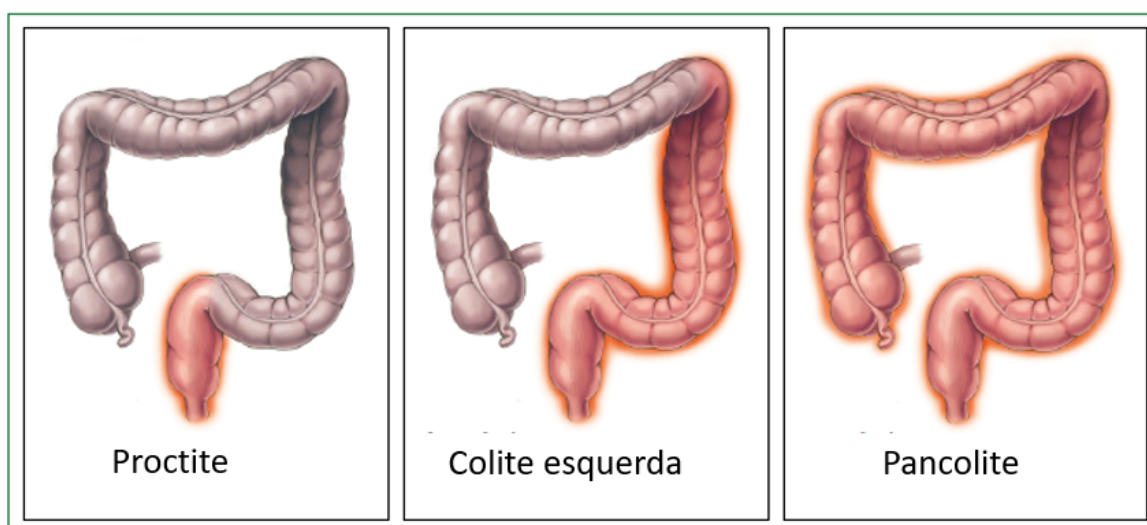


Figura 1 - Formas de acometimento da retocolite ulcerativa. Adaptado de Gajendran et al., 2019 (Gajendran et al., 2019).

A progressão da doença na maioria das vezes segue curso gradual com apenas 14-16% dos pacientes passando de proctite diretamente para pancolite. Em cerca de 10 anos, 50–55% dos pacientes entram em remissão, enquanto aproximadamente 37% seguem curso crônico intermitente, 6% desenvolvem curso

crônico contínuo e apenas 1% tem período de baixa atividade seguido por aumento da gravidade. Geralmente, de 20% a 30% dos pacientes requerem colectomia após 25 anos de atividade da doença (Cosnes, 2008; Fumery et al., 2018).

O acometimento e a gravidade da RCU variam de acordo com a etnia, idade e sexo. Pacientes com diagnóstico mais tardio da doença, normalmente apresentam RCU de cólon esquerdo, moderado, e com menos taxa de progressão. Dentre os pacientes hispânicos, é mais comum a RCU ser iniciada em idades mais avançadas, em mulheres, e se apresentar como pancolite (Charpentier et al., 2014; Stepaniuk et al., 2015).

Foi relatado por Damas e colaboradores que os estadunidenses hispânicos apresentam a doença em grau menos severo do que aqueles que não são norte-americanos (Damas et al., 2013). Em comparação aos pacientes brancos, os afro-americanos apresentam distribuição semelhante de acometimento, que varia de RCU de cólon esquerdo e pancolite, o mesmo tipo de apresentação de pacientes asiáticos (Moore et al., 2012; Nguyen et al., 2006).

1.2 Fisiopatologia

A exata fisiopatologia da RCU ainda não está totalmente elucidada. Contudo, evidências científicas sugerem que, além da etnia e do sexo, também há envolvimento genético e imunológico, e fatores externos, como a dieta e o estilo de vida, que inclui tabagismo e hábitos higiênicos (Kaur and Goggolidou, 2020).

1.2.1 Fatores genéticos

Cerca de 8 a 14% dos pacientes com RCU apresentam histórico familiar, sendo que parentes de primeiro grau de pessoas diagnosticadas com RCU apresentam 4 vezes o risco de desenvolvimento (Du e Ha, 2020; Halme, 2006).

Estudos com gêmeos monozigóticos relataram uma taxa de concordância genética de desenvolvimento de RCU de 10% a 15%, estando presentes o gene *CARD15*, envolvido na resposta imunológica do hospedeiro à invasão de patógenos, e também os genes *ATG16L1*, *LRRK2* e *IRGM*, envolvidos em processos de degradação intracelular, com a autofagia (Brant, 2011).

Estudos de associação genômica ampla (GWAS, de *genome-wide association study*) usando *chips* de polimorfismos de nucleotídeo único sugerem que a base genética da RCU é herdada de forma poligênica (Liu et al., 2015). Foram

identificados mais de 200 loci gênicos associados com DII, sendo 30 para RCU, incluindo o antígeno leucocitário humano (HLA) e genes associados à função de barreira, como *HNF4A* e *CDH1* (Liu et al., 2015). Muitos dos genes putativos identificados estão envolvidos em diferentes aspectos da imunidade intestinal, incluindo a função de barreira da mucosa intestinal (*GNA12*, *HNF4A*, *ERRFI1*), autofagia (*PARK7*, *DAP*), restituição epitelial (*PLA2G2A/E*), e regulação da imunidade adaptativa (*IL2*, *IL21*, *TNFRSF9*, *PIM3*, *IL7R*, *IFNG*) (Khor et al., 2011).

1.2.2 Barreira da mucosa intestinal

A integridade da barreira epitelial é uma peça-chave na comunicação das bactérias comensais com o sistema imunológico. Pacientes com susceptibilidade genética para desenvolver as DII, quando expostos a fatores de risco ambientais, como a dieta, pode induzir uma resposta imune que prejudica a barreira epitelial, iniciando assim, a doença (Silva et al., 2016).

No lúmen intestinal, a primeira barreira de defesa é a camada de mucina, que cobre a camada epitelial. A mucina é formada pela polimerização em gel de muco secretado pelas células de Goblet (Geremia et al., 2014). Sua falta representa uma barreira com fácil permeabilidade, facilitando a interação de bactérias com as células epiteliais na mucosa (Tatiya-aphiradee et al., 2018).

A barreira epitelial, composta por células epiteliais intestinais (CEI) especializadas, como as células de Goblet e células de Paneth, é considerada a segunda linha de defesa da mucosa intestinal. As CEI estão dispostas em junções estreitas (*tight junctions*), e são responsáveis pela produção de mucinas e defensinas, além de citocinas e quimionas. Elas expressam receptores *toll-like* (TLR) e receptores de domínio de oligomerização de nucleotídeos (NOD), ambos ativadores do sistema imunológico (Hisamatsu et al., 2013; Silva et al., 2016).

Quando há quebra da barreira epitelial, ocorre aumento da permeabilidade, o que resulta em desregulação das *tight junction*, levando ao aumento na captação de antígeno luminal que altera as respostas imunes inatas e adquiridas do hospedeiro (Tatiya-aphiradee et al., 2018). Quando há invasão do conteúdo luminal (micróbios) na *lamina propria*, é iniciada a resposta imunológica inata através da ativação de macrófagos e células dendríticas. A sinalização feita pelos TLR ativa a via do fator de transcrição nuclear (NF)- κ B, estimulando assim, a transcrição de genes pró-

inflamatórios, em especial do fator de necrose tumoral (TNF)- α , e das interleucinas (IL)-1 β , IL-6, IL-12 e IL-13 (Abraham et al., 2017).

Ao captar o antígeno, as células apresentadoras de antígenos (macrófagos e células dendríticas), o apresentam para as células T CD4 *naïve* (células Th0), iniciando assim, a diferenciação em células T *helper* (Th)-2 por meio da ativação de IL-4. Estas células, juntamente com as células *natural killers* (NK), produzem IL-13 e IL-5, que promovem o rompimento da barreira epitelial, aumentando ainda mais a permeabilidade e absorção de produtos bacterianos, e recrutamento e ativação de eosinófilos, respectivamente (Danese and Fiocchi, 2011; Tatiya-aphiradee et al., 2018).

Células T circulantes se ligam às células endoteliais da mucosa através da molécula 1 de adesão celular de addressina vascular da mucosa (MAdCAM-1), induzindo assim, um processo inflamatório e aumentando o recrutamento de células T na *lamina propria*. Quimiocinas, como o CXCL1, CXCL3, CXCL8 e CXCL10, promovem o recrutamento de linfócitos circulantes, perpetuando o ciclo inflamatório (Abraham et al., 2017; Tatiya-aphiradee et al., 2018).

A figura 2 esquematiza o processo de rompimento da barreira da mucosa e a subsequente resposta inflamatória.

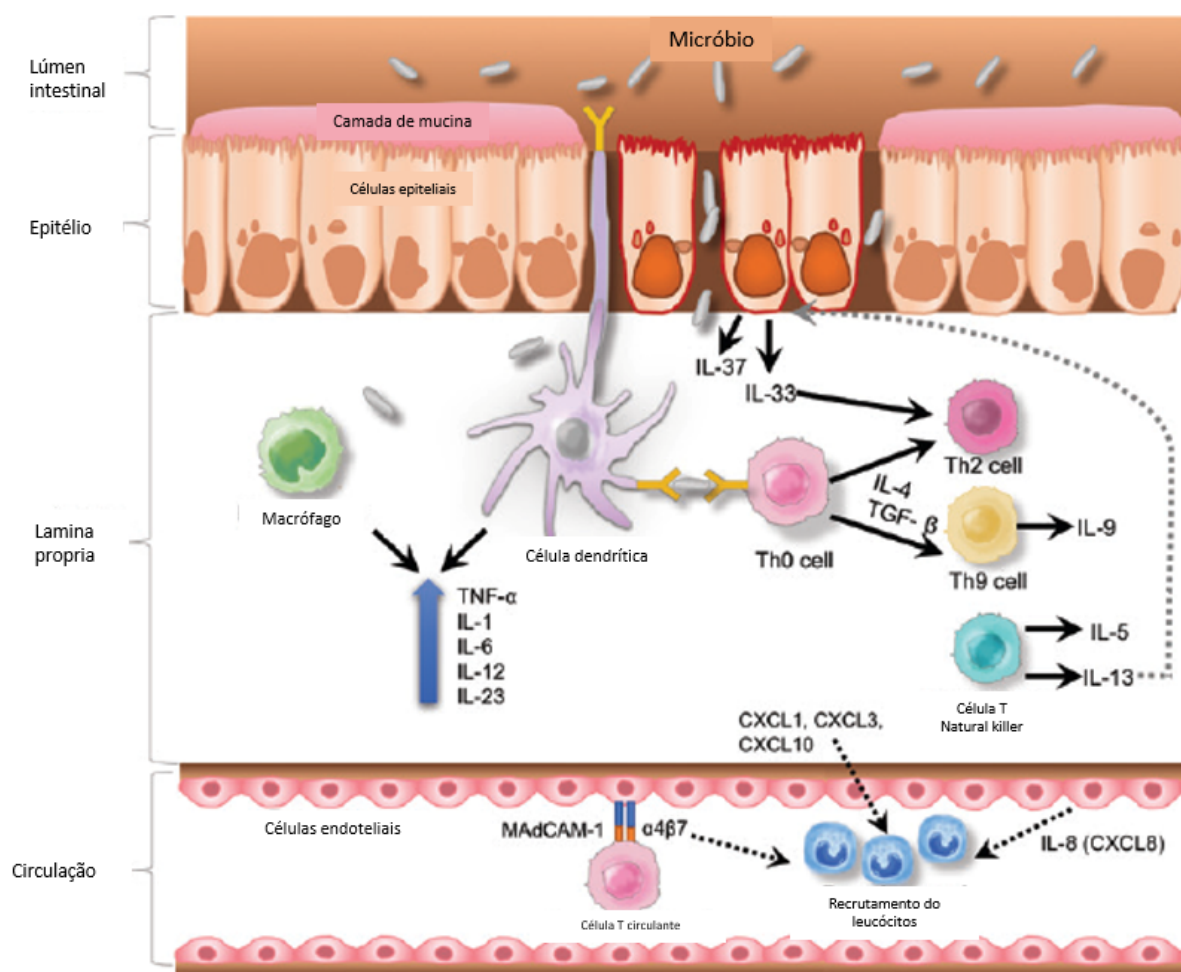


Figura 2 – Perda da função da barreira da mucosa intestinal e ativação do sistema imunológico. Adaptado de Tatiya-aphiradee *et al.*, 2018 (Tatiya-aphiradee *et al.*, 2018).

1.2.3 Microbioma

A microbiota intestinal representa a maior reserva de micróbios dentro do corpo humano, com mais de 35.000 tipos de bactérias (Dave *et al.*, 2012) que apresentam papéis fundamentais para o hospedeiro, como maturação e modulação do sistema imunológico, maturação intestinal e regulação da fisiologia da mucosa, produção de ácidos graxos de cadeia curta e vitaminas (Duranti *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, avanços significativos utilizando técnica de sequenciamento de DNA e outras tecnologias, forneceram caminhos para melhor caracterizar o microbioma intestinal, levando à descoberta de que sua composição em pacientes com RCU é diferente de pacientes não afetados (Frank *et al.*, 2007). Na RCU, ocorrem alterações na composição da microbiota intestinal, denominada

disbiose microbiana, com redução na diversidade bacteriana com menores proporções de Firmicutes (*Faecalibacterium*, *Oscillibacter*, *Agathobacter*, *Ruminococcus*) e Bacteroides (*Alistipes* e *Barnesiella*), e redução específica de microorganismos antiinflamatórios, como *Bifidobacterium adolescentis* e *Faecalibacterium prausnitzii* (Kedia et al., 2021; Takahashi et al., 2016).

Por outro lado, um aumento de *Enterobacteriaceae*, incluindo *Escherichia coli* e *Fusobacterium* foram relatados em pacientes com DII (Kotlowski et al., 2007; Liguori et al., 2016; Moustafa, n.d.; Tahara et al., 2015). Cepas aderentes e invasivas de *E. coli* foram identificadas e encontram-se em grande número em pacientes com RCU (Darfeuille-Michaud et al., 2004; Sokol et al., 2006).

O micro-organismo da espécie de *Fusobacterium*, que é associado a uma capacidade de induzir, em modelos animais, erosões na mucosa colônica (Ohkusa, 2003), foi encontrado em abundância em amostras de mucosa de cólon de pacientes com RCU comparado a controles (Ohkusa et al., 2002). Além disso, foi relatado, também em modelo animal, que bactérias desta espécie possuem potencial tumorigênico, levantando o questionando se ela seria um dos laços entre as DII e o desenvolvimento de câncer colorretal (Kostic et al., 2014, 2013).

1.2.4 Fatores imunológicos

A resposta imunológica tem papel importante no desencadeamento e na manutenção da RCU. A disfunção da barreira da mucosa leva a perda de tolerância imunológica, promovendo um aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios, que, por sua vez, estimulam a proliferação de moléculas antígeno-específicas para ativar o sistema imunológico, levando assim, à inflamação sistêmica (Tatiya-aphiradee et al., 2018) (figura 3).

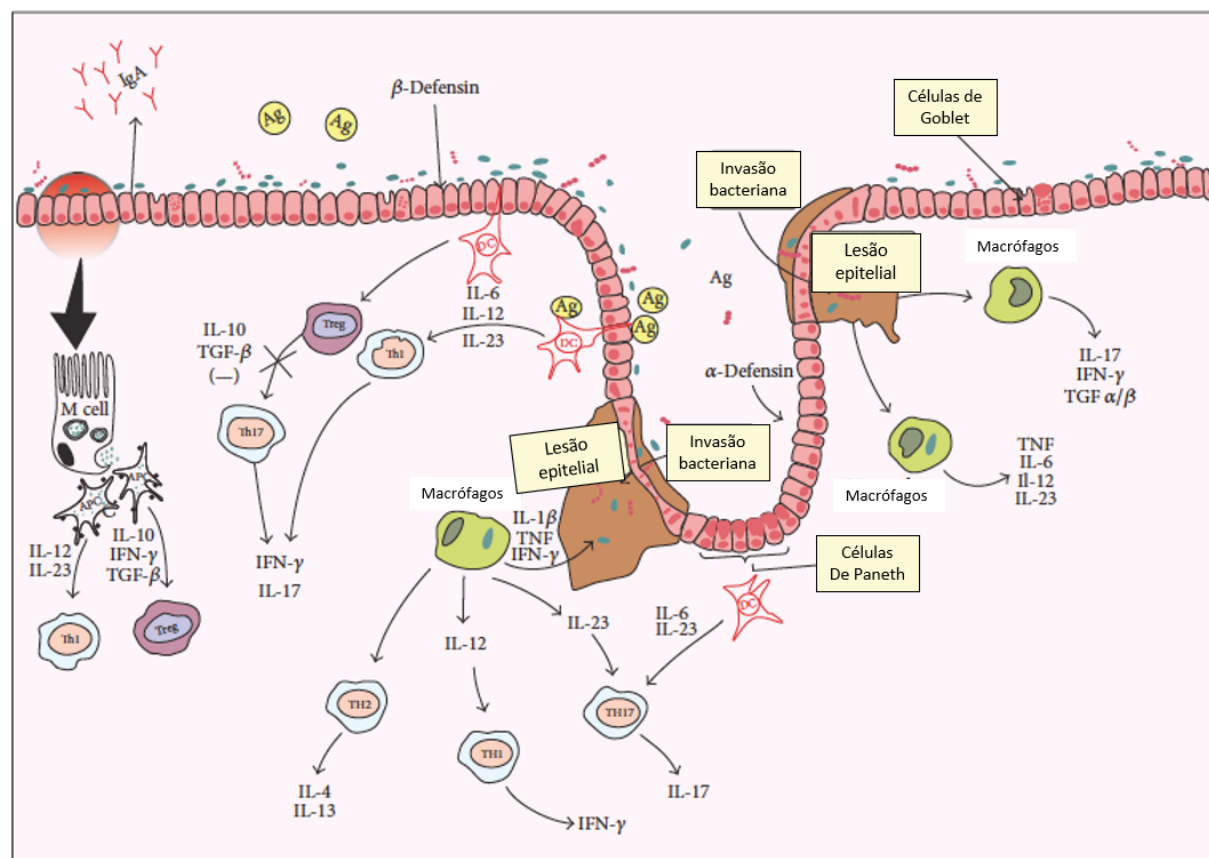


Figura 3 - Conceitos imunológicos da patogênese da retocolite ulcerativa. Adaptado de Silva *et al.*, 2016 (Silva *et al.*, 2016).

1.2.4.1 Sistema imunológico inato

O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa do organismo. Sua resposta é iniciada minutos após a invasão microbiana, e pode durar por algumas horas. Nas regiões afetadas, há presença de células apresentadoras de antígenos (APC, de *antigen presenting cells*) macrófagos e células dendríticas ativadas (Silva *et al.*, 2016).

Os macrófagos são células fagocíticas com a principal função de eliminar antígenos utilizando proteases e radicais livres. Estão presentes na mucosa de todo o trato gastrointestinal, sendo mais abundante na *lamina propria*, em especial quando há início de processo inflamatório devido a presença de antígenos (Flannigan *et al.*, 2015). Há, na membrana dos macrófagos, complexo de histocompatibilidade, responsável por reconhecer antígenos específicos associados à patógenos e apresenta-los às células T. Durante a fase ativa das DII, o número de macrófagos aumenta drasticamente e passam a expressar moléculas coestimuladoras de células T, como CD40, CD80 e CD86, presentes na inflamação (Silva *et al.*, 2016).

Algumas moléculas promovem a ativação dos macrófagos, como o padrão molecular associados aos patógenos (PAMP), via TLR, que levam ao aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, e IL-23, além das quimionas CXCL9 e CXCL10 (Kmieć et al., 2017). Além disso, os macrófagos também secretam espécies e metabólicos reativos de oxigênio e nitrogênio, bem como proteases que degradam matriz extracelular (Tatiya-aphiradee et al., 2018).

As células dendríticas (CD) são células especializadas do sistema imunológico e atuam na mucosa intestinal endocitando antígenos. Nas DII, embora as CD estejam ativadas em pequena quantidade, elas apresentam diversos receptores microbianos, levando ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e a IL-12 (Hart et al., 2005; Tatiya-aphiradee et al., 2018).

As CD ativadas se localizam próximo à barreira epitelial e transportam o antígeno para tecido linfóide associado ao intestino (GALT), onde as células T são ativadas (Silva et al., 2016; Tatiya-aphiradee et al., 2018). As CD têm receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) como receptores imunes inatos, incluindo TLRs que respondem a macromoléculas comuns e receptores semelhantes a NOD, que, por sua vez, respondem a patógenos intracelulares e/ou extracelulares (Kmieć et al., 2017). Devido aos TLRs, as CD também são capazes de reconhecer estruturas moleculares de bactérias, os lipossacarídeos, liberando assim, IL-12, responsável por induzir a diferenciação de células T *naïve* em células Th-1 (Tatiya-aphiradee et al., 2018).

1.2.4.2 Sistema imunológico adaptativo

A patogênese da RCU tem sido atribuída à resposta do sistema imunológico adaptativo, que é iniciado com a ativação das células T pelo sistema inato (Tatiya-aphiradee et al., 2018).

Células T ativadas podem se diferenciar em células efectoras (Th) e reguladoras (Treg) (Kmieć et al., 2017). As células Th atuam como auxiliares ou indutoras da resposta imune. Essas células são subdivididas e diferenciadas com base em seus perfis de citocinas, em células Th1, Th2, Th17. Cada um desses subtipos tem funções imunológicas distintas e relevantes. Por exemplo, células do tipo Th1, auxiliam na eliminação do agente patogênico presente nas células APC; as células do tipo Th2 ajudam no controle de reações alérgicas e protegem o corpo de

parasitas; células do tipo Th17 são responsáveis pela sinalização que resulta na remoção de bactérias extracelulares e fungos. As células T regulatórias (T regs) promovem a reparação dos tecidos. No entanto, alterações na proliferação de células T e seus subconjuntos podem levar a um aumento excessivo de quimiocinas e citocinas, levando ao agravamento ou manutenção do processo inflamatório da mucosa (Silva et al., 2016; Tatiya-aphiradee et al., 2018).

A diferenciação da célula T nos diversos subtipos é dependente de estímulo de citocinas específicas. Em contato com interferon (IFN)- γ , ocorre a diferenciação em células do tipo Th1, tipo celular responsável pela produção de diversas citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α e o próprio IFN- γ (Huang and Chen, n.d.). A IL-4, secretada pelas APCs, se ligam a receptores específicos nas células Th, ativando a via de sinalização STAT-6, e promovendo, assim, a diferenciação no tipo Th2 (Huang and Chen, n.d.). Células do tipo Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, responsáveis pela diferenciação e ativação de linfócitos B (Silva et al., 2016).

As células Th1 e Th2 mantêm seu próprio equilíbrio ao secretar citocinas agonistas ou antagonistas que ativam ou inativam uma à outra: o IFN- γ produzido pela Th1 inibe a proliferação de Th2, enquanto que a IL-4, IL-10 e IL-13, produzidas pela Th2, inibem a proliferação de Th1. Sendo assim, a alteração na proporção Th1/Th2 está diretamente associada à patogênese de diversas doenças autoimunes ou imunomediadas, como a RCU (Kanai et al., 2006).

A IL-33, uma das citocinas que promovem a patogênese de doenças relacionadas a alterações da Th2, foi encontrada em pacientes com RCU na fase ativa e também naqueles que estavam em remissão (Seidelin et al., 2010). Ademais, a expressão de mRNA da IL-33 foi encontrada significativamente aumentada na mucosa de pacientes com RCU na fase ativa em comparação com controles saudáveis. Este achado foi observado nas células da cripta epitelial de pacientes com RCU aguda em comparação com o nível indetectável de controles saudáveis, sugerindo que este tipo de avaliação possa se tornar um marcador de diagnóstico e monitoramento da RCU (Gundersen et al., 2016).

1.2.5 Fatores ambientais

Certos fatores ambientais, como estilo de vida, dieta, tabagismo e os hábitos higiênicos, estão fortemente correlacionados com as DII (Du e Ha, 2020).

Um estudo multicêntrico recém-publicado relatou diversos fatores de risco relacionados com o desenvolvimento e manutenção da DC e da RCU na população brasileira (Salgado et al., 2020). Indivíduos que possuíam nível educacional mais elevado, bem como aqueles com baixa renda familiar mensal (até 3 salários-mínimos) apresentaram maior risco de desenvolver DII. Além disso, baixo número de coabitantes na residência na idade adulta, residentes em área urbana e ausência de doenças infecciosas na infância foram correlacionados com o desenvolvimento de ambas as DII. O consumo de água tratada durante as duas fases da vida foi associado à DC, mas não à pacientes com RCU (Salgado et al., 2020).

1.2.5.1 Dieta

Há diversos estudos na literatura que correlacionam os diversos tipos de dieta com a RCU. Entretanto, não há consenso acerca do tipo de alimento ideal para prevenção ou tratamento da RCU (Du e Ha, 2020).

O consumo excessivo de gordura, em especial as trans-insaturadas e ácidos graxos n-6 (ômega 6), foi associado com o desenvolvimento da RCU, enquanto que o consumo de ácidos graxos n-3 (ômega 3) foi associado com menor probabilidade de desenvolvimento (Ananthakrishnan et al., 2016; Hassanshahi and Masoumi, n.d.).

Embora as fibras passem pelo intestino delgado sem serem digeridas, a maioria é fermentada no cólon por enzimas bacterianas, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, que podem ser usados como fontes de energia e carbono pela mucosa colônica. Fez-se a hipótese que fibras específicas reduzem a aderência e translocação bacteriana, aumentando assim o risco de alterações inflamatórias (Desai et al., 2016; Gill et al., 2018). Embora haja estudos sugerindo que maior ingestão de fibra reduza a risco de DC (Brotherton et al., 2016), não foram encontrados resultados semelhantes consistentes com a RCU.

A amamentação de recém-nascidos tem papel protetor nas DII por manter a integridade da barreira epitelial, prevenir infecções e fornecer benefícios imunológicos diretos (Parigi et al., 2015; Rogier et al., n.d.). Um estudo de revisão sistemática e meta-análise publicado em 2017 com 35 artigos incluídos, relatou uma relação positiva entre amamentação e um menor risco de desenvolvimento de DII (L. Xu et al., 2017).

Também há estudos experimentais que relatam o agravamento da colite induzida com o aumento do consumo de carne vermelha (Le Leu et al., 2013). Uma revisão sistemática que incluiu mais de 2.600 pacientes com DII (1.269 com DC e 1.340 com RCU) relatou que o aumento de ingestão de carne vermelha, bem como ácidos graxo insaturados e ômega-6, está associado com o aumento do risco de desenvolver RCU, enquanto o alto consumo de vegetais foi associado com um menor risco (Hou et al., 2011).

1.2.5.2 Tabagismo

O papel do tabagismo na inflamação intestinal tem sido amplamente estudado devido aos efeitos contraditórios observados em pacientes com DII: embora o tabagismo aumente o risco de DC, é atualmente o fator epidemiológico mais associado a uma menor incidência de RCU. Além disso, as taxas de recidiva e hospitalização também são menores em pacientes com RCU fumantes (Cosnes, 2008).

A nicotina tem sido usada como agente terapêutico em pacientes com RCU através de goma de mascar, adesivos transdérmicos e enemas à base de nicotina (Ingram et al., 2005; Lunney and Leong, 2012). Estes estudos indicaram que mascar chiclete de nicotina resulta em níveis máximos de nicotina no sangue, semelhantes aos observados durante o fumo (Lashner et al., 1990). Além disso, um ensaio clínico com pacientes com RCU comparando o uso de adesivos transdérmicos de nicotina com adesivos de placebo sugeriu que o uso direto de nicotina é mais eficaz no controle de manifestações da RCU leve a moderada (Sandborn et al., 1997),

O efeito protetor, entretanto, é controverso, uma vez que o risco relativo de desenvolver a doença aumenta após a cessação do tabagismo, em comparação com pacientes que nunca fumaram (Higuchi et al., 2012).

1.2.5.3 Apendicectomia

A apendicectomia também exerce, aparentemente, um papel protetor à RCU. Uma das hipóteses leva em consideração de que mais de 75% dos pacientes com RCU apresentam inflamação no apêndice. Isso levou à hipótese de que a apendicectomia em RCU estabelecida pode afetar positivamente o curso da doença. Em um estudo com uma coorte de 212.936 pacientes submetidos à apendicectomia antes dos 50 anos, a incidência de RCU foi menor entre os pacientes com histórico

de apendicite em comparação com aqueles que foram submetidos à cirurgia para dor abdominal inespecífica (Andersson and Ekbom, 2001). Além disso, um estudo de meta-análise que incluiu 2.770 pacientes com RCU, relatou que a apendicectomia diminuiu em quase 70% o risco de desenvolvimento de RCU (Koutroubakis, 2000).

No entanto, o exato mecanismo protetor da apendicectomia e o seu impacto a longo prazo na RCU ainda é incerto. Entretanto, alguns estudos estão correlacionando o aumento da taxa de câncer colorretal em pacientes com RCU submetidos à apendicectomia (Harnoy et al., 2016; Parian et al., 2017).

1.3 Manifestações clínicas

O quadro clínico comum da RCU inclui dor abdominal, diarreia com ou sem sangue e muco, tenesmo e urgência de evacuação (Gajendran et al., 2019). Os sintomas são iniciados de forma gradual, seguindo períodos de remissão espontânea e recidivas subsequentes, podendo se tornar mais frequentes e ocasionalmente tão graves que requerem hospitalização. A fase ativa se manifesta como inflamação da mucosa, começando no reto (proctite) e, em muitos casos, se espalhando para o resto do cólon (Danese and Fiocchi, 2011).

A perda de peso é um sintoma importante a ser considerado, principalmente no momento do diagnóstico. Em 2015, Ford e colaboradores relataram que, se um paciente apresenta anemia, mais de 4 evacuações ao dia e perda de mais de 5 quilos no último ano, há uma taxa de probabilidade de 14,6 de ser RCU, enquanto que apresentar apenas anemia e mais de 4 evacuações ao dia, a taxa de probabilidade de ser RCU diminui para 7,87 (Ford et al., 2015).

Os pacientes apresentam diversas alterações laboratoriais, como anemia por deficiência de ferro, trombocitose, hipoalbuminemia e anticorpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA) (Conrad et al., 2014).

A RCU pode ser associada a outras condições gastrointestinais. Alguns estudos já sugeriram uma associação com gastrite focal ou causada por *Helicobacter pylori* (Magalhães-Costa et al., 2014). Além disso, uma complicação grave da RCU é o megacólon tóxico, no qual o processo inflamatório local pode ser grave o suficiente para interromper a função neuromuscular do cólon levando à sua dilatação e subsequente perfuração (Autenrieth and Baumgart, 2012).

Pacientes com DII apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de câncer colorretal (CCR). Entre os pacientes com RCU, o risco de CCR é de 2%,

porém este percentual aumenta com o passar do tempo, podendo chegar a 18% após 30 anos de doença (Eaden et al., 2001). Há vários fatores de risco identificados para o desenvolvimento de CCR em pacientes com DII, como a atividade histológica, e extensão e duração da doença (Guagnozzi, 2012). Outros fatores de risco incluem história familiar de CCR, presença de colangite esclerosante concomitante, presença de estenoses colônicas, cólon encurtado devido a inflamação de longa data e pseudopolipose (Laine et al., 2015).

A RCU não afeta exclusivamente o intestino, podendo apresentar diversas manifestações extra intestinais (Gajendran et al., 2019). Devido à variedade de sistemas do organismo afetados por essas manifestações, acredita-se que esta associação (RCU e o envolvimento extra intestinal) tenha influência genética, ambiental e imunológica, uma vez que mais de um sistema pode ser afetado de uma vez (Karmiris et al., 2016).

O envolvimento reumatológico é o sintoma extra intestinal mais comum observados em pacientes com DII, sendo a espondiloartrite a condição mais comumente relatada (Malaty et al., 2017).

Manifestações dermatológicas também são recorrentes na RCU, sendo o eritema nodoso e o pioderma gangrenoso os mais sintomas mais comuns (Timani and Mutasim, 2008). Ademais, a presença de melanoma também foi relatado em alta frequência em pacientes com RCU (Singh et al., 2014a)

As manifestações oculares, incluindo uveíte ou episclerite, podem se desenvolver antes do início ou com o início da doença. Histórico familiar de RCU pode ser um fator de risco para o envolvimento ocular. Além disso, os sintomas oculares foram correlacionados com a presença de outros sintomas extra intestinais (Taleban et al., 2016).

O sistema pancreático e hepatobiliar também pode estar envolvido na RCU. Há relatos na literatura de uma associação entre pancreatite, seja aguda ou crônica, e RCU. Entretanto, não se sabe ao certo se a pancreatite é uma complicação da RCU, ou se é um risco para desenvolvê-la (Chen et al., 2017; Park et al., 2013). Há também, embora conflitante, uma associação entre RCU e colangite esclerosante (CE). Uma revisão sistemática relatou a prevalência de CE e colelitíase entre pacientes com RCU com taxas que variam entre 0,76% – 5,4% e 4,6% – 36,4%, respectivamente (Gizard et al., 2014). Entretanto, um estudo com 634 pacientes com DII, sendo 429 com DC e 205 com RCU, associou apenas a DC a um alto risco de desenvolver coledocolitíase

(Parente et al., 2007). Ademais, em um estudo transversal publicado recentemente por Halling e colaboradores, foi observado uma maior incidência de hepatite autoimune, colangite biliar primária e gastrite atrófica entre os pacientes com RCU quando comparados ao pacientes controle (Halling et al., 2017).

Complicações vasculares também ocorrem nas DII. Os pacientes com RCU têm um risco maior de eventos tromboembólicos venosos (trombose venosa profunda e embolia pulmonar, por exemplo), bem como doença tromboembólica arterial, como acidente vascular cerebral (Giannotta et al., 2015; Singh et al., 2014b).

Também há envolvimento com a RCU, embora menos frequente, condições renais, como insuficiência renal e nefrolitíase (Ganji-Arjenaki et al., 2017; Oikonomou et al., 2011), e condições pulmonares, como vasculite pulmonar (Ji et al., 2016).

1.4 Classificação da RCU

A avaliação da extensão e da gravidade da RCU é de extrema importância para eleger a abordagem terapêutica mais adequada. A extensão da doença normalmente é caracterizada de acordo com a classificação Montreal, que é caracterizada por: (E1) proctite; (E2) colite de cólon esquerdo; (E3) colite extensa (pancolite) (Satsangi, 2006).

Inicialmente, a gravidade da RCU era avaliada de acordo com a classificação de Truelove e Witts, publicada em 1955 (Truelove and Witts, 1955). Esta classificação define colite moderada quando há menos de 4 evacuações ao dia, ausência de febre e frequência cardíaca normal, dosagem de hemoglobina abaixo de 11 g/dL e velocidade de hemossedimentação (VHS) abaixo de 20 mm/hora. A RCU de grau grave é definida, segundo esta classificação, por mais de 6 evacuações ao dia, presença de febre, taquicardia, anemia e aumento do VHS. Entretanto, apesar de ser uma classificação simples e útil para definir a necessidade de hospitalização, este índice exclui manifestações extra intestinais e não avalia atividade endoscópica (Rubin et al., 2019). Por isso, outros índices que incluem a avaliação endoscópica foram propostos, sendo o Índice de Gravidade Endoscópica de Colite (UCEIS) e o escore de Mayo, os mais utilizados (Rodrigues et al., 2020)

O escore de Mayo, criado por Schroeder e colaboradores em 1987 (Schroeder et al., 1987), avalia a RCU em seus aspectos clínicos, como frequência de evacuações e sangramento retal, e aspectos endoscópicos, como presença de eritema, perda do padrão vascular, friabilidade e ulcerações (figura 4 e tabela 1).

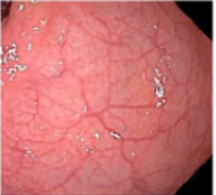
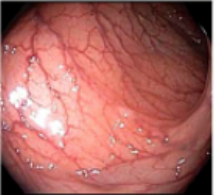
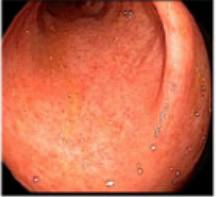
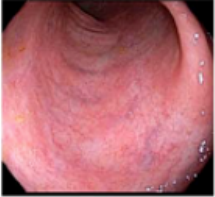
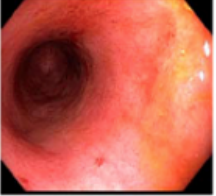
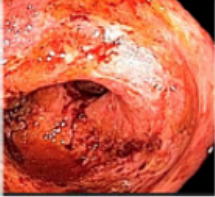
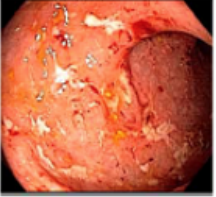
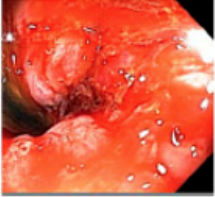
			Escore UCEIS	Escore Mayo	Achados endoscópicos
			0	0	Normal
			1-3	1	Eritema, diminuição do padrão vascular, friabilidade média
			4-6	2	Eritema marcado, ausência do padrão vascular, friabilidade, erosões
			7-8	3	Sangramento espontâneo, ulceração

Figura 4 - Imagens endoscópicas de RCU e avaliação pelo índice UCEIS e pelo escore de Mayo. Adaptado de Rubin *et al.*, 2019 (Rubin *et al.*, 2019).

Tabela 1 – Escore de Mayo para avaliação da atividade da retocolite ulcerativa

Parâmetro	Pontuação
Frequência de evacuações	0 = normal
	1 = 1 a 2 vezes além do normal
	2 = 3 a 4 vezes além do normal
	3 = 5 ou mais vezes além do normal
Sangue nas fezes	0 = sem sangue visível
	1 = sangue nas fezes em igual ou mais que metade das vezes
	3 = sangramento não acompanhado de fezes
Achados endoscópicos	0 = normal ou doença inativa
	1 = eritema leve, diminuição de padrão vascular e moderada friabilidade
	2 = eritema grave, perda do padrão vascular, friabilidade e erosões
	3 = sangramento espontâneo e erosões
Avaliação médica	0 = normal
	1 = doença leve
	2 = doença moderada
	3 = doença grave

O escore de Mayo já foi relacionado à atividade da doença por diversos estudos. Lewis e colaboradores reportaram, em um estudo com 105 pacientes, que o escore total e parcial de Mayo se correlacionaram com RCU de moderada a grave. Além disso, a pontuação apresentou um grau máximo de sensibilidade e especificidade (88% e 78%, respectivamente) para identificar a remissão com um ponto de corte de 4,5 (Lewis et al., 2008).

Ademais, o escore de Mayo também foi associado a um menor risco de colectomia em pacientes com RCU que fazem uso de terapia anti-TNF- α . Os estudos *Active Ulcerative Trial* (ACT)-1 e -2, reportaram que os pacientes, ao fazer uso da

terapia, apresentaram cicatrização da mucosa, pontuando 0 - 1 no escore. Isto foi correlacionado com menor risco de colectomia por até 50 semanas de seguimento clínico no estudo (Colombel et al., 2011).

1.5 Diagnóstico da RCU

O diagnóstico da RCU se baseia em uma combinação da avaliação clínica, achados endoscópicos e histológicos, e exclusão de diagnósticos alternativos. Além disso, exames sorológicos e fecais dão suporte no monitoramento da doença e no acompanhamento do tratamento. Em alguns casos, diferenciar RCU de DC pode representar um desafio clínico (Gajendran et al., 2019).

A descoberta de biomarcadores aumentou significativamente a melhora no diagnóstico e no acompanhamento do tratamento da RCU. Os biomarcadores, além de auxiliar na diferenciação entre DC e RCU, também são relevantes para determinar a atividade da doença e prever a resposta à terapia. Vários potenciais biomarcadores genéticos, sorológicos, fecais, microbianos e imunológicos foram propostos para a RCU (Iskandar and Ciorba, 2012; Rogler and Biedermann, 2015).

1.5.1 Exame endoscópico

O exame de colonoscopia é considerado o padrão ouro para o diagnóstico da RCU (figura 5). Na fase inicial da doença, observa-se uma mucosa inflamada, granular e eritematosa, com friabilidade e perda do padrão vascular. Na fase moderada, é possível observar erosões e microulcerações, enquanto que na fase mais grave, há ulcerações mais profundas e possível sangramento espontâneo (Corte et al., 2015). Em pacientes com repetitivos ciclos de recidiva e remissão, e naqueles com inflamação crônica persistente, pode-se observar presença de pseudopólipos ou ponte mucosa, que é caracterizada pela ponte de duas partes do lúmen por regeneração do tecido da mucosa (Danese and Fiocchi, 2011).

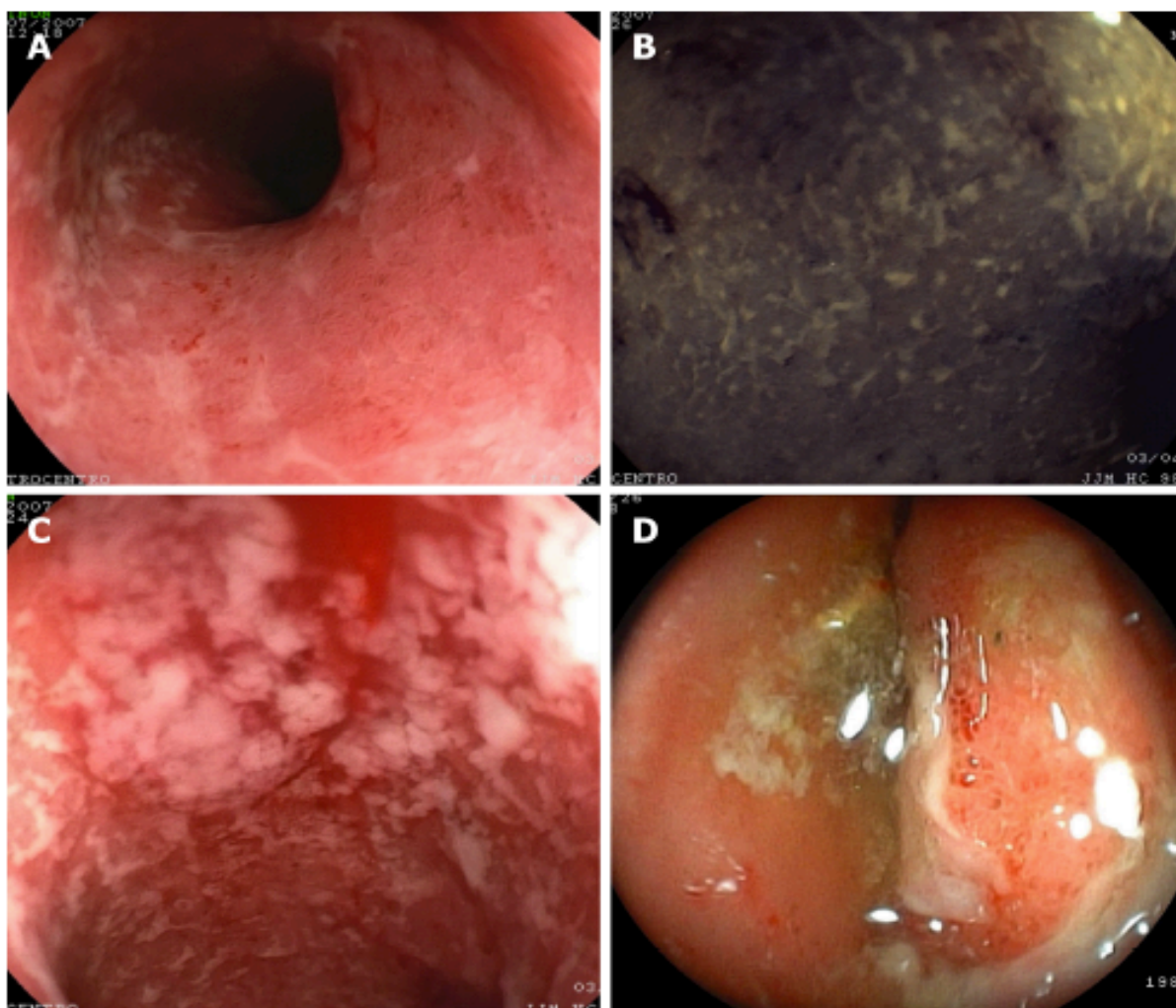


Figura 5 - Achados endoscópicos da retocolite ulcerativa. A: Eritema; B: Erosões e granularidade; C: Exsudato mucopurulento; D: Úlceras. Adaptado de Rodrigues *et al.*, 2020 (Rodrigues *et al.*, 2020).

Em pacientes com pancolite, o processo inflamatório pode ser observado até a região da válvula ileocecal, podendo, ocasionalmente, haver o envolvimento do íleo distal (Danese and Fiocchi, 2011). Em 75% dos casos de colite esquerda, é possível observar um foco isolado de inflamação próximo ao orifício apendicular, conhecido como *patch* cecal (Park *et al.*, 2014).

Para auxiliar no diagnóstico, pelo menos duas biópsias devem ser retiradas de seis áreas diferentes (íleo terminal, ascendente, transverso, descendente, cólon sigmóide e reto), incluindo a mucosa de aparência normal (Annese *et al.*, 2013).

A avaliação endoscópica alta não é necessária na rotina clínica dos pacientes adultos recém diagnosticados com RCU, sendo restrito àqueles com DC e

que apresentam sintomas de doença gastrointestinal superior. Entretanto, na população pediátrica, até 8% das crianças com RCU podem ter seu diagnóstico modificado para DC com base em achados endoscópicos superiores (de Bie et al., 2012).

Uma técnica endoscópica relativamente nova, chamada de cápsula endoscópica, tem sido utilizada nos últimos anos em pacientes com DII. Esta técnica, originalmente autorizada pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para avaliação do intestino delgado em pacientes com sangramento oculto, é utilizada para explorar o cólon para a detecção de neoplasias colônicas sem a necessidade de sedação ou insuflação de ar (Eliakim, 2013). A técnica tem uma sensibilidade de 89% e especificidade de 75% na detecção de RCU na fase ativa (Sung et al., 2012).

Novas técnicas avançadas endoscópicas que estão ganhando aceitação, como cromoendoscopia, imagem de banda estreita e imagem de autofluorescência podem delinear melhor os padrões suspeitos da mucosa e melhorar a detecção de displasia, bem como oferecer uma melhor avaliação da mucosa e da vasculatura da submucosa (Danese and Fiocchi, 2011; Gajendran et al., 2019).

1.5.2 Avaliação Histopatológica

A histopatologia é uma poderosa ferramenta no diagnóstico da RCU, avaliando a gravidade da doença e identificando displasia intraepitelial, neoplasia ou câncer (Gajendran et al., 2019). Entretanto, embora haja diversos escores que correlacionam a avaliação histológica e a gravidade da atividade da doença endoscópica, esta relação pode não ser verdade, uma vez que é possível haver achados histológicos em pacientes sem atividade endoscópica (Danese and Fiocchi, 2011).

Não há, até o momento, um critério específico para o diagnóstico de RCU. Entretanto, em 75% dos casos, há pelo menos duas das seguintes características: a) densidade de cripta reduzida; b) distorção grave arquitetônica de cripta; c) superfície da mucosa irregular; d) inflamação transmucosa difusa intensa, na ausência de granulomas genuínos (Seldenrijk et al., 1991).

Na RCU, a inflamação é caracteristicamente restrita à camada da mucosa, com infiltrados celulares variando em densidade e composição durante a doença ativa e estágios de remissão (Danese and Fiocchi, 2011). Os infiltrados consistem principalmente de linfócitos, e, em fase aguda, há infiltrado de plasmócitos e

granulócitos, que se acumulam em abscessos de criptas (Loddenkemper, 2009). Outras características típicas incluem depleção de células de Goblet, arquitetura de cripta distorcida, densidade de cripta diminuída, além das ulcerações. No entanto, granulomas epitelióides não estão presentes na RCU, pois são típicos da DC, (Danese and Fiocchi, 2011).

A presença de plasmocitose na camada basal é uma característica diagnóstica com bastante valia preditiva na fase inicial da doença. É iniciada com uma distribuição focal, evoluindo em um padrão difuso de destruição com o passar do tempo (Gajendran et al., 2019).

Durante o período de inatividade da doença, são observadas criptas distorcidas e atróficas, além de diminuídas em densidade. Também pode haver metaplasia das células de Paneth (Langner et al., 2014). Ao entrar em recidiva, pode ser observado dano epitelial com presença de neutrófilos, aumento da celularidade transmucosal da *lamina propria* com plasmocitose basal, presença de agregados linfóides basais e um aumento de eosinófilos (Dignass et al., 2012).

Devido ao risco de desenvolvimento de câncer em pacientes com RCU, a pesquisa por displasia epitelial é uma avaliação crítica no exame histopatológico. Porém, a displasia é uma característica que pode ocorrer a qualquer estágio da doença sem necessariamente significar uma transformação maligna. Por isso, sua interpretação deve ser cautelosa. (Danese and Fiocchi, 2011).

1.5.3 Avaliação laboratorial

Até o momento, não há um biomarcador sorológico específico para o diagnóstico da RCU. Portanto, a avaliação laboratorial se torna útil no monitoramento da doença, bem como no acompanhamento do tratamento (Gajendran et al., 2019).

Um dos exames laboratoriais mais comumente solicitado para monitoramento das DII é a proteína C reativa (PCR). A PCR é uma proteína da fase aguda da inflamação, sintetizada no fígado e estimulada, entre outras moléculas, pelas citocinas inflamatórias IL-6, IL-1 β e TNF- α (Rodrigues et al., 2020). Embora a PCR não seja específica das DII, diversos estudos correlacionaram seu nível com a atividade endoscópica da doença (Iaculli et al., 2016; Oh et al., 2017; Solem et al., 2005).

A velocidade de hemossedimentação (VHS) é um teste laboratorial que também avalia as proteínas na fase inflamatória. A performance do VHS é baseada

na taxa de sedimentação das hemácias no período de uma hora: no processo inflamatório ocorre a ativação de fatores pró-sedimentários, como o fibrinogênio, fazendo com que as hemácias se sedimentem mais rapidamente (Rodrigues et al., 2020). Um estudo realizado por Alper e colaboradores relatou uma correlação com os valores de VHS com a atividade das DII (Alper et al., 2017). Porém, esta correlação foi maior com DC do que RCU.

A contagem plaquetária, um outro exame laboratorial básico na rotina clínica, também foi associada à atividade das DII. Sua elevação pode indicar processo inflamatório, portanto, níveis elevados de plaquetas foram observados em pacientes com recidiva de RCU (Nakarai et al., 2018).

Setenta por cento dos pacientes com RCU apresentam o anticorpo perinuclear anti-citoplasmático de neutrófilos (p-ANCA), enquanto pacientes com DC apresentam o anticorpo anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA). Portanto, a pesquisa por estes dois anticorpos auxilia tanto no diagnóstico das DII quanto na sua diferenciação: pacientes com DC são considerados ASCA+/p-ANCA-, e pacientes com RCU são considerados ASCA-/p-ANCA+ (Gajendran et al., 2019; Plevy et al., 2013).

Devido a sua forte correlação com a atividade da doença, a avaliação por meio de marcadores fecais, em especial a calprotectina, está se tornando indispensável na rotina clínica dos pacientes com DII (Rodrigues et al., 2020). A calprotectina é uma glicoproteína encontrada no citoplasma de células inflamatórias, em especial nos neutrófilos e macrófagos, estando, portanto, aumentada em processos inflamatórios no trato gastrointestinal (Vermeire, 2006). Há, na literatura, diversos artigos que sugerem uma correlação do aumento dos níveis de calprotectina com a atividade endoscópica da DII, tanto para DC quanto para RCU (Costa, 2005; D'Haens et al., 2012; Xiang et al., 2008).

Dosagem fecais de lactoferrina, uma outra glicoproteína presente em neutrófilos, e do S100A12, um ativador do NF- κ B, também foram correlacionadas com atividade endoscópica das DII (Kaiser et al., 2007; Vieira et al., 2009). Um estudo publicado por Boschetti e colaboradores sugeriu que valores acima de 80 μ g/g de S100A12 indicam uma resposta sustentada ao uso de anti-TNF- α , que é uma abordagem terapêutica convencional nas DII (Boschetti et al., 2015).

Análises transcricionais relataram que os microRNAs (miRNA) também podem estar associados às DII. Altos níveis de quatro tipos diferentes de miRNA (miR-

18a, miR-629, let-7b e miR-140-3p) e níveis mais baixos de três miRNAs (miR-422a, miR-885-5p e miR-328) foram identificados na mucosa intestinal de DC ativa quando comparada com a DC inativa. Com relação à RCU, foi observado que dois miRNAs (miR-650 e miR-548a-3p) estavam mais expressos e três (miR-630, miR-489 e miR-196b) menos expressos na fase ativa quando comparada com a inativa (Iborra et al., 2013), podendo constituir biomarcadores de atividade da doença.

1.6 Tratamento da RCU

Os tratamentos da RCU se fundamentam na melhora da qualidade de vida, na indução da remissão sem o uso de anti-inflamatórios esteroidais, e em minimizar o risco de câncer. A escolha do tratamento deve levar em consideração a atividade clínica e endoscópica (leve, moderada ou grave) combinado com a extensão da doença (proctite, colite esquerda, ou pancolite), e também o curso da doença durante o acompanhamento (Danese and Fiocchi, 2011; Gajendran et al., 2019).

Durante a avaliação endoscópica inicial, é importante delinear a margem proximal da inflamação na mucosa intestinal. Se for limitada abaixo da flexura esplênica, ela é considerada "distal" e, portanto, está ao alcance da terapia tópica, como enemas e supositórios. Se a inflamação se estende proximal à flexura esplênica, é necessário o uso de terapia sistêmica (Gajendran et al., 2019). Além disso, também devem ser considerados a gravidade histológica da inflamação, idade de início do doença, duração e curso da doença, frequência de recidivas, histórico medicamentoso, efeitos colaterais da medicação e presença ou ausência de manifestações extraintestinais (Gajendran et al., 2019).

O objetivo do tratamento pode ser dividido em duas fases: indução da remissão, e manutenção da remissão. Sulfassalazina e 5-aminossalicilatos, administrados por via oral, retal (por meio de supositório ou enema), ou ambos, representam a primeira linha, com uma taxa de expectativa de remissão cerca de 50% (Nielsen and Munck, 2007).

Pacientes com proctite devem ser tratados primeiro com supositórios de mesalazina (5-ASA), uma vez que eles são mais eficazes do via oral, pois atuam diretamente no local da inflamação (Gionchetti et al., 1998). Os pacientes que não apresentam resposta com esta abordagem, devem tomar glicocorticóides orais (até 40 mg de prednisona ou equivalente) (Danese and Fiocchi, 2011). Para manter a remissão, é recomendando ao paciente que mantenha o uso de supositórios de 5-

ASA. Caso o paciente tenha mais de um histórico de recidiva ao ano, é indicado o uso oral (Hanauer et al., 2000).

Para o manejo inicial da RCU de cólon esquerdo e/ou pancolite de grau leve a moderada, é indicada uma combinação de 5-aminossalicilato retal e oral (até 4,8 g por dia) (Connolly et al., 2009). A melhora sintomática é observada normalmente em 2 semanas, mas pode levar até 8 semanas para a remissão sintomática. Os pacientes que atingem a remissão com 5-ASA devem continuar com a mesma medicação para manter a remissão (Bressler et al., 2015). Em pacientes refratários às terapias retais e ao 5-aminossalicilato oral, indica-se glicocorticóides orais ou agentes imunossupressores (azatioprina ou 6-mercaptopurina); e, para aqueles que não respondem a doses máximas destes medicamentos, é indicado terapia com medicamentos biológicos, como o infliximabe e o adalimumabe (Danese and Fiocchi, 2011).

Pacientes com RCU moderada a grave devem ser tratados com corticosteroides orais (40 mg de prednisona por dia) ou esteroides intravenosos (300 mg de hidrocortisona ou 60 mg de metilprednisolona) para obter remissão (Gajendran et al., 2019). Caso a remissão não seja obtida, é indicado iniciar o tratamento biológico (Gajendran et al., 2019).

1.6.1 Agentes biológicos

A aplicação de agentes biológicos no tratamento da RCU se iniciou a partir de estudos que identificaram as citocinas presentes na *lâmina própria* da mucosa intestinal. Dentre as moléculas utilizadas, o uso de anticorpos monoclonais anti-TNF- α , junto com anti-integrinas, anti-interleucinas e anti-JAK, tem sido as alternativas mais relevantes (de Mattos et al., 2015). Estes anticorpos podem ativar diversos mecanismos envolvidos na resposta imunológica, como indução de apoptose e bloqueio da liberação de fatores de crescimento que ativam as células Th (Carter, 2004).

1.6.1.1 Terapia com anti-TNF- α

A primeira molécula anti-TNF- α comercialmente disponível para o tratamento da RCU foi o infliximabe (IFX), um anticorpo monoclonal IgG1 formado por um segmento da proteína nativa de camundongo contendo o sítio de ligação para o

TNF- α e uma porção da imunoglobulina humana responsável pela função efetora da molécula de anticorpo (Kam and Targan, 2000; Sands et al., 2001).

Para atingir uma remissão efetiva da doença em pacientes com DII, a dosagem padrão de IFX é geralmente 5 mg/kg por infusão intravenosa nas semanas 0, 2 e 6, seguida por um regime de manutenção a cada 8 semanas. No entanto, alguns dados mostram que a dosagem de 10 mg/kg parece manter a remissão por um período mais longo (Moss et al., 2013; Rutgeerts et al., 2006).

Níveis séricos de infliximabe entre 3 e 7 ug/mL foram positivamente correlacionados com remissão clínica e endoscópica. Porém, cerca de 30% dos pacientes não apresentam melhora clínica no final do período de indução (14 semanas), e são considerados não-respondedores primários. O desenvolvimento de anticorpos contra a droga foi associado à perda de resposta (Ben-Horin and Chowers, 2014; Ungar et al., 2016).

Devido à taxa de não-respondedores ao IFX, foi desenvolvido um outro anticorpo monoclonal anti-TNF- α totalmente derivado de humano, chamado de adalimumabe (ADA) (Panaccione et al., 2011). O ADA induz apoptose de células pró-inflamatórias ao se ligar à molécula de TNF- α , bloqueando, assim, sua interação aos seus receptores específicos (Panaccione et al., 2011).

O uso do ADA tem se mostrado eficaz tanto para RCU quanto para DC pela administração subcutânea com uma dose inicial de 160 mg, uma segunda dose duas semanas depois de 80 mg e uma dose de manutenção de 40 mg a cada duas semanas (de Mattos et al., 2015).

O certolizumab pegol (CDP 870), um fragmento de anticorpo monoclonal peguilado e totalmente humanizado, é um agente anti-TNF- α que foi recentemente aprovado pelo FDA para tratamento de DC com remissão sustentada (Evans and Lee, 2012). Estudos mostram que essa droga parece ser mais eficaz e menos imunogênica do que IFX e ADA (Lichtenstein, 2013; Mozaffari et al., 2014), e há, atualmente, alguns estudos em andamento, que relatam a eficácia do certolizumabe pegol para o tratamento da RCU (Lee et al, 2017, Osterman et al, 2017). A administração subcutânea de certolizumab pegol em doses de 400 mg uma vez a cada 4 semanas foi eficaz como terapia de indução e manutenção. Em caso de falta de resposta, deve ser administrado a cada 2 semanas (de Mattos et al., 2015).

Há ainda o golimumabe, um anticorpo monoclonal antagonista do TNF- α IgG1 humano, que também mostrou resultados significativos na indução e

manutenção da remissão em pacientes com DC e RCU, com uma taxa de eventos adversos semelhante ao placebo (Danese, 2013; Mozaffari et al., 2014; Sandborn et al., 2014). A indicação inicial do golimumabe recomendado para o tratamento de RCU é uma dose subcutânea de 200 mg na semana 0 seguida por 100 mg na semana 2. A terapia de manutenção é 100 mg a cada 4 semanas (Lowenberg et al., 2014).

1.6.1.2 Terapia com anti-integrinas

A interação leucócitos-endotélio, mediada por moléculas de adesão, como as integrinas e a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), são fundamentais para a migração leucocitária para o local de inflamação, mantendo assim, o processo inflamatório ativo. Por isso, o bloqueio destas moléculas se tornou uma alternativa promissora para o tratamento de doenças inflamatórias (de Mattos et al., 2015).

O FDA aprovou a administração de anticorpos monoclonais anti- $\alpha 4$ das integrinas, chamados de natalizumabe (apenas para DC) e vedolizumabe (para RCU e DC) (Thomas and Baumgart, 2012). O regime de dosagem do vedolizumabe é de 300 mg por infusão intravenosa em 0, 2 e 6 semanas, com uma terapia de manutenção a cada 8 semanas (Feagan et al., 2013).

Diversos estudos relataram que o bloqueio das unidades $\alpha 4\beta 7$, feito com o uso do vedolizumabe, resultou em uma barreira seletiva para células T CD4+, diminuindo assim, o processo inflamatório. Além disso, foi observado uma diminuição do escore clínico de RCU, sugerindo uma taxa de remissão de até 50% dos casos (Feagan et al., 2013, 2005; Parikh et al., 2012).

1.6.2 Terapia com pequenas moléculas

Como a taxa de perda de resposta com a terapia biológica, em especial com o uso do anti-TNF- α é relativamente alta, novas abordagens têm sido testadas e utilizadas para o tratamento da RCU. Uma molécula que tem sido alvo terapêutico na RCU é a Janus quinase (JAK) (Boland et al., 2014).

A família das tirosino quinases JAK é composta por 4 tipos de proteínas intracelulares: JAK1, JAK2, JAK3 e o não receptor proteína-tirosino quinase (TYK2, de *non-receptor tyrosine-protein kinase*). A principal função da JAK é a ativação de sinais transdutores e ativadores de transcrição, chamados de STATs (de *signal transducers and activators of transcription*), que, por sua vez, induz a expressão de citonas pró-inflamatórias (Clark et al., 2014), favorecendo a manutenção da doença.

O tofacitinibe é considerado uma pequena molécula que inibe a ativação da JAK-STAT, ao competir, utilizando uma molécula de ATP, com o domínio de ligação da JAK, impedindo assim, que se inicie a cascata de ativação (Boland et al., 2014).

Esta nova abordagem tem mostrado bons resultados no manejo clínico da RCU. Sandborn e colaboradores relataram que, em dois estudos clínicos randomizados, duplo-cego com mais de mil pacientes com RCU no total que foram tratados com tofacitinibe, houve uma taxa de quase 20% de remissão nos dois primeiros meses de uso do medicamento. Esta taxa dobrou para quase 40% na semana 52 do tratamento (Sandborn et al., 2017).

1.6.3 Intervenção cirúrgica

Na RCU, há diversas indicações para intervenção cirúrgica, como inflamação persistente do cólon (falha à terapia medicamentosa), colite fulminante intratável, megacólon tóxico, perfuração, sangramento incontrolável, efeitos colaterais intoleráveis de medicamentos, displasia de alto grau ou multifocal não ressecável, lesões ou massas associadas à displasia, e câncer (Aratari et al., 2008).

A retocolectomia total com bolsa ileal e anastomose íleoanal é a opção de preferência quando há acometimento retal concomitante. Esta abordagem apresenta baixa mortalidade (até 0,4%) e está associada com uma baixa taxa de morbidade (até 27%) (Danese and Fiocchi, 2011)

Há, entretanto, a possibilidade de 40% de desenvolvimento de bolsite, uma inflamação inespecífica provavelmente causada por uma resposta imune à microbiota recém-estabelecida na bolsa ileal. Os sintomas da bolsite incluem aumento da frequência do hábito intestinal e desconforto abdominal e perianal, e é tratada com o uso de antibióticos e probióticos (Vieira et al., 2009).

Em casos em que não é possível realizar a retocolectomia total, há a opção de realizar uma ileostomia continente. Nesta abordagem, uma bolsa com uma válvula é feita a partir do íleo e conectada à pele da parte inferior do abdômen. Este procedimento permite que as fezes sejam retidas e drenadas conforme necessário com um cateter. Qualquer mucosa colônica ou retal residual pode se tornar cancerosa, com a obrigatoriedade de vigilância endoscópica de longo prazo (Danese and Fiocchi, 2011).

1.7 Mecanismos moleculares envolvidos na RCU

Após a invasão de patógenos devido à uma falha da barreira epitelial, e após a ativação do sistema imunológico, diversos mecanismos moleculares são iniciados com o intuito de reestabelecer a homeostase do organismo. A degradação dos patógenos intracelulares e toxinas microbianas através do processo de autofagia, aumenta a sobrevivência das células intestinais, incluindo as epiteliais, diminuindo assim a disfunção da barreira da mucosa. Entretanto, se a autofagia se torna ineficaz, as funções de proteção das células epiteliais são alteradas, incluindo a capacidade de proteção contra bactérias comensais e patogênicas, o que pode levar à ativação do estresse do retículo endoplasmático e à apoptose (Randall-Demillo et al., 2013).

Diversos estudos têm correlacionado a manutenção das DII com três processos moleculares: a apoptose, a autofagia, e o estresse do retículo endoplasmático (Samoilă et al., 2020).

1.7.1 Apoptose

A apoptose é um processo de morte celular altamente regulado que confere vantagens biológicas, como a sobrevivência celular, por meio do qual os organismos mantêm a homeostase. Com uma função de obliteração das células cancerígenas, a apoptose tem mostrado ser um potencial terapêutico promissor na indústria farmacêutica (Xu et al., 2019). A inflamação está intimamente associada à iniciação da apoptose, uma vez que a ativação de receptores de TNF levam à produção de proteínas pró-apoptóticas (Vermeulen et al., 2005).

A apoptose ocorre através da ação de uma família de proteases serinas conhecida como caspases. Os sinais de morte que a célula propaga são retransmitidos por meio de vias de sinalização que levam a ativação das caspases, iniciando assim, a destruição celular (Cohen, 1997). As caspases são classificadas em dois tipos: iniciadoras, como as caspases 2, 8, 9, 10 e 11, e efetoras/executoras, como as caspases 3, 6 e 7 (Xu et al., 2019).

As mudanças morfológicas que ocorrem durante a apoptose incluem encolhimento do tamanho celular, fragmentação nuclear e do material genético, e formação pequenas vesículas chamadas de corpos apoptóticos. O encolhimento é iniciado no estágio inicial da apoptose, levando a um empacotamento extremamente denso do conteúdo celular. Simultaneamente, é iniciado a condensação irreversível

da cromatina, seguido de fragmentação nuclear, levando a formação de corpos apoptóticos, que são então englobados por células fagocíticas (K. Xu et al., 2017).

Proteínas da família Bcl-2 são responsáveis pela regulação da apoptose, e elas são divididas em duas classes: proteínas pró-apoptóticas, como a Bax e a Bak, e proteínas anti-apoptóticas, como a própria Bcl-2 e a MCL-1 (Cory and Adams, 2002). O gene *P53* também está envolvido com a apoptose, uma vez que sua ativação induz a transcrição de Bax, iniciando assim, o processo apoptótico (Xu et al., 2019).

Estímulos externos e internos, que envolvem uma ampla variedade de proteínas e transdutores de sinal, bem como cascatas de vias de sinalização, podem iniciar a apoptose através de vias extrínsecas e intrínsecas (Xu et al., 2019).

A via extrínseca é iniciada através da ligação de proteínas, como o TNF e o Fas, aos receptores celulares, conhecidos como receptores de TNF (TNFR-1 e TNFR-2). A interação do TNF com seus receptores leva ao recrutamento de duas proteínas adaptadoras: o domínio de morte associado ao receptor TNF (TRADD, de *TNF receptor-associated death domain*), e a proteína de domínio de morte associada ao Fas (FADD, de *Fas-associated death domain protein*) (Xu et al., 2019). Estas proteínas ativam as caspases iniciadoras 8 e 10, que, por sua vez, ativam caspases finalizadoras, como a 3, 6 e 7, responsáveis pela fragmentação nuclear e clivagem do material genético (D'Arcy, 2019).

A via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, é ativada por estímulos internos da célula. A ausência citocinas e fatores de crescimento necessários para a sobrevivência celular leva à expressão de genes apoptóticos, como *PUMA*, *NOXA* e *BAX*, iniciando assim a apoptose através da ativação da caspase 9 (D'Arcy, 2019). Outros estímulos incluem: hipóxia, toxinas microbianas, radiação e espécies reativas de oxigênio (Brenner and Mak, 2009).

Alguns estudos na literatura sugerem que a apoptose está associada à manutenção das DII. Já foram relatados, em mucosa intestinal inflamada de pacientes com RCU, um aumento da proteína ligante de Fas (FasL), bem como apoptose de enterócitos por aumento de metaloproteinases em pacientes com DC na fase ativa (Di Sabatino et al., 2003; Souza et al., 2005).

1.7.2 Autofagia

A autofagia é responsável pela reciclagem de grandes complexos proteicos, incluindo o inflamassomo (complexo sinalizador multiproteico que medeia a

resposta imunológica), que as proteases não foram capazes de degradar (Harris et al., 2017). Portanto, é um processo vital para a manutenção da homeostase intracelular.

Em condições inflamatórias, a autofagia é um processo importante na resposta do sistema inato e adaptativo por auxiliar no controle de eliminação de citocinas pró-inflamatórias, bem como na apresentação de antígenos (Wang et al., 2019). O processo autofágico é mediado por um complexo chamado de ULK1, que, para formar um autofagoporo, ativa o complexo quinase fosfoinositídeo classe III (P13K). Um outro complexo, composto por ATG5, ATG12 e ATG16L, juntamente à proteína de cadeia leve associada à microtúbulos lipidados (LC3II), estimula o autofagoporo e forma o autofagossomo. Uma proteína chamada p60 se liga ao LC3II para englobar as proteínas alvo da autofagia (Ndoye and Weeraratna, 2016).

Há três principais formas de autofagia: autofagia mediada por chaperonas, microautofagia, e macroautofagia (D'Arcy, 2019). Na autofagia mediada por chaperonas, ocorre uma interação de chaperonas com a região de pentapeptídeos presente nas proteínas citoplasmáticas alvos da autofagia. Esta interação ativa o receptor LAMP-2A na membrana lisossomal, ativando assim a degradação pelos lisossomos (Dice, 2007).

A microfagia pode ser ativada por moléculas sinalizadoras presentes no produto alvo, promovendo assim, uma fusão lisossomal mais específica (Samoilă et al., 2020). Na macroautofagia, componentes celulares, como organelas, agregados proteicos e até antígenos intracelulares, são englobadas em vesículas com membrana dupla, chamadas de autofagossomos, que se fundem aos lisossomos, formando um autolisossomo (ou autofagolisossomo), para que este componente englobado seja degradado pelas enzimas lisossomais (D'Arcy, 2019; Samoilă et al., 2020).

Estudos de associação gênica reportaram polimorfismos do gene *ATG16L1*, um dos principais da autofagia, com a DC, e isto levantou hipóteses de que a autofagia é um dos fatores envolvidos na manutenção da doença (Hampe et al., 2007; Rioux et al., 2007). Recentemente, este gene também foi associado à RCU: pacientes com mutações no gene *ATG16L1* tendem a ter uma cicatrização deficiente da mucosa intestinal, necessitando assim, de mais intervenções medicamentosas do que aqueles sem as mutações (Nuij et al., 2017).

Outras moléculas relacionadas à autofagia também foram associadas à RCU. Em pacientes que se encontram na fase ativa da doença, foi observado uma

diminuição significativa do fator de transcrição de ativação 4 (ATF4). Este fator é uma importante proteína relacionada à autofagia e sua diminuição sugere que há uma redução do processo de autofagia nos pacientes com RCU (Hu et al., 2019). Alguns estudos também reportaram que influência do receptor de vitamina D (VDR) na RCU. A ativação deste receptor em células intestinais pode amenizar o processo inflamatório ao suprimir a autofagia mediada por inflamassomos (Law et al., 2019). Entretanto, Bakke e colaboradores observaram uma baixa expressão de VDR e uma disfunção na sinalização de vitamina D/VDR em pacientes com RCU (Bakke and Sun, 2018).

Além disso, quando há um processo inflamatório na mucosa intestinal, algumas bactérias comensais, como a *Escherichia coli*, se aderem às células epiteliais intestinais, não sendo capaz assim, de ser englobada pelos autofagossomos (Palmela et al., 2018).

1.7.3 Estresse do retículo endoplasmático (ERE)

O retículo endoplasmático (RE) é responsável pela síntese e dobramento das proteínas de membrana e secretoras, além de ser associado à homeostase de cálcio intracelular, metabolismo de energia e biossíntese de lipídeos (Cao et al., 2013b; Hetz, 2012).

Ao finalizar o processo de transcrição, a molécula de RNA mensageiro (mRNA) é translocada ao RE para iniciar a translação. As proteínas são sintetizadas nos ribossomos presentes na membrana do RE. O polipeptídeo recém feito contém um domínio de sinal N-terminal, que, ao ser reconhecido pelas partículas sinalizadoras de reconhecimento, é levado ao lúmen do RE via complexo translocon. A sequência sinalizadora do N-terminal é então clivada e se iniciam as modificações pós-translacionais, assistidas por chaperonas específicas para que a cadeia peptídica adquira sua forma estrutural final (Adams et al., 2019).

Há alguns tipos celulares, como plasmócitos, células β secretoras de insulina, e determinadas condições, como processo inflamatório, que requerem uma alta taxa de síntese proteica, podendo sobrecarregar o RE (Adams et al., 2019). Quando há o comprometimento do RE em realizar tais funções, ocorre o acúmulo de proteínas mal formadas em seu lúmen, levando a uma condição chamada estresse do retículo endoplasmático (ERE), promovendo efeitos deletérios na célula, incluindo

morte celular. Há, entretanto, uma resposta celular mediada por sinais transdutores à ativação do ERE, chamada de UPR (*unfolded protein response*) (Ma et al., 2017).

A UPR é uma resposta adaptativa que tem o objetivo de restaurar a homeostase do RE, prolongando assim, a sobrevivência da célula. Na UPR, ocorre bloqueio de todo o processo translacional das moléculas de RNA mensageiro, e as proteínas mal formadas acumuladas no RE são direcionadas para a via de degradação (ERAD, de *ER-associated protein degradation*) (Ma et al., 2017).

A ativação da UPR é mediada por três principais sensores, presentes na membrana do RE: quinase transmembranar/endonuclease 1 que requer inositol (IRE1, de inositol-requiring transmembrane kina/endonuclease-1), quinase pancreática RE eIF2 α (PERK, de pancreatic ER eIF2 α kinase), e o fator de transcrição ativador 6 (ATF6, de activating transcription factor 6) (Cox et al., 1993; Haze et al., 1999; Shi et al., 1998). Para mantê-las inativas em condições normais, a proteína de imunoglobulina de ligação (BiP, de binding immunoglobulin protein), também conhecida como chaperona GRP78 (HSPA5), se mantém ligada ao IRE1, ao PERK e ao ATF6. Entretanto, o acúmulo de proteínas mal formadas faz com que o BiP se dissocie das proteínas, ativando-as e iniciando a cascata de sinalização da UPR (Cao, 2015; Ma et al., 2017) (figura 6).

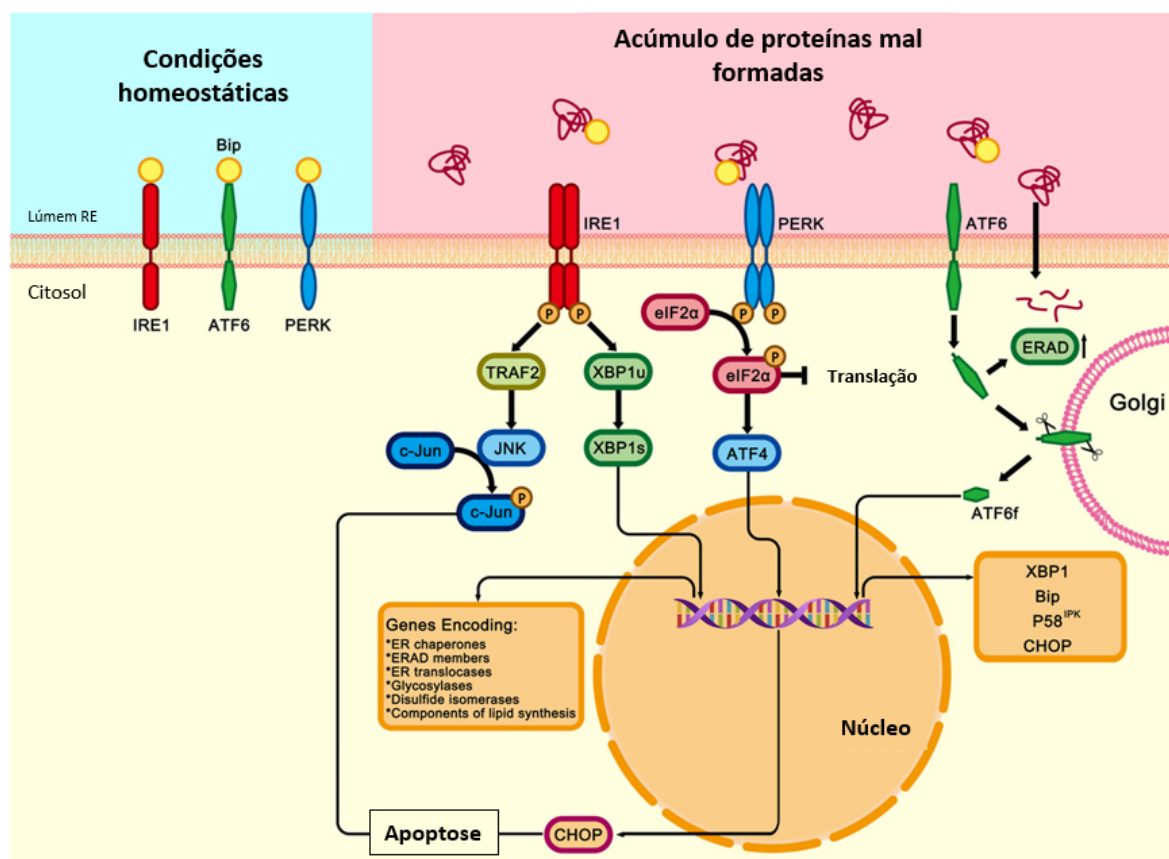


Figura 6 – Cascata de ativação da do ERE e da UPR. Adaptado de Ma *et al.*, 2017 (Ma et al., 2017).

A barreira epitelial, como já discutido previamente, é responsável pela produção de glicoproteínas, como a mucina, protegendo assim, toda a mucosa intestinal. Nas DII, entretanto, a disbiose leva a um estímulo da produção de mucina (MUC2) e gradiente anterior 2 (AGR2), na tentativa de melhorar a barreira contra invasão de patógenos. Este estímulo pode levar a uma sobrecarga no processo de estruturação proteica no lúmen do RE nas CEI, podendo ativar, assim, o ERE e a UPR (Ma et al., 2017).

A AGR2 é uma proteína presente em células de Goblet, Paneth e enterócitos do intestino grosso. Ela auxilia na estruturação proteica ao corrigir as pontes dissulfeto em proteínas já formadas (Feige and Hendershot, 2011). Modelos experimentais mostraram que a depleção do gene AGR2 levou à ativação do ERE através a ativação da via IRE1 e induziu um quadro de colite grave ao diminuir o número de células de Goblet (Zhao et al., 2010). Além disso, um trabalho feito por

Zheng e colaboradores reportou que pacientes com RCU apresentam uma diminuição da expressão de *AGR2*, sugerindo que a proteína apresenta um papel importante na fisiopatologia da doença (Zheng et al., 2006).

A secreção de MUC2, considerada o maior componente da mucina, requer uma formação das pontes dissulfeto nos domínios N e C-terminal dentro do lúmen do RE (Ma et al., 2017). Mutações do gene *MUC2* foram associadas a uma disfunção da estruturação proteica, causando assim, o acúmulo de proteínas mal formadas e consequente ativação do ERE, bem como à inflamação e desenvolvimento de colite espontânea (Heazlewood et al., 2008). Este resultado também foi observado em estudo com pacientes que apresentam RCU e DC (Hanski et al., 1999).

A tabela 2 mostra a depleção de diversos genes relacionados ao ERE e à UPR que foram associados, em modelos experimentais, com a indução e manutenção da colite.

Tabela 2 – Genes relacionados à ativação do ERE que influenciam a indução e/ou manutenção da colite experimental. Adaptado de Ma et al., 2017 (Ma et al., 2017)

Gene	Possível mecanismo
<i>IRE1α</i>	Aumento da apoptose por CHOP
<i>XBP1</i>	Aumento da apoptose por CHOP
<i>P58^{IFK}</i>	Aumento da apoptose por CHOP
<i>ATF6A</i>	Diminuição da BiP
<i>MUC2</i>	Indução da apoptose e ativação do NF-κB
<i>AGR2</i>	Aumento da apoptose por CHOP

O envolvimento imunológico e diversos mediadores inflamatórios característicos da RCU também têm influência na indução e manutenção do ERE. A citocina anti-inflamatória IL-10 já foi associada à modulação do ATF6, auxiliando sua ligação à BiP, evitando assim, que o ERE seja ativado (Shkoda et al., 2007). Entretanto, modelos experimentais mostram que animais *knockout* para IL-10 desenvolvem colite espontânea (Keubler et al., 2015). Já a citocina pró-inflamatória TNF-α, presente em elevadas concentrações na mucosa intestinais de pacientes com RCU, foi associada à ativação do ERE e da UPR ao induzir a produção de espécies

reativas de oxigênio, levando ao acúmulo de proteínas mal formadas lúmen do RE (Xue et al., 2005).

1.7.3.1 IRE1

Há duas principais isoformas estruturais do receptor IRE1: IRE1 α e IRE1 β , sendo o IRE1 α é a isoforma mais ubiquamente expressa nas células dos mamíferos. A ativação do IRE1 α ocorre através de homodimerização e trans-autofosforilação após a dissociação da BiP devido ao acúmulo de proteínas mal formadas no lúmen do RE (Gardner and Walter, 2011). A forma ativada do IRE1 α promove um *splicing* da proteína de ligação 1 do fator de transcrição X-box (XBP1u), transformando-a em sua forma ativa Xbp1s, através da remoção de 26 pares de bases via endoribonuclease (Calton et al., 2002).

A IRE1 α também pode promover processos biológicos, como proliferação celular, inflamação, autofagia e apoptose, sem haver envolvimento da Xbp1. Para isso, o IRE1 α se liga e ativa o fator 2 associado ao receptor de TNF α no citoplasma, que, por sua vez, ativa a quinase c-Jun N-terminal e/ou o NF- κ B, iniciando assim um processo inflamatório ou pro-apoptótico associado ao ERE (Cao, 2015; Ma et al., 2017).

Há diversos trabalhos de modelo animal que associam a ativação da via IRE1/Xbp1 com inflamação intestinal. Esta hipótese se iniciou com um trabalho experimental que reportou que ratos com uma depleção genética do *IRE1 β* apresentavam um nível elevado de BiP na mucosa intestinal do cólon, aumentando assim, a susceptibilidade da indução de colite por sulfato de dextrano sódico (DSS) (Bertolotti et al., 2001). Um outro estudo, também experimental, mostrou que esta depleção de *IRE1 β* dificultava o controle de produção de mucina em células de Globet, levando assim ao um aumento de mucina e prejudicando a integridade da barreira da mucosa (Tsuru et al., 2013).

Em um outro estudo experimental com avaliação *in vitro*, Zhang e colaboradores observaram que a deleção genética de IRE1 α em CEI promoveu uma colite espontânea em camundongos. Esta colite foi causada devido à perda de função das células Globet e, conseqüentemente, ao comprometimento da barreira epitelial. Além disso, os camundongos *knockout* para IRE1 α (*IRE1 α ^{-/-}*) estão mais susceptíveis à indução de colite com o uso de DSS e ao processo apoptótico causado pela ativação do ERE (Zhang et al., 2015).

Kaser e colaboradores realizaram um estudo com biópsias de mucosa intestinal de pacientes com DC e RCU, e observaram polimorfismos de nucleotídeos únicos no gene *XBP1* (Kaser et al., 2008). O papel do *XBP1* nas DII também já foi validado no braço experimental do mesmo estudo, em que foi observado que camundongos *Xbp1^{-/-}(IEC)* desenvolviam inflamação intestinal espontaneamente, além de apresentarem uma barreira intestinal com alta permeabilidade, facilitando a invasão de patógenos.

1.7.3.2 PERK

A ativação da via PERK ocorre de forma similar à da via IRE1: o acúmulo de proteínas mal formadas no lúmen do RE leva à dissociação da BiP do domínio da PERK, promovendo sua homodimerização e trans-autofosforilação (Ma et al., 2017).

Quando ativada, a proteína PERK realiza a fosforilação da subunidade α do fator de iniciação de tradução eucariótica 2 (eIF2 α), caracterizado como um complexo de iniciação do processo de translação. Assim, a forma fosforilada da eIF2 α (p-eIF2 α) atenua a síntese proteica, diminuindo a sobrecarga de proteínas mal formadas (Ma et al., 2017).

A p-eIF2 α possui uma seletividade para a translação do ATF4, um dos fatores de transcrição responsável pela resposta oxidativa e indução de apoptose via CHOP (*C/EBP homologous protein*). A ativação da CHOP via ATF4 induz a expressão de genes envolvidos na maquinaria de síntese proteica, reduzindo sua produção, e de genes envolvidos com apoptose específica por ativação de ERE. O CHOP, também conhecido como DDIT3 (*DNA damage-inducible transcript 3*), está diretamente ligado ao processo de apoptose ao suprimir a ação anti-apoptótica da Bcl-2 e induzir a ação pró-apoptótica da Bim (Urrea et al., 2013). Além disso, a ativação do CHOP induz a expressão da oxidase 1 α do RE, que eleva a geração de espécies reativas de oxigênio e liberação de íons de cálcio, favorecendo a apoptose (Tabas and Ron, 2011).

Além da indução da apoptose, a via PERK também pode promover a sobrevivência celular, agindo assim, como um regulador molecular que auxilia no destino da célula. A molécula eIF2 α pode ser desfosforilada por fosfatases, como a GADD34 e sua subunidade 15B (conhecida como CReP), gerando assim um *feedback* negativo na sinalização da via PERK-eIF2 α (Chambers et al., 2015).

A ativação da via PERK também já foi associada às DII. Cao e colaboradores mostraram que o epitélio intestinal de ratos deficientes para produção

de Xbp1, ATF6a e P58 apresentam uma elevada expressão de CHOP (Cao et al., 2013a). O mesmo resultado foi observado em um estudo com pacientes com DII realizado por Kaser e colaboradores (Kaser et al., 2008).

Ademais, ativação de CHOP diminuiu a expressão do receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma, um regulador negativo do NF- κ B. A diminuição deste receptor leva a maior ativação do NF- κ B, induzindo assim, a expressão de genes pró-inflamatórios (Park et al., 2010). Além disso, Goodall e colaboradores reportaram que a CHOP, quando ativada, aumenta a produção de IL-23, que por sua vez, aumenta a produção de IL-17 (Goodall et al., 2010). Tais citocinas já foram associadas à inflamação intestinal (Geremia and Jewell, 2012).

1.7.3.3 ATF6

O fator de transcrição de ativação 6 (ATF6) se apresenta, em células de mamíferos, em duas formas homólogas: ATF6 α e ATF6 β (Ma et al., 2017). Após a dissociação da BiP causada pelo acúmulo de proteínas malformadas, o ATF6 migra para complexo de Golgi e sofre um processo de clivagem pela protease site-1 (S1P), no lúmen do Golgi, e -2 (S2P), na região transmembrana. O fragmento clivado do ATF6 (ATF6f) é translocado ao núcleo da célula e ativa a expressão de genes relacionados ao processo estrutural proteico como a própria XBP1 e a BiP, de genes relacionados ao ERAD, ou à apoptose (via CHOP) (Kokame et al., 2001; Yamamoto et al., n.d.)

Um estudo em modelo experimental mostrou que a depleção do gene *ATF6* leva a redução da expressão de genes de chaperonas, como o BiP e o GRP94 (HSP90B1), e ao aumento da produção de CHOP no epitélio colônico (Cao et al., 2013a). No mesmo estudo foi relatado que ratos *knockout* para o gene DNAJC3 (P58^{-/-}), um importante modulador do ERE, apresentam um menor número de células Goblet, levando assim, a uma barreira de mucosa menos eficaz no combate à invasão de patógenos.

Não há, entretanto, nenhum estudo na literatura que avalie a caracterização e o local de ativação do ERE em mucosa inflamada de pacientes com RCU. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ativação do ERE e os genes relacionados à UPR, através de análise de expressão gênica, em pacientes com RCU na fase ativa, e caracterizar a localização histológica desta ativação através de análises de imunohistoquímica e hibridização *in situ*.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral:

Caracterizar, em um estudo multicêntrico, a ativação de ERE em biópsia intestinal de pacientes com RCU em fase ativa.

2.2 Objetivos específicos:

- Investigar a ativação de ERE por meio da expressão gênica de PERK, IRE1, ATF6, e de genes responsivos à UPR em biópsias de mucosa intestinal de pacientes com RCU.
- Caracterizar, por meio de técnicas de imunohistoquímica e hibridização in situ, a localização da ativação do ERE.
- Avaliar a expressão gênica de citocinas inflamatórias em pacientes com RCU que apresentam ERE ativado.

3. Casuística e Metodologia

3.1 Casuística

Vinte e dois pacientes com RCU (tabela 3) que foram submetidos à ileocolonosopia durante rotina médica no Gastrocentro, na Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) e no setor de gastroenterologia do Hospital Clinic de Barcelona, Espanha, foram selecionados para compor o grupo retocolite ulcerativa (RCU). Também foram selecionados 17 sujeitos submetidos à colonoscopia por outros motivos que não por doença inflamatória intestinal para coleta de biópsias intestinais sem alterações endoscópicas para compor o grupo controle (Grupo CTR).

Tabela 3 – Dados clínicos e demográficos dos pacientes com retocolite ulcerativa e seus respectivos controles incluídos no estudo

Grupo	Controle (CTR)	Retocolite ulcerativa (RCU)	
Número de pacientes	17	22	
Sexo (masculino/feminino)	7/10	5/17	
Idade (mediana – min/máx)	56 anos (35 – 69)	42 anos (27 – 75)	
Tempo de RCU (mediana - min/máx)	----	11 anos (1 – 25)	
Extensão da RCU (proctite/colite esquerda/pancolite)	----	1/6/15	
PCR (mediana - min/máx)	----	0,6 (0,1 – 6)	
Escore de Mayo Global (mediana - min/máx)	----	8,5 (1 – 11)	
Escore de Mayo Endoscópico (0/1/2/3)	----	0/5/3/14	
Medicações	----	Infliximabe	4 pacientes
		Vedolizumabe	4 pacientes
		Tofacitinibe	1 paciente
		Ciclosporina	1 paciente
		Sulfasalazina	2 pacientes
		Mesalazina	4 pacientes
		Azatioprina	7 pacientes
		Corticoesteroide	4 pacientes
		Metotrexato	1 paciente

Fatores de Exclusão

Foram excluídos pacientes que não apresentavam doença inflamatória intestinal, e/ou aqueles que não estavam em atividade de doença, de acordo com escores específicos.

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

O presente projeto foi submetido e aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Unicamp, sob o número CAAE 14872313.0.0000.5404 (Anexo 1), e no Comitê de Ética do Hospital Clinic, sob o número 2012/7956 (Anexo 2). Todos os participantes estavam de acordo com a pesquisa e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de iniciar qualquer procedimento.

3.2 Metodologia

Os pacientes com RCU que apresentavam atividade da doença avaliada por escores endoscópicos, e pacientes sem o diagnóstico de DII (grupo CTR) foram selecionados para coleta de seis biópsias intestinais (de cada paciente) para a presente pesquisa, após a concordância e assinatura do TCLE.

As biópsias foram separadas para o processamento e extração de RNA e produção de cDNA, para análise de expressão gênica por meio da técnica de qPCR, e também para análise de imunohistoquímica e hibridização in situ.

As técnicas de qPCR e imunohistoquímica do grupo de pacientes da Unicamp foram realizadas no Laboratório de Investigação em Doenças Inflamatórias intestinais (LabDII) da Faculdade de Ciências Médicas, e também no Laboratório de Sinalização Celular (LabSinCel) do Instituto de Biologia da Unicamp. A técnica de hibridização in situ e de qPCR do grupo de pacientes do Hospital Clinic foram realizadas no *Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer* (IDIBAPS), em Barcelona, Espanha.

3.2.1 Extração de RNA e produção do cDNA

Foi realizada extração de RNA total a partir das amostras processadas dos pacientes com RCU, e do grupo CTR, segundo método do reagente Trizol (Invitrogen). Para a produção do cDNA, foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA),

3.2.2 PCR quantitativo (qPCR) – Real Time PCR

As reações de PCR quantitativas em tempo real (rt-PCR) foram realizadas com as amostras processadas dos pacientes com RCU, e do grupo CTR, através do sistema TaqMan™ (Applied Biosystems). Para avaliar a ativação dos três principais sensores do ERE os primers utilizados foram: EIF2AK3 (Hs_00178128_m1), ERN1 (Hs_00980095_m1) e ATF6 (Hs_00232586_m1). Para avaliar o perfil inflamatório, bem como os genes relacionados à apoptose e autofagia, os primers utilizados foram: IL-6 (Hs00174131_m1), IL-10 (Hs00961622_m1), IFN- γ (Hs_00989291_m1), IL-1 β (Hs_01555410_m1), IL-23 (Hs_00372324_m1), TNF- α (Hs_00174128_m1), IL-17 (Hs_00174383_m1), Bcl2 (Hs_00608023_m1), Bax (Hs_00180269_m1) e ATG16L1 (Hs_00250520_m1). Para avaliar genes relacionados a UPR e chaperonas, os primers usados foram: ATF3 (Hs_00231069_m1), CALR (Hs_00189032_m1), STC2 (Hs_00175027_m1), DNAJC3 (Hs_00534483_m1), DDIT3 (Hs_90g1). Os níveis de transcrição dos genes alvos foram normalizados usando GAPDH como o gene de controle endógeno. A expressão gênica foi então obtida pelo método delta-delta Ct e foi mostrada em *fold change*.

3.2.3 Imunohistoquímica

Amostras de mucosa intestinal dos grupos RCU e CTR foram fixadas em formol, embebidas em parafina (FFEP), e cortadas a 4 μ m. Após a desparafinização, a recuperação do antígeno foi realizada com solução tampão citrato (pH 6,0) por 20 minutos a 95°C. A peroxidase endógena foi bloqueada com uma solução de peróxido de hidrogênio (3% H₂O₂ 10 volumes), seguida por lavagens em solução salina tamponada com fosfato (PBS, 10mM, pH 7,4). Os anticorpos primários foram diluídos em uma solução de albumina de soro bovino (BSA) a 1% (diluída em PBS) e incubados a 4°C *overnight*. Os anticorpos usados foram: anti-phosphor-[Ser51] eIF2 α (Abcam - ab32157, rabbit monoclonal) diluído 1/50 em BSA, purified anti-Xbp-1 (COOH terminus) (BioLegend – 555483, rabbit polyclonal) diluído 1/50 em BSA, anti-GRP78 (Abcam - ab21685, rabbit policlonal) usado na concentração de 1 μ g/ml, anti-GRP94 (Santa Cruz Biotechnology - sc11402, rabbit policlonal) diluído 1/50 em BSA, e anti-DDIT3 (BioVision - A1674-100), diluído 1/100 em BSA. A detecção do sinal foi determinada com o uso do sistema de detecção de imunoperoxidase (Vector Laboratories), a seguir incubada com solução DAB (Dako). As lâminas foram então

contrastadas com hematoxilina, desidratadas com várias concentrações de álcool e montadas com Mounting Medium (Dako). As fotografias foram tiradas usando o microscópio DFC345FX, Leica, com câmera digital e software LAS V4.12, Leica.

3.2.4 Hibridização in situ (ISH)

A hibridização in situ (ISH) foi realizada usando o RNAscope® 2.5 HD - RED Assay cromogênico e o sistema HybEZ™ Hybridization (Advanced Cell Diagnostics, Hayward, CA, EUA) de acordo com as instruções do fornecedor. Amostras de mucosa FFEP foram cortadas a 4 µm e desparafinizadas por lavagem com xilol e etanol em concentrações absolutas. Os tecidos foram então tratados com solução de peróxido de hidrogênio RNAscope por 10 min em temperatura ambiente, solução de reagentes de recuperação de alvo RNAscope por 15 min a > 99 °C em um vaporizador e RNAscope Protease Plus por 30 min a 40 °C. Os tecidos foram então hibridizados com as sondas de mRNA para ERN1 (497331) e EIF2aK3 (541471) por 2 h a 40°C. Após lavagem com tampão de lavagem, a amplificação do sinal da sonda hibridizada foi obtida pela aplicação em série dos reagentes Amp 1 ao Amp 6. A solução *Fast Red* foi então aplicada por 10 minutos para detectar os RNAs alvo. As seções foram contrastadas com hematoxilina e montadas com EcoMount (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA). O sinal de mRNA ERN1 e EIF2aK3 foi avaliado usando um microscópio Olympus BX51 (Tóquio, Japão) e o software CellF.

3.3. Análise estatística

Para avaliação estatística, foi utilizado o teste t de Student, seguido de análise de significância de tipo Mann-Whitney. Em todos os experimentos o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1 Perfil de citocinas pró-inflamatórias na mucosa do cólon de pacientes com RCU

Primeiramente, para confirmar a sinalização pró-inflamatória na mucosa de cólon de pacientes com RCU, foi avaliada por rt-PCR a expressão de citocinas mais frequentemente moduladas em pacientes com RCU. Para esta análise, foram incluídos 14 pacientes controles e 18 pacientes com RCU.

O grupo RCU apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo controle, dos seguintes transcritos de citocinas pró-inflamatórias: IL1 β , IL6, IL17, IL22, IL23, IFN γ e TNF α . A citocina anti-inflamatória IL-10 também estava significativamente modulada ($p < 0,005$), mostrando uma possível tentativa de resolução da inflamação (Figura 7A).

A Figura 7B mostra um *heatmap* das citocinas inflamatórias em ambos os grupos. Portanto, as respostas imunes tipo 1 (Th1) e 17 (Th17), bem como a resposta inata, estão envolvidas na inflamação intestinal na RCU.

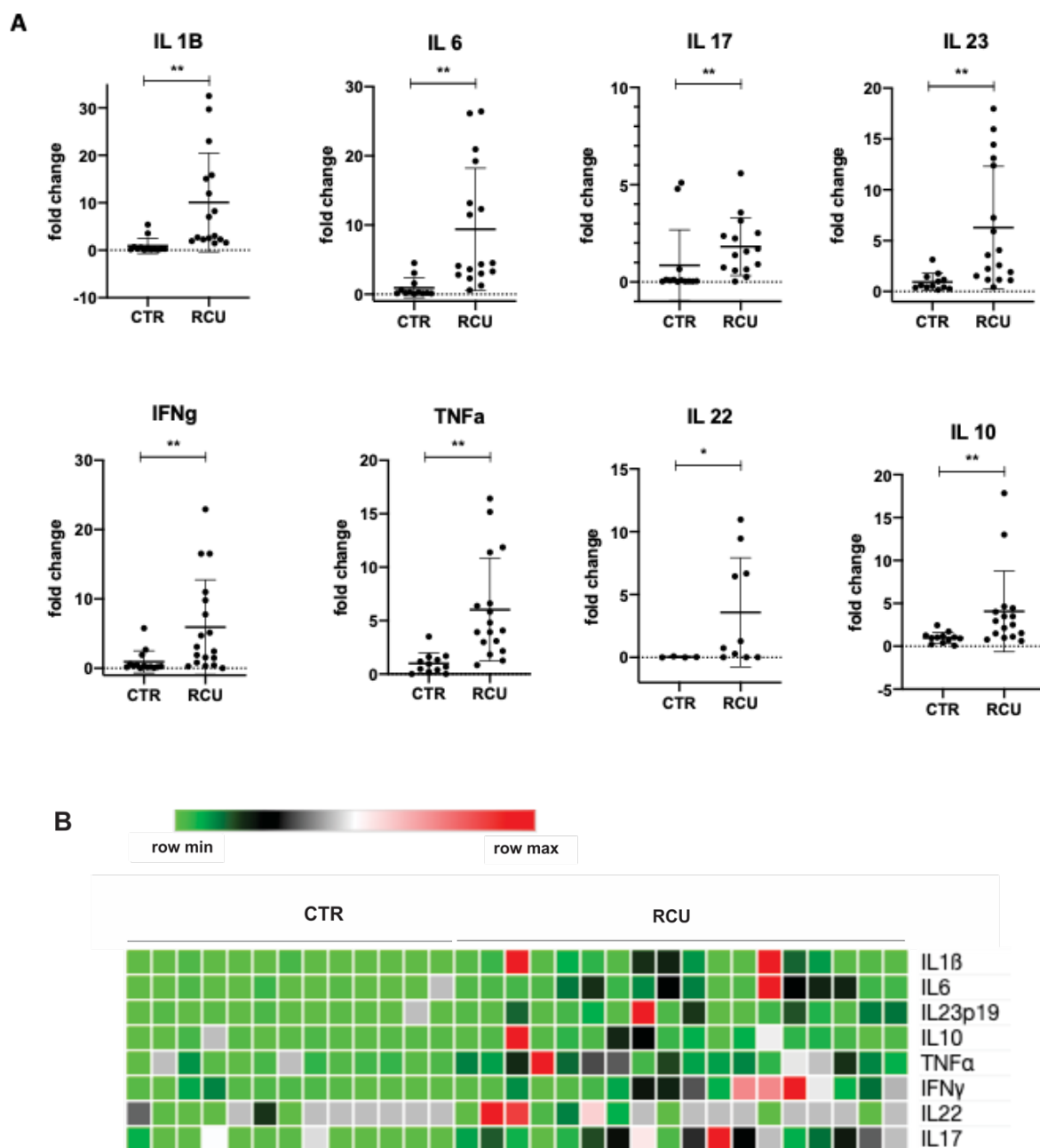


Figura 7 - Análise transcricional de citocinas pró e antiinflamatórias em pacientes com RCU. Os níveis de transcrição das citocinas foram determinados por rt-PCR. (A) Os níveis transcricionais de IL1 β , IL6, IL17, IL22, IL23p19, IFN γ , TNF α e IL10 estão mostrados como *fold change*. (B) *Heatmap* das citocinas inflamatórias. ** $p < 0,005$. CTR = controle, RCU = retocolite ulcerativa

4.2 Caracterização das vias de ativação do ERE

Para investigar quais vias do ERE estavam ativadas em pacientes com RCU, foram incluídos 14 pacientes controles e 18 pacientes com RCU para o rt-PCR, 5 pacientes controles e 8 pacientes com RCU para a análise imunohistoquímica, 3 pacientes controles e 4 pacientes com RCU para a hibridização in situ.

A primeira via do ERE avaliada foi a PERK/eIF2 α . Foi realizada a técnica de rt-PCR para investigar a expressão do gene *EIF2AK3*, responsável pela codificação da proteína da via PERK de ativação. Como resultado, foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) nos pacientes com RCU quando comparados ao grupo controle (Figura 8A).

Além disso, através da técnica de hibridização in situ, foi investigada a localização do mRNA de *EIF2AK3*, bem como, por imunohistoquímica, a expressão da proteína p-eIF2 α . A expressão transcricional de células positivas para *EIF2AK3* foi observada na camada epitelial e na lâmina própria de pacientes controle, porém, um aumento significativo de *EIF2AK3* foi observado nas células da lâmina própria de pacientes com RCU (Figura 8B). A análise de imunohistoquímica revelou marcação de p-eIF2 α na camada epitelial e nas células da lâmina própria de ambos os grupos, porém com uma imunorreatividade mais intensa e estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos pacientes com RCU quando comparados aos controles (Figura 8C e D).

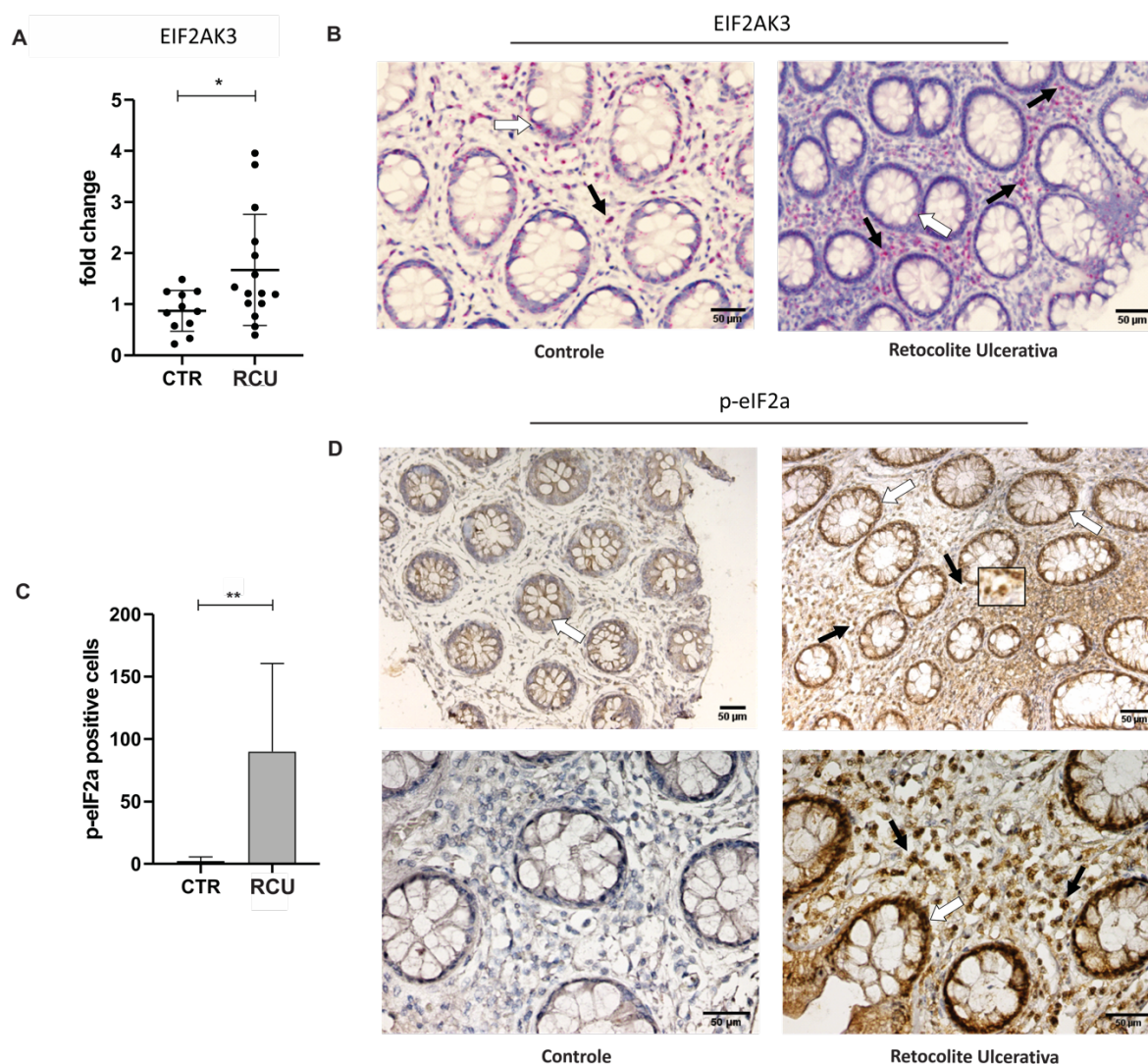


Figura 8 - Ativação da via PERK na mucosa do cólon de pacientes com RCU. (A)

A análise de expressão de *EIF2AK3* foi realizada por rt-PCR. Os níveis transcricionais de *EIF2AK3* são mostrados como *fold change*, * $p < 0,05$. (B) A hibridização in situ da sonda *EIF2AK3* foi realizada em FFEP da mucosa intestinal dos grupos RCU e CTR. As setas indicam células positivas para *EIF2AK3*, que são mostradas como pontos rosa. As setas brancas indicam células epiteliais positivas e as setas pretas indicam células positivas da lâmina própria. Escala utilizada: 50 μ m. (C) Análise quantitativa da análise por imunohistoquímica para p-eIF2 α de ambos os grupos. Para RCU, $n=5$; para CTR, $n=6$; ** $p < 0,005$. (D) A análise de imunohistoquímica de p-eIF2 α foi realizada em lâminas embebidas em parafina da mucosa intestinal de ambos os grupos. As setas indicam células positivas para p-eIF2 α , que são mostradas em marrom. As setas brancas indicam células epiteliais positivas e as setas pretas indicam células positivas da lâmina própria. Escala utilizada: 50 μ m.

A segunda via do ERE avaliada, foi a via IRE1/Xbp-1. Não houve diferença estatística nos níveis de transcrição do gene *ERN1* entre os grupos controle e RCU, conforme determinado por rt-PCR ($p>0,05$) (Figura 9A). No entanto, a técnica de hibridização in situ revelou que o gene *ERN1* estava regulado positivamente na lâmina própria das amostras de RCU (Figura 9B). Uma vez que Xbp-1 é uma proteína expressa na ativação da via IRE1, sua avaliação é considerada uma forma precisa para confirmar se esta via foi de fato ativada ou não. Portanto, foi realizada uma análise de imunohistoquímica utilizando um anticorpo específico que reconhece a variante da proteína Xbp-1 (sXbp-1) para investigar a expressão da proteína correspondente. Assim, foi observada expressão significativamente maior ($p<0,05$) de sXbp-1, principalmente nas células epiteliais do grupo RCU, quando comparadas ao grupo CTR (Figura 9C e D).

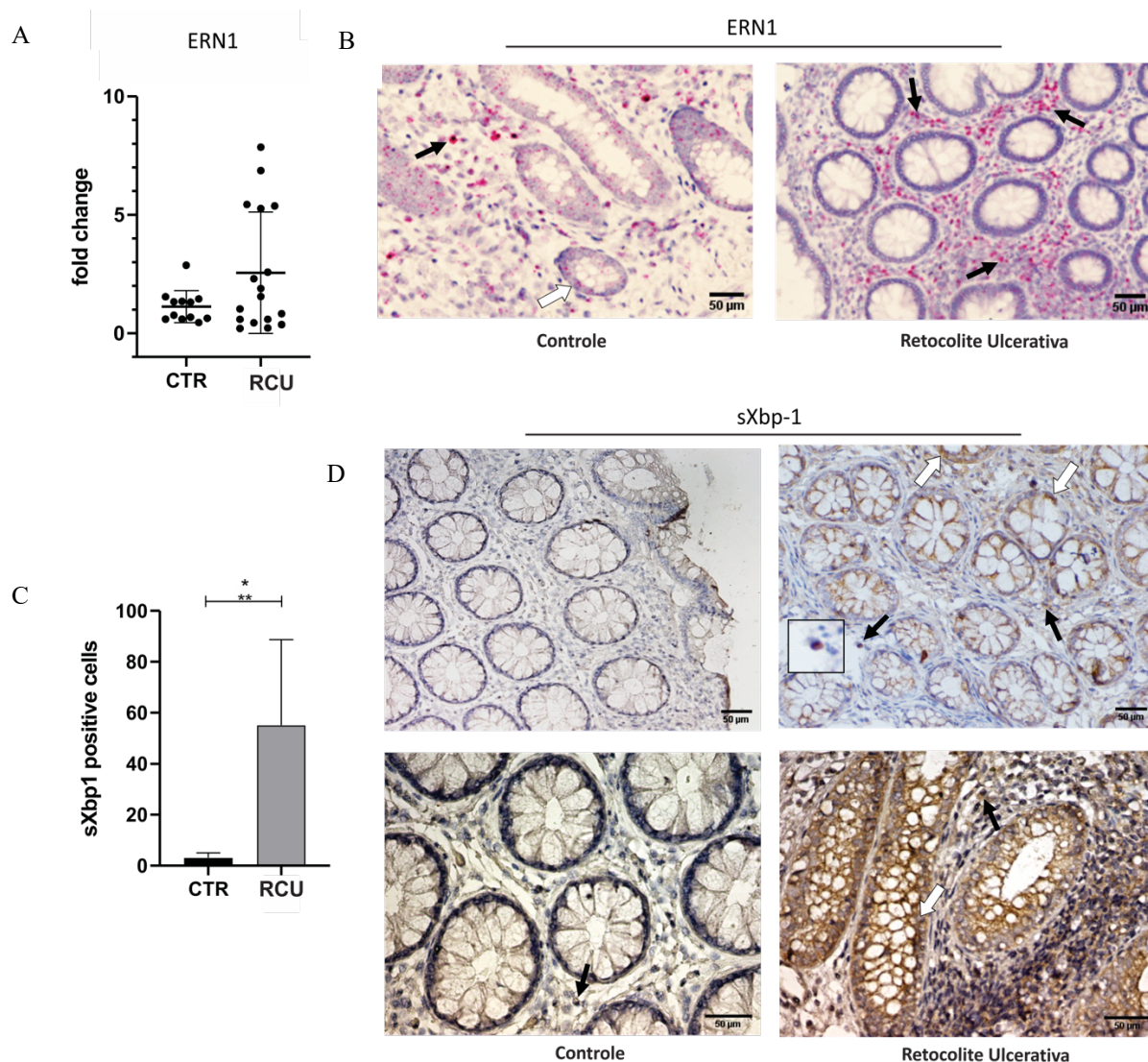


Figura 9 - Ativação da via IRE1 na mucosa do cólon de pacientes com RCU. (A) A análise de expressão de *ERN1* foi realizada por rt-PCR. Os níveis transcricionais de *ERN1* são mostrados como *fold change*, $p > 0,05$. (B) A hibridização in situ da sonda *ERN1* foi realizada em cortes histológicos da mucosa intestinal de ambos os grupos. As setas indicam células *ERN1* positivas, que são mostradas como pontos rosa. As setas brancas indicam células epiteliais positivas e as setas pretas indicam células positivas da lâmina própria. Escala utilizada: 50 μ m. (C) Análise quantitativa da coloração imunohistoquímica para sXbp-1 de ambos os grupos. Para RCU, $n=4$; para CTR, $n=6$; $**p < 0,005$. (D) A análise de imunohistoquímica para sXbp-1 foi realizada em cortes histológicos da mucosa intestinal de ambos os grupos. As setas indicam células positivas para sXbp-1, que são mostradas em marrom. As setas brancas indicam células epiteliais positivas e as setas pretas indicam células positivas da lâmina própria. Escala utilizada: 50 μ m.

A via ATF6 foi a última via do ERE avaliada. Os níveis transcricionais do *ATF6* não apresentaram diferenças significativas entre os grupos RCU e CTR ($p>0,05$) e verificou-se pouca variabilidade dos níveis transcricionais entre os pacientes (Figura 10).

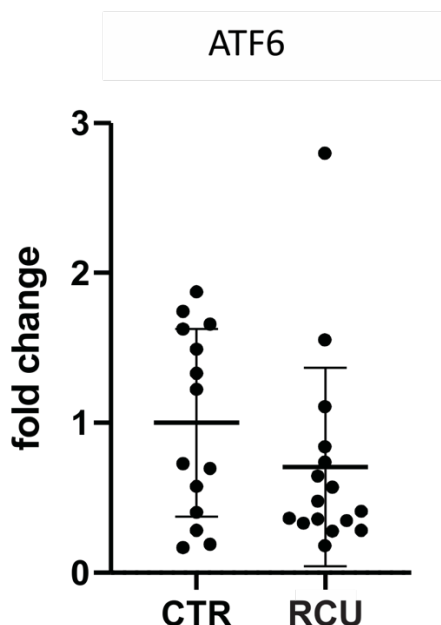


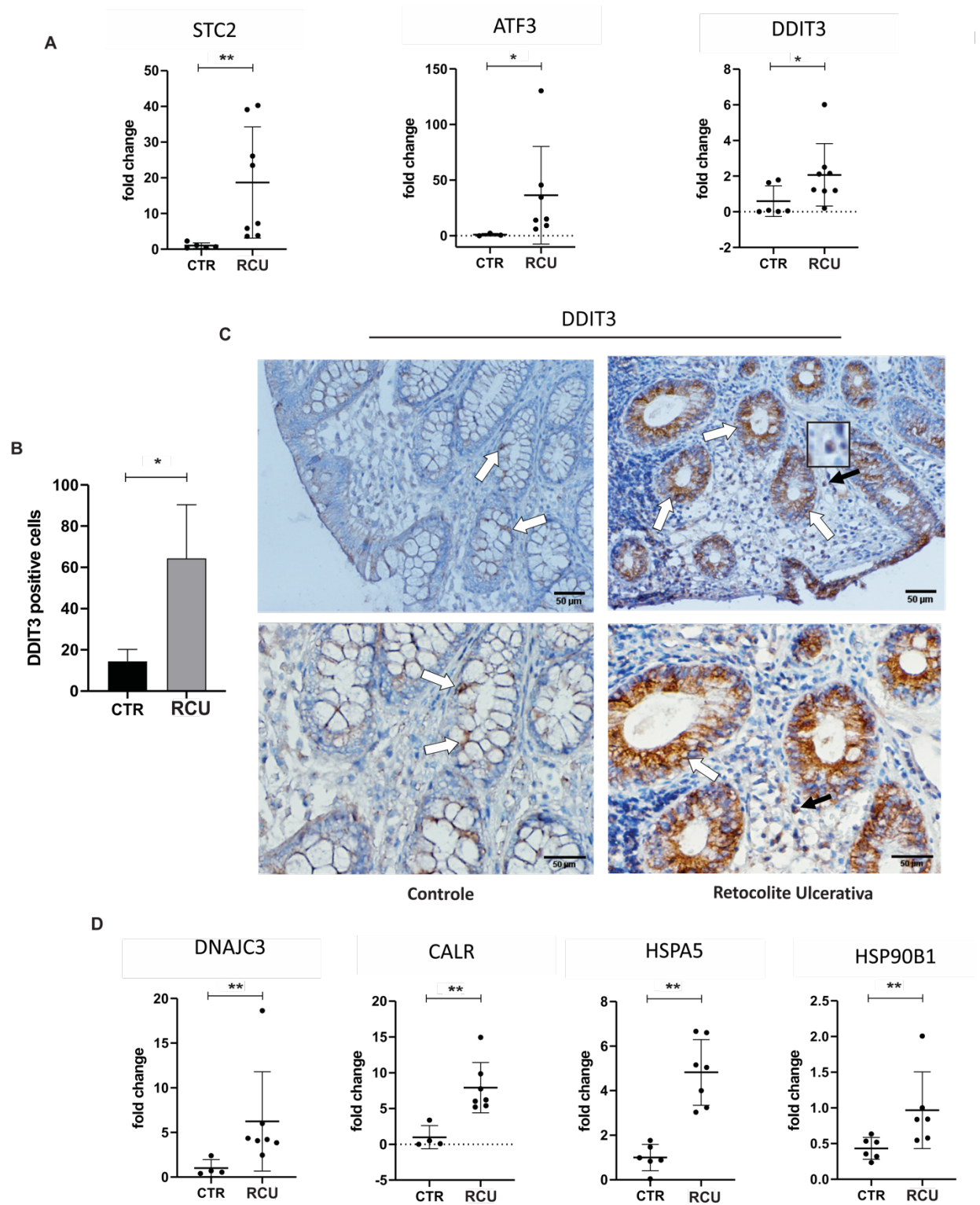
Figura 10 - A análise transcricional de ATF6 em pacientes com RCU. Os níveis transcricionais de *ATF6* são apresentados como *fold change*. CTR = controle, RCU = retocolite ulcerativa.

4.3 Avaliação de chaperonas e genes responsivos à ativação de UPR

A regulação de genes relacionados com a UPR é desencadeada pela ativação do ERE. Portanto, foi realizada uma análise transcricional destes genes em amostras de mucosa de colón de pacientes com RCU e controle. Foi observado um aumento significativo do gene que codifica a proteína reguladora de cálcio estaniocalcina-2 (*STC2*) ($p<0,005$), do fator de transcrição-3 (*ATF3*) ($p<0,05$) e do fator de transcrição induzido por dano no DNA (*DDIT3*) ($p<0,05$) (Figura 11A). Além disso, foi observado, em lâminas de imunohistoquímica, uma imunorreatividade para a proteína *DDIT3* nas células epiteliais do cólon de pacientes com RCU (Figura 11B e C), corroborando os achados transcricionais do *DDIT3*.

A ativação de UPR também pode aumentar a produção de chaperonas para resolver o acúmulo de proteínas malformadas no RE. Portanto, foi avaliado, por meio

de técnicas de rt-PCR e imunohistoquímica, se a produção de chaperonas está modulada em biópsias intestinais de pacientes com RCU. A análise transcricional mostrou que os pacientes com RCU apresentaram um aumento significativo ($p < 0,005$) nos níveis transcricionais de genes da família de proteínas de choque térmico DnaJ (DNAJC3) que codifica a co-chaperona DNAJC3, do gene CALR, que codifica a chaperona calreticulina, do gene *HSPA5*, que codifica a proteína GRP78/BiP e do gene *HSP90B1*, que codifica a chaperona GRP94 (Figura 11D). Além disso, a lâmina própria e as células epiteliais da mucosa intestinal no grupo RCU mostraram uma imunorreatividade significativamente maior para GRP78 (Figura 11E e G) e GRP94 (Figura 11F e H) em comparação com o grupo controle, confirmando os resultados transcricionais.



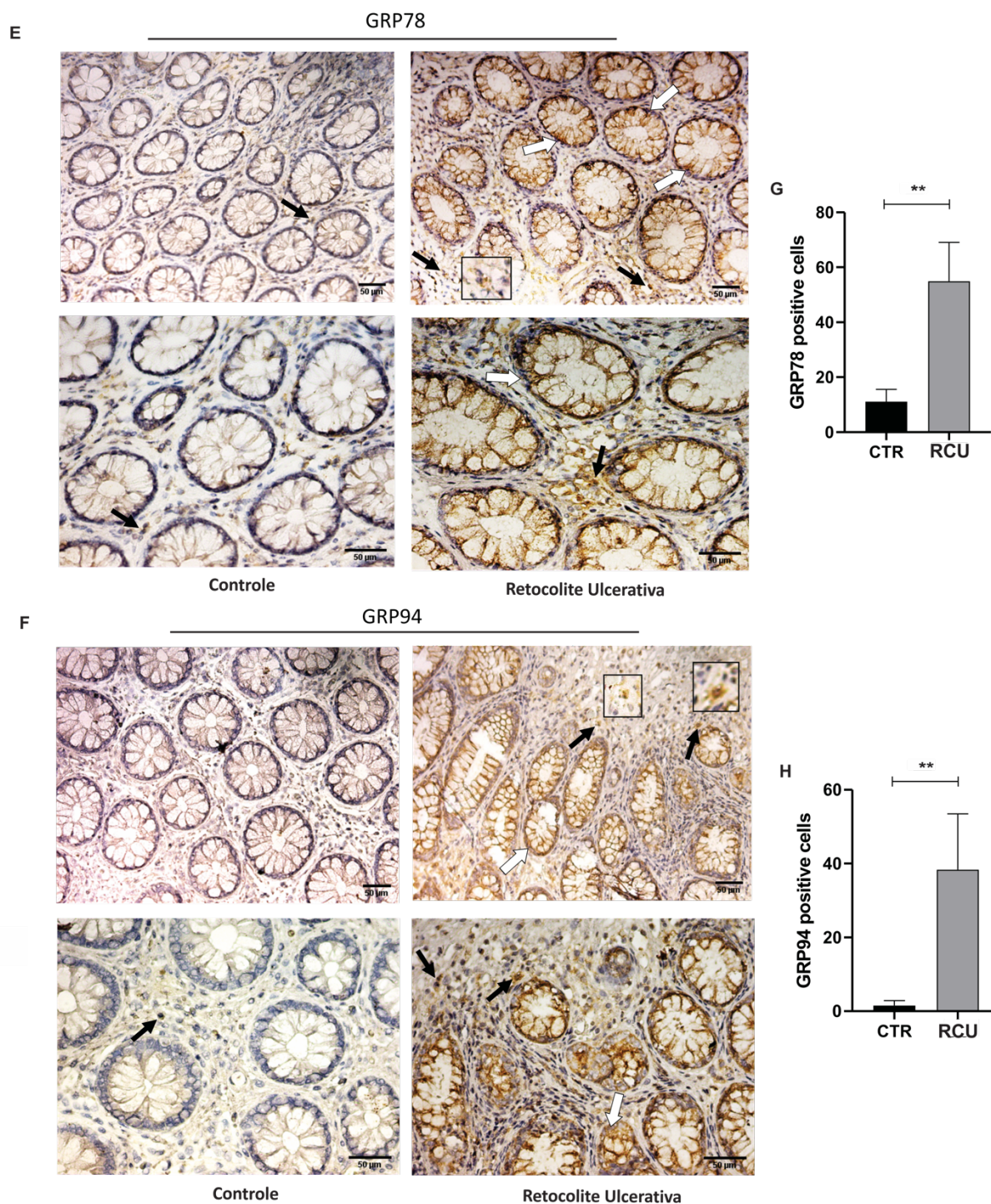


Figura 11 - Ativação de genes responsivos a UPR e modulação de chaperonas.

(A) Os níveis transcricionais de *STC2*, *ATF3* e *DDIT3* são mostrados como *fold change* * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$. (B) A análise de imunohistoquímica de *DDIT3* foi realizada em lâminas embebidas em parafina da mucosa intestinal de ambos os grupos RCU e CTR. As setas indicam células *DDIT3* positivas, que são mostradas em marrom. As setas brancas indicam células epiteliais positivas e as setas pretas indicam células positivas da lâmina própria. Escala utilizada: 50 μm . (C) Análise quantitativa da

coloração imunohistoquímica para DDIT3 de ambos os grupos. Para RCU, n=6; para CTR, n=3; *p<0,05. (D) Os níveis de transcrição das chaperonas *DNAJC3*, *CALR*, *HSPA5* e *HSP90B1* são mostrados como *fold change*, **p<0,005. (E-F) A análise imunohistoquímica de GRP78 e GRP94 foi realizada em lâminas embebidas em parafina da mucosa intestinal de ambos os grupos. As setas indicam células positivas GRP78 e GRP94, que são mostradas em marrom. As setas brancas indicam células epiteliais positivas e as setas pretas indicam células positivas da lâmina própria. Escala utilizada: 50 µm. (G-H) Análise quantitativa da coloração imunohistoquímica para GRP78 e GRP94 de ambos os grupos. (G) Para RCU, n=8; para CTR, n=5; **p<0,005. (H) Para RCU, n=6; para CTR, n=4; **p<0,005. CTR = controle, RCU= retocolite ulcerativa.

4.4 Análise transcricional de apoptose e genes relacionados à autofagia em pacientes com RCU

Como a apoptose pode ocorrer como resultado de inflamação e/ou da ativação do ERE, também foram avaliados os níveis transcricionais de genes pró e anti-apoptóticos. O gene *BAX* estava significativamente aumentado em pacientes com RCU em comparação com os controles (p<0,05), enquanto que *BCL-2* não apresentou modulação entre os grupos (Figura 12A). Além disso, também foi avaliado se há modulação da autofagia em biópsias de pacientes com RCU. A análise de rt-PCR mostrou que *ATG16L1* estava significativamente maior em pacientes com RCU em comparação com o grupo CTR (p<0,05) (Figura 12A). Esses achados reforçam que o ERE está ativado em pacientes com RCU, e mecanismos como autofagia e apoptose são tentativas de contrabalançar o dano ao tecido. A Figura 12B ilustra os resultados deste estudo.

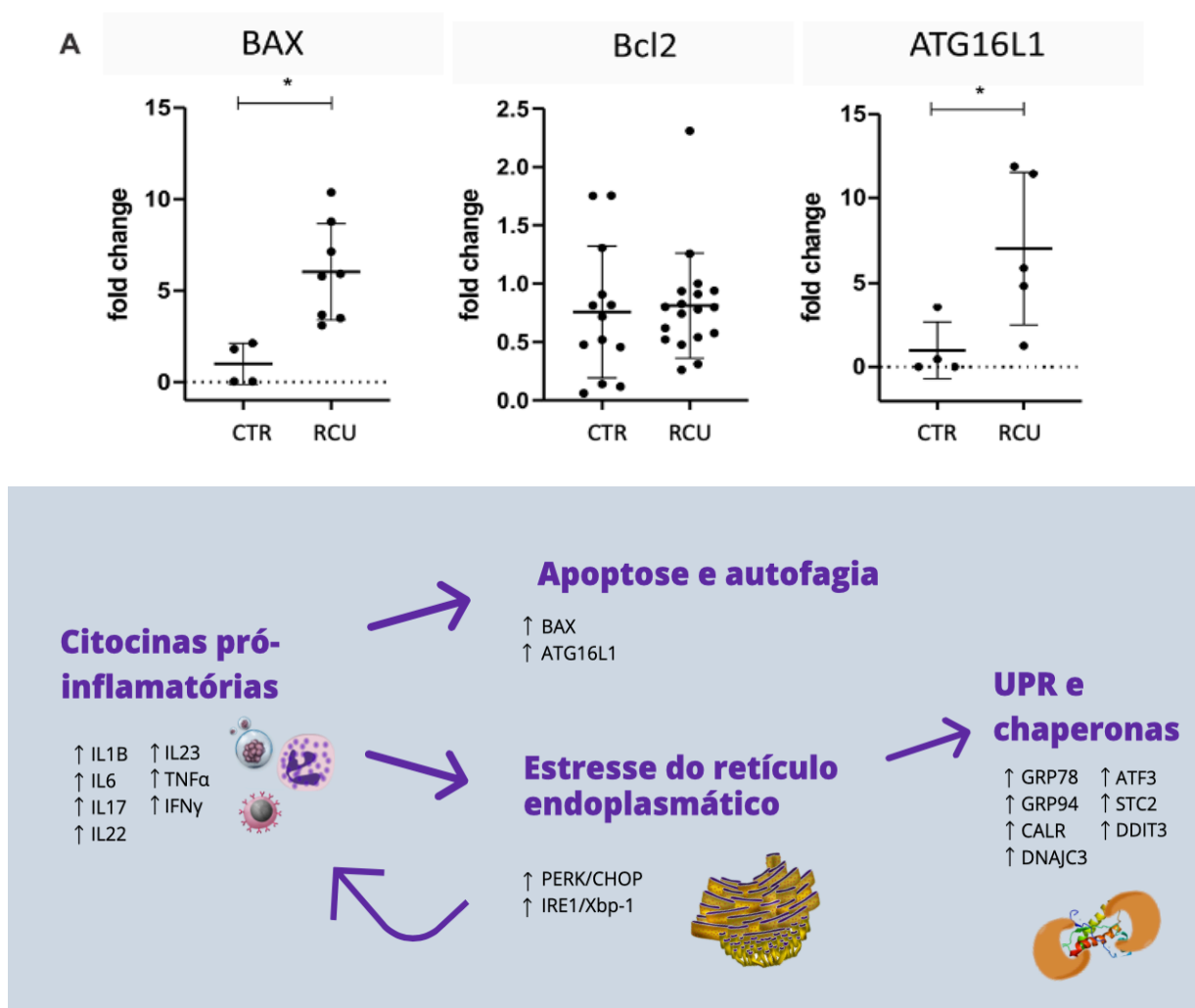


Figura 12 - Apoptose e autofagia estão modulados em pacientes com RCU. (A) Os níveis transcricionais de *BAX*, *BCL2* e *ATG16L1*, conforme determinado por rt-PCR, são mostrados como *fold change* * $p < 0,05$. RCU = retocolite ulcerativa; CTR = controle. (B) Ilustração dos resultados mostrando alterações nas vias que envolvem marcadores de inflamação, ERE, autofagia e apoptose em pacientes com retocolite ulcerativa.

5. Discussão

A ativação do ERE e da UPR têm sido associados a vias inflamatórias em várias doenças, como doenças autoimunes e infecciosas (Cao et al., 2013a). O retículo endoplasmático (RE) é uma importante organela responsável pela homeostase intestinal e seu estresse e a UPR são essenciais para proteger as células intestinais de infecções, por exemplo. Em um modelo experimental utilizando camundongos que não são capazes de fosforilar a proteína eIF2 α (via PERK), Cao e colaboradores demonstraram um aumento da suscetibilidade à infecção por *Salmonella Typhimurium* e também à colite induzida por sulfato de dextran e sódio (Cao et al., 2014). Com relação às DII, embora o mecanismo molecular que desencadeia a ativação do ERE nessas doenças não seja completamente compreendido, vários estudos têm relatado o ERE como um componente relevante na manutenção da doença (Cao et al., 2013a; Coope et al., 2019; Rees et al., 2020). A maioria dos estudos experimentais usando enteróides e animais com colite induzida tem sugerido que as células epiteliais intestinais (CEI) são o principal tipo de célula onde o ERE é ativado (Chotikatum et al., 2018; Heazlewood et al., 2008; Rees et al., 2020; Zhang et al., 2020). Os resultados do presente estudo apontam para este achado, e nossas imagens de hibridização in situ e imunohistoquímica mostraram que, além da marcação positiva nas CEI, também há ativação do ERE em células da lâmina própria de pacientes com RCU.

Existem poucos estudos que avaliaram o ERE em DII usando amostras humanas coletadas por colonoscopia. Tréton e colaboradores relataram que as vias IRE1 e ATF6, mas não a via PERK, estavam ativadas em pacientes com RCU (Tréton et al., 2011). Esses achados, diferentes em relação aos nossos resultados, podem ser devidos ao fato de que, no estudo por Tréton, foi avaliado mucosa intestinal não inflamada, e a ocorrência da inflamação na própria RCU pode ativar e exacerbar o ERE, que, por sua vez, leva à exacerbação das vias inflamatórias por meio da ativação do NF- κ B. A via PERK ativa a expressão do fator de transcrição ATF4, um indutor de DDIT3/CHOP, que, por sua vez, é responsável por induzir a apoptose após ativação de ERE (Han et al., 2013). Em nosso estudo, observamos que a via PERK está ativada nos pacientes com RCU, e não em pacientes controles. Essa ativação contribuiu para o aumento da expressão de DDIT3 nas CEI de pacientes com RCU. Um estudo publicado por Lin e colaboradores (Lin et al., 2009) mostrou que uma atividade prolongada de PERK contribui para a indução da morte celular. Esses resultados,

juntamente com os nossos de RCU, sugerem que essas células ativam a apoptose para restaurar a homeostase. Além da via DDIT3, observamos aumento da transcrição de BAX, um gene pró-apoptótico, em pacientes com RCU.

Em um trabalho recém publicado pelo nosso grupo foi avaliado a ocorrência de ERE em amostras de cólon e do tecido adiposo mesenterial (TAM) em pacientes com DC (Coope et al., 2019). A mucosa intestinal de pacientes com DC mostrou um aumento significativo da expressão de genes relacionados ao ERE e à UPR, incluindo *ATF3*, *DNAJC3*, *STC2*, *DDIT3*, *CALR*, *HSPA5* e *HSP90B1*. Os resultados mostraram que o gene *EIF2AK3* estava regulado positivamente, juntamente com o aumento da expressão da proteína de p-eIF2 α e razão p-eIF2 α /eIF2 α . Além disso, a expressão do gene *ERN1* estava regulada positivamente, juntamente com um aumento da proteína sXBP1 da forma *spliced*/ativada. Apesar do aumento da expressão do gene *ATF6*, não foram encontradas diferenças na expressão da proteína ATF6.

Embora não tenha sido observado, no presente estudo, uma modulação transcricional do gene *ERN1* por rt-PCR no grupo RCU, imagens de hibridização in situ e imunohistoquímica mostraram a presença de mRNA de *ERN1* e sXbp-1, respectivamente, em amostras intestinais de pacientes com RCU. Quando a UPR é iniciada, todas as três vias são ativadas ao mesmo tempo. No entanto, a duração da ativação varia com o tempo. Lin e colaboradores confirmaram, em estudo in vitro, que as respostas IRE1 e ATF6 se atenuam e a via PERK permanece ativada enquanto a condição de estresse persiste (Lin et al., 2007). Embora não seja claro o momento exato na evolução da doença quando ocorre essa mudança na modulação da UPR, os pacientes com RCU incluídos em nosso estudo, além de apresentarem atividade da doença no momento da inclusão de acordo com escores endoscópicos de atividade da doença, apresentavam um tempo de doença prolongado (> 10 anos para RCU), caracterizado por inflamação crônica. A ausência de modulação transcricional de *ATF6*, a superprodução de citocinas e o longo período de atividade das doenças sugerem que essa via pode ser atenuada, enquanto PERK e IRE1 persistem como um destino celular que conduz à apoptose.

Tanto a ativação do ERE quanto suas tentativas de resolução são mediadas pelas proteínas de choque térmico (GRP) -78 e -94, que atuam como chaperonas, auxiliando no restabelecimento da homeostase do RE (Zhu and Lee, 2015). Em condições fisiológicas, todas as três vias inativas de ERE estão ligadas à GRP78, também chamada de proteína de imunoglobulina de ligação (BiP). Quando

há o acúmulo de proteínas mal dobradas, o GRP78 se dissocia dos domínios luminais de todas as três vias do ERE, ativando a UPR (Zhu and Lee, 2015). Durante a UPR, a GRP78 também é útil para conduzir as proteínas mal formadas à degradação via ERAD (Ma and Hendershot, 2004). Embora o papel da GRP94 seja mais conhecido como um mediador da resposta imune relacionada ao ERE (Yang et al., 2007), ele também auxilia no enovelamento da proteína e direciona a proteína malformada para a via ERAD (Marzec et al., 2012). No presente estudo, foi avaliado se esses mediadores da UPR estavam ativados, e foi observado que tanto os genes *HSP90B1* quanto o *HSPA5*, responsáveis por codificarem GRP18 e GRP94 respectivamente, estão modulados e expressos pelas células epiteliais e da lâmina própria no grupo RCU. A iniciação da UPR induz a produção de genes inflamatórios por meio da ativação do NF- κ B (Todd et al., 2008). De fato, foram observados altos níveis de transcrição de citocinas pró-inflamatórias em amostras de cólon de RCU. Esses resultados estão de acordo com o perfil pró-inflamatório característico visto nesses pacientes (Tatiya-aphiradee et al., 2018). Também foram observados que os transcritos de IL17 e IL22 estão regulados em pacientes com RCU. Isso corrobora com um estudo recente publicado por Powel e colaboradores que mostrou que IL17 e IL22 promovem ERE e levam as CEI à apoptose in vitro. Os autores também mostraram que o bloqueio dessas citocinas in vivo reduz a ativação do ERE nas células epiteliais do cólon (Powell et al., 2020).

Um dos principais sistemas de degradação de proteínas é o processo de autofagia, que é ativado para manter a homeostase celular após uma condição de estresse (Mizushima, 2007). Um estudo GWAS realizado em 2006 identificou o *ATG16L1* como um gene relacionado à autofagia para suscetibilidade de desenvolver DC (Hampe et al., 2007). Desde então, estudos relatam que *ATG16L1* está associado à DC, mas não à RCU (Rigoli, 2014). Foi observado no presente estudo, por rt-PCR, um aumento significativo na expressão de *ATG16L1* no grupo RCU, sugerindo que não há deficiência de autofagia em pacientes com RCU. Este resultado corrobora vários outros que sugeriram que a ativação do ERE induz o início da autofagia (Fouillet et al., 2012; Ghavami et al., 2012; Kishino et al., 2017; Vidal and Hetz, 2012).

Desta forma, o presente estudo identificou que duas das três vias de ativação do ERE (PERK e IRE1) foram ativadas na mucosa do cólon de pacientes com RCU ativa. Tais achados sugerem que o ERE pode contribuir para a manutenção da inflamação neste tecido. O aumento de marcadores de apoptose e autofagia

reforça que a UPR não é suficiente para controlar a inflamação e o dano tecidual em pacientes com RCU, sendo incapaz de restaurar a homeostase, induzindo assim a célula à apoptose. Essas descobertas vislumbram novos alvos moleculares com potenciais implicações terapêuticas no futuro.

6. Conclusão

Por meio deste estudo multicêntrico, concluímos que:

- Houve aumento dos níveis transcricionais de citocinas pró-inflamatórias na mucosa colônica de pacientes com RCU.
- Observou-se a ativação do ERE em biópsia intestinal de pacientes com RCU em fase ativa, por meio do aumento significativo de transcritos relacionados às vias PERK e IRE1, e de genes responsivos à UPR em biópsias de mucosa intestinal de pacientes com RCU.
- Não houve evidência de ativação do ERE por meio da via ATF6.
- A imunohistoquímica e hibridização in situ complementaram os achados transcricionais.

7. Referências bibliográficas

- Abraham, C., Dulai, P.S., Vermeire, S., Sandborn, W.J., 2017. Lessons Learned From Trials Targeting Cytokine Pathways in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 152, 374–388.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.018>
- Adams, C.J., Kopp, M.C., Larburu, N., Nowak, P.R., Ali, M.M.U., 2019. Structure and Molecular Mechanism of ER Stress Signaling by the Unfolded Protein Response Signal Activator IRE1. *Front. Mol. Biosci.* 6, 11. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00011>
- Alper, A., Zhang, L., Pashankar, D.S., 2017. Correlation of Erythrocyte Sedimentation Rate and C-Reactive Protein With Pediatric Inflammatory Bowel Disease Activity. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 65, e25–e27. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001444>
- Ananthakrishnan, A.N., Shi, H.Y., Tang, W., Law, C.C.Y., Sung, J.J.Y., Chan, F.K.L., Ng, S.C., 2016. Systematic Review and Meta-analysis: Phenotype and Clinical Outcomes of Older-onset Inflammatory Bowel Disease. *ECCOJC* 10, 1224–1236. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjw054>
- Andersson, R.E., Ekbo, A., 2001. Appendectomy and Protection against Ulcerative Colitis. *The New England Journal of Medicine* 7.
- Annese, V., Daperno, M., Rutter, M.D., Amiot, A., Bossuyt, P., East, J., Ferrante, M., Götz, M., Katsanos, K.H., Kießlich, R., Ordás, I., Repici, A., Rosa, B., Sebastian, S., Kucharzik, T., Eliakim, R., 2013. European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis* 7, 982–1018. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.09.016>
- Aratari, A., Papi, C., Clemente, V., Moretti, A., Luchetti, R., Koch, M., Capurso, L., Caprilli, R., 2008. Colectomy rate in acute severe ulcerative colitis in the infliximab era. *Digestive and Liver Disease* 40, 821–826. <https://doi.org/10.1016/j.dld.2008.03.014>
- Autenrieth, D.M., Baumgart, D.C., 2012. Toxic megacolon: Inflammatory Bowel Diseases 18, 584–591. <https://doi.org/10.1002/ibd.21847>
- Bakke, D., Sun, J., 2018. Ancient Nuclear Receptor VDR With New Functions: Microbiome and Inflammation. *Inflammatory Bowel Diseases* 24, 1149–1154. <https://doi.org/10.1093/ibd/izy092>
- Ben-Horin, S., Chowers, Y., 2014. Tailoring anti-TNF therapy in IBD: drug levels and disease activity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11, 243–255. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.253>
- Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J.H., West, A.B., Ron, D., 2001. Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice. *J. Clin. Invest.* 107, 585–593. <https://doi.org/10.1172/JCI11476>

Boland, B.S., Sandborn, W.J., Chang, J.T., 2014. Update on Janus Kinase Antagonists in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Clinics of North America* 43, 603–617. <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2014.05.011>

Boschetti, G., Garnero, P., Moussata, D., Cuerq, C., Préaudat, C., Duclaux-Loras, R., Mialon, A., Draï, J., Flourié, B., Nancey, S., 2015. Accuracies of Serum and Fecal S100 Proteins (Calprotectin and Calgranulin C) to Predict the Response to TNF Antagonists in Patients with Crohn's Disease: *Inflammatory Bowel Diseases* 21, 331–336. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000273>

Brant, S.R., 2011. Update on the heritability of inflammatory bowel disease: The importance of twin studies: *Inflammatory Bowel Diseases* 17, 1–5. <https://doi.org/10.1002/ibd.21385>

Brenner, D., Mak, T.W., 2009. Mitochondrial cell death effectors. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 871–877. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.004>

Bressler, B., Marshall, J.K., Bernstein, C.N., Bitton, A., Jones, J., Leontiadis, G.I., Panaccione, R., Steinhart, A.H., Tse, F., Feagan, B., Afif, W., Bernard, E.-J., Borgaonkar, M., Devlin, S., Fedorak, R., Nguyen, G.C., Penner, R., Peyrin-Biroulet, L., Reinisch, W., Seow, C.H., Sy, R., Targownik, L., Thomson, P., Van Assche, G., Williams, C., 2015. Clinical Practice Guidelines for the Medical Management of Nonhospitalized Ulcerative Colitis: The Toronto Consensus. *Gastroenterology* 148, 1035–1058.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.03.001>

Brotherton, C.S., Martin, C.A., Long, M.D., Kappelman, M.D., Sandler, R.S., 2016. Avoidance of Fiber Is Associated With Greater Risk of Crohn's Disease Flare in a 6-Month Period. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 14, 1130–1136. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2015.12.029>

Burisch, J., Jess, T., Martinato, M., Lakatos, P.L., 2013. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *Journal of Crohn's and Colitis* 7, 322–337. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2013.01.010>

Butter, M., Weiler, S., Biedermann, L., Scharl, M., Rogler, G., Bischoff-Ferrari, H.A., Misselwitz, B., 2018. Clinical manifestations, pathophysiology, treatment and outcome of inflammatory bowel diseases in older people. *Maturitas* 110, 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2018.01.015>

Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J.H., Hubbard, S.R., Harding, H.P., Clark, S.G., Ron, D., 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* 415, 92–96. <https://doi.org/10.1038/415092a>

Cao, S.S., 2015. Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Inflammatory Bowel Disease: *Inflammatory Bowel Diseases* 21, 636–644. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000238>

Cao, S.S., Wang, M., Harrington, J.C., Chuang, B.-M., Eckmann, L., Kaufman, R.J., 2014. Phosphorylation of eIF2 α Is Dispensable for Differentiation but Required at a Posttranscriptional Level for Paneth Cell Function and Intestinal Homeostasis in Mice: Inflammatory Bowel Diseases 20, 712–722. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000010>

Cao, S.S., Zimmermann, E.M., Chuang, B., Song, B., Nwokoye, A., Wilkinson, J.E., Eaton, K.A., Kaufman, R.J., 2013a. The Unfolded Protein Response and Chemical Chaperones Reduce Protein Misfolding and Colitis in Mice. *Gastroenterology* 144, 989–1000.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.023>

Cao, S.S., Zimmermann, E.M., Chuang, B.M., Song, B., Nwokoye, A., Wilkinson, J.E., Eaton, K.A., Kaufman, R.J., 2013b. The unfolded protein response and chemical chaperones reduce protein misfolding and colitis in mice. *Gastroenterology* 144, 989–1000.e6. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.01.023>

Carter, M.J., 2004. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut* 53, v1–v16. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.043372>

Chambers, J.E., Dalton, L.E., Clarke, H.J., Malzer, E., Dominicus, C.S., Patel, V., Moorhead, G., Ron, D., Marciniak, S.J., 2015. Actin dynamics tune the integrated stress response by regulating eukaryotic initiation factor 2 α dephosphorylation. *eLife* 4, e04872. <https://doi.org/10.7554/eLife.04872>

Charpentier, C., Salleron, J., Savoye, G., Fumery, M., Merle, V., Laberrenne, J.-E., Vasseur, F., Dupas, J.-L., Cortot, A., Dauchet, L., Peyrin-Biroulet, L., Lerebours, E., Colombel, J.-F., Gower-Rousseau, C., 2014. Natural history of elderly-onset inflammatory bowel disease: a population-based cohort study. *Gut* 63, 423–432. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-303864>

Chen, Y.-L., Hsu, C.-W., Cheng, C.-C., Yiang, G.-T., Lin, C.-S., Lin, C.-L., Sung, F.-C., Liang, J.-A., 2017. Increased subsequent risk of inflammatory bowel disease association in patients with chronic pancreatitis: a nationwide population-based cohort study. *Current Medical Research and Opinion* 33, 1077–1082. <https://doi.org/10.1080/03007995.2017.1300143>

Chotikatum, S., Naim, H.Y., El-Najjar, N., 2018. Inflammation induced ER stress affects absorptive intestinal epithelial cells function and integrity. *International Immunopharmacology* 55, 336–344. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.12.016>

Clark, J.D., Flanagan, M.E., Telliez, J.-B., 2014. Discovery and Development of Janus Kinase (JAK) Inhibitors for Inflammatory Diseases: Miniperspective. *J. Med. Chem.* 57, 5023–5038. <https://doi.org/10.1021/jm401490p>

Cohen, G.M., 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochemical Journal* 326, 1–16. <https://doi.org/10.1042/bj3260001>

Colman, R.J., Rubin, D.T., 2016. Histological inflammation increases the risk of

colorectal neoplasia in ulcerative colitis: a systematic review. *Intest Res* 14, 202. <https://doi.org/10.5217/ir.2016.14.3.202>

Colombel, J.F., Rutgeerts, P., Reinisch, W., Esser, D., Wang, Y., Lang, Y., Marano, C.W., Strauss, R., Oddens, B.J., Feagan, B.G., Hanauer, S.B., Lichtenstein, G.R., Present, D., Sands, B.E., Sandborn, W.J., 2011. Early Mucosal Healing With Infliximab Is Associated With Improved Long-term Clinical Outcomes in Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 141, 1194–1201. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.06.054>

Connolly, M.P., Poole, C.D., Currie, C.J., Marteau, P., Nielsen, S.K., 2009. Quality of Life Improvements Attributed to Combination Therapy with Oral and Topical Mesalazine in Mild-to-Moderately Active Ulcerative Colitis. *Digestion* 80, 241–246. <https://doi.org/10.1159/000235916>

Conrad, K., Roggenbuck, D., Laass, M.W., 2014. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. *Autoimmunity Reviews* 13, 463–466. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.028>

Coope, A., Pascoal, L.B., Botezelli, J.D., da Silva, F.A.R., Ayrizono, M. de L.S., Rodrigues, B.L., Milanski, M., Carvalho, R.B., Fagundes, J.J., Velloso, L.A., Leal, R.F., 2019. ER stress activation in the intestinal mucosa but not in mesenteric adipose tissue is associated with inflammation in Crohn's disease patients. *PLoS ONE* 14, e0223105. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0223105>

Corte, C., Fernandopulle, N., Catuneanu, A.M., Burger, D., Cesarini, M., White, L., Keshav, S., Travis, S., 2015. Association Between the Ulcerative Colitis Endoscopic Index of Severity (UCEIS) and Outcomes in Acute Severe Ulcerative Colitis. *Journal of Crohn's and Colitis* 9, 376–381. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv047>

Cory, S., Adams, J.M., 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647–656. <https://doi.org/10.1038/nrc883>

Cosnes, J., 2008. What is the link between the use of tobacco and IBD?: Inflammatory Bowel Diseases 14, S14–S15. <https://doi.org/10.1002/ibd.20555>

Cosnes, J., Gower-Rousseau, C., Seksik, P., Cortot, A., 2011. Epidemiology and Natural History of Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 140, 1785–1794.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.01.055>

Costa, F., 2005. Calprotectin is a stronger predictive marker of relapse in ulcerative colitis than in Crohn's disease. *Gut* 54, 364–368. <https://doi.org/10.1136/gut.2004.043406>

Cox, J.S., Shamu, C.E., Walter, P., 1993. Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* 73, 1197–1206. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90648-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90648-A)

Damas, O.M., Jahann, D.A., Reznik, R., McCauley, J.L., Tamariz, L., Deshpande, A.R., Abreu, M.T., Sussman, D.A., 2013. Phenotypic Manifestations of Inflammatory Bowel Disease Differ Between Hispanics and Non-Hispanic Whites: Results of a Large Cohort Study. *American Journal of Gastroenterology* 108, 231–239. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.393>

Danese, S., 2013. Golimumab in ulcerative colitis: a “ménage à trois” of drugs. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 10, 511–512. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.142>

Danese, S., Fiocchi, C., 2011. Ulcerative Colitis. *The New England Journal of Medicine* 13.

D’Arcy, M.S., 2019. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int* 43, 582–592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>

Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., Colombel, J.-F., 2004. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn’s disease. *Gastroenterology* 127, 412–421. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.061>

Dave, M., Higgins, P.D., Middha, S., Rioux, K.P., 2012. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Translational Research* 160, 246–257. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.05.003>

de Bie, C.I., Buderus, S., Sandhu, B.K., de Ridder, L., Paerregaard, A., Veres, G., Dias, J.A., Escher, J.C., 2012. Diagnostic Workup of Paediatric Patients With Inflammatory Bowel Disease in Europe: Results of a 5-Year Audit of the EUROKIDS Registry. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition* 54, 374–380. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e318231d984>

de Mattos, B.R.R., Garcia, M.P.G., Nogueira, J.B., Paiatto, L.N., Albuquerque, C.G., Souza, C.L., Fernandes, L.G.R., Tamashiro, W.M. da S.C., Simioni, P.U., 2015. Inflammatory Bowel Disease: An Overview of Immune Mechanisms and Biological Treatments. *Mediators of Inflammation* 2015, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2015/493012>

Desai, M.S., Seekatz, A.M., Koropatkin, N.M., Kamada, N., Hickey, C.A., Wolter, M., Pudlo, N.A., Kitamoto, S., Terrapon, N., Muller, A., Young, V.B., Henrissat, B., Wilmes, P., Stappenbeck, T.S., Núñez, G., Martens, E.C., 2016. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* 167, 1339–1353.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.043>

Di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., Luinetti, O., Ricevuti, L., Morera, R., Cifone, M.G., Solcia, E., Corazza, G.R., 2003. Increased Enterocyte Apoptosis in Inflamed Areas of Crohn’s Disease. *Diseases of the Colon & Rectum* 46, 1498–1507. <https://doi.org/10.1007/s10350-004-6802-z>

Dice, J.F., 2007. Chaperone-Mediated Autophagy. *Autophagy* 3, 295–299. <https://doi.org/10.4161/auto.4144>

Dignass, A., Lindsay, J.O., Sturm, A., Windsor, A., Colombel, J.-F., Allez, M., D'Haens, G., D'Hoore, A., Mantzaris, G., Novacek, G., Öresland, T., Reinisch, W., Sans, M., Stange, E., Vermeire, S., Travis, S., Van Assche, G., 2012. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis Part 2: Current management. *Journal of Crohn's and Colitis* 6, 991–1030. <https://doi.org/10.1016/j.crohns.2012.09.002>

Duranti, S., Gaiani, F., Mancabelli, L., Milani, C., Grandi, A., Bolchi, A., Santoni, A., Lugli, G.A., Ferrario, C., Mangifesta, M., Viappiani, A., Bertoni, S., Vivo, V., Serafini, F., Barbaro, M.R., Fugazza, A., Barbara, G., Gioiosa, L., Palanza, P., Cantoni, A.M., de'Angelis, G.L., Barocelli, E., de'Angelis, N., van Sinderen, D., Ventura, M., Turrone, F., 2016. Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: bifidobacteria as novel microbial biomarkers. *FEMS Microbiology Ecology* 92, fiw191. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw191>

D'Haens, G., Ferrante, M., Vermeire, S., Baert, F., Noman, M., Moortgat, L., Geens, P., Iwens, D., Aerden, I., Van Assche, G., Van Olmen, G., Rutgeerts, P., 2012. Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease: Inflammatory Bowel Diseases 18, 2218–2224. <https://doi.org/10.1002/ibd.22917>

Eaden, J.A., Abrams, K.R., Mayberry, J.F., n.d. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis 10.

Eliakim, R., 2013. Video capsule endoscopy of the small bowel: Current Opinion in *Gastroenterology* 29, 133–139. <https://doi.org/10.1097/MOG.0b013e32835bdc03>

Evans, A.T., Lee, S.D., 2012. A review and expert opinion of the use of certolizumab for Crohn's disease. *Expert Opinion on Biological Therapy* 12, 363–370. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.658770>

Feagan, B.G., Fedorak, R.N., Dubé, R., Landau, S., Vandervoort, M.K., 2005. Treatment of Ulcerative Colitis with a Humanized Antibody to the a4b7 Integrin. *The New England Journal of Medicine* 9.

Feagan, B.G., Rutgeerts, P., Sands, B.E., Hanauer, S., Colombel, J.-F., Sandborn, W.J., Van Assche, G., Axler, J., Kim, H.-J., Danese, S., Fox, I., Milch, C., Sankoh, S., Wyant, T., Xu, J., Parikh, A., 2013. Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *N Engl J Med* 369, 699–710. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1215734>

Feige, M.J., Hendershot, L.M., 2011. Disulfide bonds in ER protein folding and homeostasis. *Current Opinion in Cell Biology* 23, 167–175. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.10.012>

Flannigan, K.L., Geem, D., Harusato, A., Denning, T.L., 2015. Intestinal Antigen-

Presenting Cells. *The American Journal of Pathology* 185, 1809–1819. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.02.024>

Ford, A.C., Moayyedi, P., Bercik, P., Morgan, D.G., Bolino, C., Pintos-Sanchez, M.I., Reinisch, W., 2015. Lack of Utility of Symptoms and Signs at First Presentation as Predictors of Inflammatory Bowel Disease in Secondary Care. *American Journal of Gastroenterology* 110, 716–724. <https://doi.org/10.1038/ajg.2015.117>

Fouillet, A., Levet, C., Virgone, A., Robin, M., Dourlen, P., Rieusset, J., Belaidi, E., Ovize, M., Touret, M., Nataf, S., Mollereau, B., 2012. ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy. *Autophagy* 8, 915–926. <https://doi.org/10.4161/auto.19716>

Frank, D.N., St. Amand, A.L., Feldman, R.A., Boedeker, E.C., Harpaz, N., Pace, N.R., 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 13780–13785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>

Fumery, M., Singh, S., Dulai, P.S., Gower-Rousseau, C., Peyrin-Biroulet, L., Sandborn, W.J., 2018. Natural History of Adult Ulcerative Colitis in Population-based Cohorts: A Systematic Review. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 16, 343–356.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2017.06.016>

Gajendran, M., Loganathan, P., Jimenez, G., Catinella, A.P., Ng, N., Umapathy, C., Ziade, N., Hashash, J.G., 2019. A comprehensive review and update on ulcerative colitis. *Disease-a-Month* 65, 100851. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2019.02.004>

Ganji-Arjenaki, M., Nasri, H., Rafieian-Kopaei, M., 2017. Nephrolithiasis as a common urinary system manifestation of inflammatory bowel diseases; a clinical review and meta-analysis. *J Nephropathol* 6, 264–269. <https://doi.org/10.15171/jnp.2017.42>

Gardner, B.M., Walter, P., 2011. Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands That Directly Induce the Unfolded Protein Response. *Science* 333, 1891–1894. <https://doi.org/10.1126/science.1209126>

Gasparini, R.G., Sasaki, L.Y., Saad-Hossne, R., 2018. Inflammatory bowel disease epidemiology in São Paulo State, Brazil. *CEG Volume* 11, 423–429. <https://doi.org/10.2147/CEG.S176583>

Geremia, A., Biancheri, P., Allan, P., Corazza, G.R., Di Sabatino, A., 2014. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *Autoimmunity Reviews* 13, 3–10. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2013.06.004>

Geremia, A., Jewell, D.P., 2012. The IL-23/IL-17 pathway in inflammatory bowel disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology* 6, 223–237. <https://doi.org/10.1586/egh.11.107>

Ghavami, S., Yeganeh, B., Stelmack, G.L., Kashani, H.H., Sharma, P., Cunningham, R., Rattan, S., Bathe, K., Klonisch, T., Dixon, I.M.C., Freed, D.H., Halayko, A.J., 2012. Apoptosis, autophagy and ER stress in mevalonate cascade inhibition-induced cell death of human atrial fibroblasts. *Cell Death Dis* 3, e330–e330. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.61>

Giannotta, M., Tapete, G., Emmi, G., Silvestri, E., Milla, M., 2015. Thrombosis in inflammatory bowel diseases: what's the link? *Thrombosis J* 13, 14. <https://doi.org/10.1186/s12959-015-0044-2>

Gill, P.A., van Zelm, M.C., Muir, J.G., Gibson, P.R., 2018. Review article: short chain fatty acids as potential therapeutic agents in human gastrointestinal and inflammatory disorders. *Aliment Pharmacol Ther* 48, 15–34. <https://doi.org/10.1111/apt.14689>

Gionchetti, P., Rizzello, F., Venturi, A., Ferretti, M., Brignola, C., Miglioli, M., Campieri, M., 1998. Comparison of oral with rectal mesalazine in the treatment of ulcerative proctitis. *Diseases of the Colon & Rectum* 41, 93–97. <https://doi.org/10.1007/BF02236902>

Gizard, E., Ford, A.C., Bronowicki, J.-P., Peyrin-Biroulet, L., 2014. Systematic review: the epidemiology of the hepatobiliary manifestations in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 40, 3–15. <https://doi.org/10.1111/apt.12794>

Goodall, J.C., Wu, C., Zhang, Y., McNeill, L., Ellis, L., Saudek, V., Gaston, J.S.H., 2010. Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 107, 17698–17703. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011736107>

Guagnozzi, D., 2012. Colorectal cancer surveillance in patients with inflammatory bowel disease: What is new? *WJGE* 4, 108. <https://doi.org/10.4253/wjge.v4.i4.108>

Gundersen, M.D., Goll, R., Hol, J., Olsen, T., Rismo, R., Sørbye, S.W., Sundnes, O., Haraldsen, G., Florholmen, J., 2016. Loss of interleukin 33 expression in colonic crypts - a potential marker for disease remission in ulcerative colitis. *Sci Rep* 6, 35403. <https://doi.org/10.1038/srep35403>

Halling, M.L., Kjeldsen, J., Knudsen, T., Nielsen, J., Hansen, L.K., 2017. Patients with inflammatory bowel disease have increased risk of autoimmune and inflammatory diseases. *WJG* 23, 6137–6146. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i33.6137>

Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., Günther, S., Prescott, N.J., Onnie, C.M., Häslér, R., Sipos, B., Fölsch, U.R., Lengauer, T., Platzer, M., Mathew, C.G., Krawczak, M., Schreiber, S., 2007. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in

ATG16L1. *Nat Genet* 39, 207–211. <https://doi.org/10.1038/ng1954>

Han, J., Back, S.H., Hur, J., Lin, Y.-H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C.L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M.S., Sartor, M.A., Kaufman, R.J., 2013. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol* 15, 481–490. <https://doi.org/10.1038/ncb2738>

Hanauer, S., Strum, W.B., Robinson, M., 2000. Long-Term Use of Mesalamine (Rowasa) Suppositories in Remission Maintenance of Ulcerative Proctitis 95, 6.

Hanski, C., Born, M., Foss, H.D., Marowski, B., Mansmann, U., Arasth, K., Bachler, B., Papenfu, M., Niedobitek, F., 1999. Defective post-transcriptional processing of MUC2 mucin in ulcerative colitis and in Crohn's disease increases detectability of the MUC2 protein core. *J. Pathol.* 188, 304–311. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199907\)188:3<304::AID-PATH375>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199907)188:3<304::AID-PATH375>3.0.CO;2-A)

Harnoy, Y., Bouhnik, Y., Gault, N., Maggiori, L., Sulpice, L., Cazals-Hatem, D., Boudjema, K., Panis, Y., Ogier-Denis, E., Treton, X., 2016. Effect of appendectomy on colonic inflammation and neoplasia in experimental ulcerative colitis. *British Journal of Surgery* 103, 1530–1538. <https://doi.org/10.1002/bjs.10209>

Harris, J., Lang, T., Thomas, J.P.W., Sukkar, M.B., Nabar, N.R., Kehrl, J.H., 2017. Autophagy and inflammasomes. *Molecular Immunology* 86, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.02.013>

Hart, A.L., Al-Hassi, H.O., Rigby, R.J., Bell, S.J., Emmanuel, A.V., Knight, S.C., Kamm, M.A., Stagg, A.J., 2005. Characteristics of Intestinal Dendritic Cells in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 129, 50–65. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.05.013>

Hassanshahi, N., Masoumi, S.J., n.d. The Effect of Omega-3 Fatty Acids in Ulcerative Colitis: A Systematic Review. *Int J Nutr Sci* 3, 58–64.

Haze, K., Yoshida, H., Yanagi, H., Yura, T., Mori, K., 1999. Mammalian Transcription Factor ATF6 Is Synthesized as a Transmembrane Protein and Activated by Proteolysis in Response to Endoplasmic Reticulum Stress. *MBoC* 10, 3787–3799. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.11.3787>

Heazlewood, C.K., Cook, M.C., Eri, R., Price, G.R., Tauro, S.B., Taupin, D., Thornton, D.J., Png, C.W., Crockford, T.L., Cornall, R.J., Adams, R., Kato, M., Nelms, K.A., Hong, N.A., Florin, T.H.J., Goodnow, C.C., McGuckin, M.A., 2008. Aberrant Mucin Assembly in Mice Causes Endoplasmic Reticulum Stress and Spontaneous Inflammation Resembling Ulcerative Colitis. *PLoS Medicine* 5, 21.

Hetz, C., 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 89–102. <https://doi.org/10.1038/nrm3270>

Higuchi, L.M., Khalili, H., Chan, A.T., Richter, J.M., Bousvaros, A., Fuchs, C.S., 2012. A Prospective Study of Cigarette Smoking and the Risk of Inflammatory Bowel Disease in Women. *American Journal of Gastroenterology* 107, 1399–1406. <https://doi.org/10.1038/ajg.2012.196>

Hisamatsu, T., Kanai, T., Mikami, Y., Yoneno, K., Matsuoka, K., Hibi, T., 2013. Immune aspects of the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Pharmacology & Therapeutics* 137, 283–297. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.10.008>

Hou, J.K., Abraham, B., El-Serag, H., 2011. Dietary Intake and Risk of Developing Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review of the Literature. *American Journal of Gastroenterology* 106, 563–573. <https://doi.org/10.1038/ajg.2011.44>

Hu, X., Deng, J., Yu, T., Chen, S., Ge, Y., Zhou, Z., Guo, Y., Ying, H., Zhai, Q., Chen, Y., Yuan, F., Niu, Y., Shu, W., Chen, H., Ma, C., Liu, Z., Guo, F., 2019. ATF4 Deficiency Promotes Intestinal Inflammation in Mice by Reducing Uptake of Glutamine and Expression of Antimicrobial Peptides. *Gastroenterology* 156, 1098–1111. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.11.033>

Huang, Y., Chen, Z., n.d. Inflammatory bowel disease related innate immunity and adaptive immunity 8.

Iaculli, E., Agostini, M., Biancone, L., Fiorani, C., Di Vizia, A., Montagnese, F., Sibio, S., Manzelli, A., Tesauro, M., Rufini, A., Sica, G., 2016. C-reactive protein levels in the perioperative period as a predictive marker of endoscopic recurrence after ileo-colonic resection for Crohn's disease. *Cell Death Discovery* 2, 16032. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.32>

Iborra, M., Bernuzzi, F., Correale, C., Vetrano, S., Fiorino, G., Beltrán, B., Marabita, F., Locati, M., Spinelli, A., Nos, P., Invernizzi, P., Danese, S., 2013. Identification of serum and tissue micro-RNA expression profiles in different stages of inflammatory bowel disease: Micro-RNA expression profiles in IBD. *Clin Exp Immunol* 173, 250–258. <https://doi.org/10.1111/cei.12104>

Ingram, J.R., Thomas, G.A.O., Rhodes, J., Green, J.T., Hawkes, N.D., Swift, J.L., Srivastava, E.D., Evans, B.K., Williams, G.T., Newcombe, R.G., Courtney, E., Pillai, S., 2005. A Randomized Trial of Nicotine Enemas for Active Ulcerative Colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 3, 1107–1114. [https://doi.org/10.1016/S1542-3565\(05\)00849-9](https://doi.org/10.1016/S1542-3565(05)00849-9)

Iskandar, H.N., Ciorba, M.A., 2012. Biomarkers in inflammatory bowel disease: current practices and recent advances. *Translational Research* 159, 313–325. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2012.01.001>

Ji, X.-Q., Ji, Y.-B., Wang, S.-X., Zhang, C.-Q., Lu, D.-G., 2016. Alterations of pulmonary function in patients with inflammatory bowel diseases. *Ann Thorac Med* 11, 249. <https://doi.org/10.4103/1817-1737.191877>

Kaiser, T., Langhorst, J., Wittkowski, H., Becker, K., Friedrich, A.W., Rueffer, A., Dobos, G.J., Roth, J., Foell, D., 2007. Faecal S100A12 as a non-invasive marker distinguishing inflammatory bowel disease from irritable bowel syndrome. *Gut* 56, 1706–1713. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.113431>

Kam, L.Y., Targan, S.R., 2000. TNF- α antagonists for the treatment of Crohn's disease 8.

Kanai, T., Kawamura, T., Dohi, T., Makita, S., Nemoto, Y., Totsuka, T., Watanabe, M., 2006. TH1/TH2-mediated colitis induced by adoptive transfer of CD4⁺CD45RB^{high} T lymphocytes into nude mice: Inflammatory Bowel Diseases 12, 89–99. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000197237.21387.mL>

Karmiris, K., Avgerinos, A., Tavernaraki, A., Zeglinas, C., Karatzas, P., Koukouratos, T., Oikonomou, K.A., Kostas, A., Zampeli, E., Papadopoulos, V., Theodoropoulou, A., Viazis, N., Polymeros, D., Michopoulos, S., Bamias, G., Kapsoritakis, A., Karamanolis, D.G., Mantzaris, G.J., Tzathas, C., Koutroubakis, I.E., 2016. Prevalence and Characteristics of Extra-intestinal Manifestations in a Large Cohort of Greek Patients with Inflammatory Bowel Disease. *ECCOJC* 10, 429–436. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv232>

Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J.N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E.E.S., Higgins, D.E., Schreiber, S., Glimcher, L.H., Blumberg, R.S., 2008. XBP1 Links ER Stress to Intestinal Inflammation and Confers Genetic Risk for Human Inflammatory Bowel Disease. *Cell* 134, 743–756. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.021>

Kaur, A., Goggolidou, P., 2020. Ulcerative colitis: understanding its cellular pathology could provide insights into novel therapies. *J Inflamm* 17, 15. <https://doi.org/10.1186/s12950-020-00246-4>

Kedia, S., Ghosh, T.S., Jain, S., Desigamani, A., Kumar, A., Gupta, V., Bopanna, S., Yadav, D.P., Goyal, S., Makharia, G., Travis, S.P.L., Das, B., Ahuja, V., 2021. Gut microbiome diversity in acute severe colitis is distinct from mild to moderate ulcerative colitis. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 36, 731–739. <https://doi.org/10.1111/jgh.15232>

Keubler, L.M., Buettner, M., Häger, C., Bleich, A., 2015. A Multihit Model: Colitis Lessons from the Interleukin-10-deficient Mouse. *Inflammatory Bowel Diseases* 21, 1967–1975. <https://doi.org/10.1097/MIB.0000000000000468>

Khor, B., Gardet, A., Xavier, R.J., 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 474, 307–317. <https://doi.org/10.1038/nature10209>

Kishino, A., Hayashi, K., Hidai, C., Masuda, T., Nomura, Y., Oshima, T., 2017. XBP1-FoxO1 interaction regulates ER stress-induced autophagy in auditory cells. *Sci Rep* 7, 4442. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02960-1>

Kmieć, Z., Cyman, M., Ślebioda, T.J., 2017. Cells of the innate and adaptive

immunity and their interactions in inflammatory bowel disease. *Advances in Medical Sciences* 62, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2016.09.001>

Kokame, K., Kato, H., Miyata, T., 2001. Identification of ERSE-II, a New cis-Acting Element Responsible for the ATF6-dependent Mammalian Unfolded Protein Response. *Journal of Biological Chemistry* 276, 9199–9205. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010486200>

Kostic, A.D., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J.N., Gallini, C.A., Michaud, M., Clancy, T.E., Chung, D.C., Lochhead, P., Hold, G.L., El-Omar, E.M., Brenner, D., Fuchs, C.S., Meyerson, M., Garrett, W.S., 2013. *Fusobacterium nucleatum* Potentiates Intestinal Tumorigenesis and Modulates the Tumor-Immune Microenvironment. *Cell Host & Microbe* 14, 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.07.007>

Kostic, A.D., Xavier, R.J., Gevers, D., 2014. The Microbiome in Inflammatory Bowel Disease: Current Status and the Future Ahead. *Gastroenterology* 146, 1489–1499. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.009>

Kotlowski, R., Bernstein, C.N., Sepehri, S., Krause, D.O., 2007. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* 56, 669–675. <https://doi.org/10.1136/gut.2006.099796>

Koutroubakis, I.E., 2000. Appendectomy and the Development of Ulcerative Colitis: Results of a Metaanalysis of Published Case-Control Studies 95, 6.

Laine, L., Kaltenbach, T., Barkun, A., McQuaid, K.R., Subramanian, V., Soetikno, R., East, J.E., Farraye, F.A., Feagan, B., Ioannidis, J., Kiesslich, R., Krier, M., Matsumoto, T., McCabe, R.P., Mönkemüller, K., Odze, R., Picco, M., Rubin, D.T., Rubin, M., Rubio, C.A., Rutter, M.D., Sanchez-Yague, A., Sanduleanu, S., Shergill, A., Ullman, T., Velayos, F., Yakich, D., Yang, Y.-X., 2015. SCENIC International Consensus Statement on Surveillance and Management of Dysplasia in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 148, 639-651.e28. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.01.031>

Langner, C., Magro, F., Driessen, A., Ensari, A., Mantzaris, G.J., Villanacci, V., Becheanu, G., Borralho Nunes, P., Cathomas, G., Fries, W., Jouret-Mourin, A., Mescoli, C., de Petris, G., Rubio, C.A., Shepherd, N.A., Vieth, M., Eliakim, R., Geboes, K., 2014. The histopathological approach to inflammatory bowel disease: a practice guide. *Virchows Arch.* <https://doi.org/10.1007/s00428-014-1543-4>

Lashner, B.A., Hanauer, S.B., Silverstein, M.D., 1990. Testing nicotine gum for ulcerative colitis patients: Experience with single-patient trials. *Digest Dis Sci* 35, 827–832. <https://doi.org/10.1007/BF01536795>

Law, A.D., Dutta, U., Kochhar, R., Vaishnavi, C., Kumar, S., Noor, T., Bhadada, S., Singh, K., 2019. Vitamin D deficiency in adult patients with ulcerative colitis: Prevalence and relationship with disease severity, extent, and duration. *Indian J Gastroenterol* 38, 6–14. <https://doi.org/10.1007/s12664-019-00932-z>

Le Leu, R.K., Young, G.P., Hu, Y., Winter, J., Conlon, M.A., 2013. Dietary Red Meat Aggravates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice Whereas Resistant Starch Attenuates Inflammation. *Dig Dis Sci* 58, 3475–3482. <https://doi.org/10.1007/s10620-013-2844-1>

Lewis, J.D., Chuai, S., Nessel, L., Lichtenstein, G.R., Aberra, F.N., Ellenberg, J.H., 2008. Use of the noninvasive components of the mayo score to assess clinical response in Ulcerative Colitis: *Inflammatory Bowel Diseases* 14, 1660–1666. <https://doi.org/10.1002/ibd.20520>

Lichtenstein, G.R., 2013. Comprehensive review: antitumor necrosis factor agents in inflammatory bowel disease and factors implicated in treatment response. *Therap Adv Gastroenterol* 6, 269–293. <https://doi.org/10.1177/1756283X13479826>

Liguori, G., Lamas, B., Richard, M.L., Brandi, G., da Costa, G., Hoffmann, T.W., Di Simone, M.P., Calabrese, C., Poggioli, G., Langella, P., Campieri, M., Sokol, H., 2016. Fungal Dysbiosis in Mucosa-associated Microbiota of Crohn's Disease Patients. *ECCOJC* 10, 296–305. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv209>

Lin, J.H., Li, H., Yasumura, D., Cohen, H.R., Zhang, C., Panning, B., Shokat, K.M., LaVail, M.M., Walter, P., 2007. IRE1 Signaling Affects Cell Fate During the Unfolded Protein Response. *Science* 318, 944–949. <https://doi.org/10.1126/science.1146361>

Lin, J.H., Li, H., Zhang, Y., Ron, D., Walter, P., 2009. Divergent Effects of PERK and IRE1 Signaling on Cell Viability. *PLoS ONE* 4, e4170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004170>

Liu, J.Z., van Sommeren, S., Huang, H., Ng, S.C., Alberts, R., Takahashi, A., Ripke, S., Lee, J.C., Jostins, L., Shah, T., Abedian, S., Cheon, J.H., Cho, J., Daryani, N.E., Franke, L., Fuyuno, Y., Hart, A., Juyal, R.C., Juyal, G., Kim, W.H., Morris, A.P., Poustchi, H., Newman, W.G., Midha, V., Orchard, T.R., Vahedi, H., Sood, A., Sung, J.J.Y., Malekzadeh, R., Westra, H.-J., Yamazaki, K., Yang, S.-K., Barrett, J.C., Franke, A., Alizadeh, B.Z., Parkes, M., B K, T., Daly, M.J., Kubo, M., Anderson, C.A., Weersma, R.K., 2015. Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations. *Nat Genet* 47, 979–986. <https://doi.org/10.1038/ng.3359>

Loddenkemper, C., 2009. Diagnostic Standards in the Pathology of Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis* 27, 576–583. <https://doi.org/10.1159/000233301>

Lowenberg, M., de Boer, N., Hoentjen, F., 2014. Golimumab for the treatment of ulcerative colitis. *CEG* 53. <https://doi.org/10.2147/CEG.S48741>

Lunney, P.C., Leong, R.W.L., 2012. Review article: ulcerative colitis, smoking and nicotine therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 36, 997–1008. <https://doi.org/10.1111/apt.12086>

- Ma, X., Dai, Z., Sun, K., Zhang, Y., Chen, J., Yang, Y., Tso, P., Wu, G., Wu, Z., 2017. Intestinal Epithelial Cell Endoplasmic Reticulum Stress and Inflammatory Bowel Disease Pathogenesis: An Update Review. *Front. Immunol.* 8, 1271. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01271>
- Ma, Y., Hendershot, L.M., 2004. The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe? *Nat Rev Cancer* 4, 966–977. <https://doi.org/10.1038/nrc1505>
- Magalhães-Costa, M.H. de, Reis, B.R. dos, Chagas, V.L.A., Nunes, T., Souza, H.S.P. de, Zaltman, C., 2014. Focal enhanced gastritis and macrophage microaggregates in the gastric mucosa : potential role in the differential diagnosis between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Arq. Gastroenterol.* 51, 276–282. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032014000400003>
- Malaty, H., Lo, G., Hou, J., 2017. Characterization and prevalence of spondyloarthritis and peripheral arthritis among patients with inflammatory bowel disease. *CEG Volume 10*, 259–263. <https://doi.org/10.2147/CEG.S136383>
- Marzec, M., Eletto, D., Argon, Y., 2012. GRP94: An HSP90-like protein specialized for protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1823, 774–787. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.10.013>
- Mizushima, N., 2007. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* 21, 2861–2873. <https://doi.org/10.1101/gad.1599207>
- Moore, L., Gaffney, K., Lopez, R., Shen, B., 2012. Comparison of the natural history of ulcerative colitis in African Americans and non-Hispanic Caucasians: A historical cohort study: *Inflammatory Bowel Diseases* 18, 743–749. <https://doi.org/10.1002/ibd.21796>
- Moss, A.C., Brinks, V., Carpenter, J.F., 2013. Review article: immunogenicity of anti-TNF biologics in IBD - the role of patient, product and prescriber factors. *Aliment Pharmacol Ther* 38, 1188–1197. <https://doi.org/10.1111/apt.12507>
- Moustafa, A., n.d. Genetic risk, dysbiosis, and treatment stratification using host genome and gut microbiome in inflammatory bowel disease. *Clinical and Translational Gastroenterology* 8.
- Mozaffari, S., Nikfar, S., Abdolghaffari, A.H., Abdollahi, M., 2014. New biologic therapeutics for ulcerative colitis and Crohn's disease. *Expert Opinion on Biological Therapy* 14, 583–600. <https://doi.org/10.1517/14712598.2014.885945>
- Nakarai, A., Kato, J., Hiraoka, S., Takashima, S., Inokuchi, T., Takahara, M., Sugihara, Y., Harada, K., Okada, H., 2018. An Elevated Platelet Count Increases the Risk of Relapse in Ulcerative Colitis Patients with Mucosal Healing. *Gut and Liver* 12, 420–425. <https://doi.org/10.5009/gnl17236>
- Ndoye, A., Weeraratna, A.T., 2016. Autophagy- An emerging target for

melanoma therapy. F1000Res 5, 1888.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.8347.1>

Ng, S.C., Kaplan, G.G., Tang, W., Banerjee, R., Adigopula, B., Underwood, F.E., Tanyingoh, D., Wei, S.-C., Lin, W.-C., Lin, H.-H., Li, J., Bell, S., Niewiadomski, O., Kamm, M.A., Zeng, Z., Chen, M., Hu, P., Ong, D., Ooi, C.J., Ling, K.-L., Miao, Y., Miao, J., Janaka de Silva, H., Niriella, M., Aniwan, S., Limsrivilai, J., Pisespongsa, P., Wu, K., Yang, H., Ng, K.K., Yu, H.H., Wang, Y., Ouyang, Q., Abdullah, M., Simadibrata, M., Gunawan, J., Hilmi, I., Lee Goh, K., Cao, Q., Sheng, H., Ong-Go, A., Chong, V.H., Ching, J.Y.L., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., 2019. Population Density and Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Prospective Population-Based Study in 13 Countries or Regions in Asia-Pacific. *Am J Gastroenterol* 114, 107–115. <https://doi.org/10.1038/s41395-018-0233-2>

Ng, S.C., Shi, H.Y., Hamidi, N., Underwood, F.E., Tang, W., Benchimol, E.I., Panaccione, R., Ghosh, S., Wu, J.C.Y., Chan, F.K.L., Sung, J.J.Y., Kaplan, G.G., 2017. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *The Lancet* 390, 2769–2778. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32448-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32448-0)

Nguyen, G.C., LaVeist, T.A., Gearhart, S., Bayless, T.M., Brant, S.R., 2006. Racial and Geographic Variations in Colectomy Rates Among Hospitalized Ulcerative Colitis Patients. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 4, 1507-1513.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.09.026>

Nielsen, O.H., Munck, L.K., 2007. Drug Insight: aminosalicylates for the treatment of IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 4, 160–170. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0696>

Nuij, V.J.A.A., Peppelenbosch, M.P., van der Woude, C.J., Fuhler, G.M., 2017. Genetic polymorphism in ATG16L1 gene is associated with adalimumab use in inflammatory bowel disease. *J Transl Med* 15, 248. <https://doi.org/10.1186/s12967-017-1355-9>

Oh, K., Oh, E.H., Baek, S., Song, E.M., Kim, G.-U., Seo, M., Hwang, S.W., Park, S.H., Yang, D.-H., Kim, K.-J., Byeon, J.-S., Myung, S.-J., Yang, S.-K., Ye, B.D., 2017. Elevated C-reactive protein level during clinical remission can predict poor outcomes in patients with Crohn's disease. *PLoS ONE* 12, e0179266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179266>

Ohkusa, T., 2003. Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut* 52, 79–83. <https://doi.org/10.1136/gut.52.1.79>

Ohkusa, T., Sato, N., Ogihara, T., Morita, K., Ogawa, M., Okayasu, I., 2002. *Fusobacterium varium* localized in the colonic mucosa of patients with ulcerative colitis stimulates species-specific antibody. *J Gastroenterol Hepatol* 17, 849–853. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1746.2002.02834.x>

Oikonomou, K., Kapsoritakis, A., Eleftheriadis, T., Stefanidis, I., Potamianos, S., 2011. Renal manifestations and complications of inflammatory bowel disease: Inflammatory Bowel Diseases 17, 1034–1045. <https://doi.org/10.1002/ibd.21468>

Palmela, C., Chevarin, C., Xu, Z., Torres, J., Sevrin, G., Hirten, R., Barnich, N., Ng, S.C., Colombel, J.-F., 2018. Adherent-invasive Escherichia coli in inflammatory bowel disease. Gut 67, 574–587. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314903>

Panaccione, R., Loftus, E.V., Binion, D., McHugh, K., Alam, S., Chen, N., Gu  rette, B., Mulani, P., Chao, J., 2011. Efficacy and Safety of Adalimumab in Canadian Patients with Moderate to Severe Crohn's Disease: Results of the Adalimumab in Canadian SubjeCts with ModERate to Severe Crohn's DiseaSe (ACCESS) Trial. Canadian Journal of Gastroenterology 25, 419–425. <https://doi.org/10.1155/2011/724813>

Parente, F., Pastore, L., Bargiggia, S., Cucino, C., Greco, S., Molteni, M., Ardizzone, S., Porro, G.B., Sampietro, G.M., Giorgi, R., Moretti, R., Gallus, S., 2007. Incidence and risk factors for gallstones in patients with inflammatory bowel disease: A large case-control study. Hepatology 45, 1267–1274. <https://doi.org/10.1002/hep.21537>

Parian, A., Limketkai, B., Koh, J., Brant, S.R., Bitton, A., Cho, J.H., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Proctor, D.D., Regueiro, M.D., Rioux, J.D., Schumm, P., Taylor, K.D., Silverberg, M.S., Steinhart, A.H., Hernaez, R., Lazarev, M., 2017. Appendectomy does not decrease the risk of future colectomy in UC: results from a large cohort and meta-analysis. Gut 66, 1390–1397. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-311550>

Parigi, S.M., Eldh, M., Larssen, P., Gabrielsson, S., Villablanca, E.J., 2015. Breast Milk and Solid Food Shaping Intestinal Immunity. Front. Immunol. 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00415>

Parikh, A., Leach, T., Wyant, T., Scholz, C., Sankoh, S., Mould, D.R., Ponich, T., Fox, I., Feagan, B.G., 2012. Vedolizumab for the Treatment of Active Ulcerative Colitis: A Randomized Controlled Phase 2 Dose-ranging Study: Inflammatory Bowel Diseases 18, 1470–1479. <https://doi.org/10.1002/ibd.21896>

Park, S.-H., Choi, H.J., Yang, H., Do, K.H., Kim, J., Lee, D.W., Moon, Y., 2010. Endoplasmic Reticulum Stress-activated C/EBP Homologous Protein Enhances Nuclear Factor-  B Signals via Repression of Peroxisome Proliferator-activated Receptor   . Journal of Biological Chemistry 285, 35330–35339. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.136259>

Park, S.H., Kim, D., Ye, B.D., Yang, S.-K., Kim, Ji-Hun, Yang, D.-H., Jung, K.W., Kim, K.-J., Byeon, J.-S., Myung, S.-J., Kim, M.-H., Kim, Jin-Ho, 2013. The Characteristics of Ulcerative Colitis Associated With Autoimmune Pancreatitis. Journal of Clinical Gastroenterology 47, 520–525. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e31827fd4a2>

Park, S.H., Loftus, E.V., Yang, S.-K., 2014. Appendiceal Skip Inflammation and Ulcerative Colitis. *Dig Dis Sci* 59, 2050–2057. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3129-z>

Plevy, S., Silverberg, M.S., Lockton, S., Stockfisch, T., Croner, L., Stachelski, J., Brown, M., Triggs, C., Chuang, E., Princen, F., Singh, S., 2013. Combined Serological, Genetic, and Inflammatory Markers Differentiate Non-IBD, Crohn's Disease, and Ulcerative Colitis Patients: *Inflammatory Bowel Diseases* 19, 1139–1148. <https://doi.org/10.1097/MIB.0b013e318280b19e>

Powell, N., Pantazi, E., Pavlidis, P., Tsakmaki, A., Li, K., Yang, F., Parker, A., Pin, C., Cozzetto, D., Minns, D., Stolarczyk, E., Saveljeva, S., Mohamed, R., Lavender, P., Afzali, B., Digby-Bell, J., Tjir-Li, T., Kaser, A., Friedman, J., Macdonald, T.T., Bewick, G.A., Lord, G.M., 2020. Interleukin-22 orchestrates a pathological endoplasmic reticulum stress response transcriptional programme in colonic epithelial cells. *Gut* 69, 578–590. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318483>

Quaresma, A.B., Kaplan, G.G., Kotze, P.G., 2019. The globalization of inflammatory bowel disease: the incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in Brazil. *Current Opinion in Gastroenterology* 35, 259–264. <https://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000534>

Randall-Demllo, S., Chieppa, M., Eri, R., 2013. Intestinal Epithelium and Autophagy: Partners in Gut Homeostasis. *Front. Immunol.* 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00301>

Rees, W.D., Stahl, M., Jacobson, K., Bressler, B., Sly, L.M., Vallance, B.A., Steiner, T.S., 2020. Enteroids Derived From Inflammatory Bowel Disease Patients Display Dysregulated Endoplasmic Reticulum Stress Pathways, Leading to Differential Inflammatory Responses and Dendritic Cell Maturation. *Journal of Crohn's and Colitis* 14, 948–961. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz194>

Regueiro, M., Greer, J.B., Szigethy, E., 2017. Etiology and Treatment of Pain and Psychosocial Issues in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* 152, 430-439.e4. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.036>

Rigoli, L., 2014. Inflammatory bowel disease in pediatric and adolescent patients: A biomolecular and histopathological review. *WJG* 20, 10262. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i30.10262>

Rioux, J.D., Xavier, R.J., Taylor, K.D., Silverberg, M.S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M.M., Datta, L.W., Shugart, Y.Y., Griffiths, A.M., Targan, S.R., Ippoliti, A.F., Bernard, E.-J., Mei, L., Nicolae, D.L., Regueiro, M., Schumm, L.P., Steinhardt, A.H., Rotter, J.I., Duerr, R.H., Cho, J.H., Daly, M.J., Brant, S.R., 2007. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 39, 596–604. <https://doi.org/10.1038/ng2032>

Rodrigues, B.L., Mazzaro, M.C., Nagasako, C.K., Ayrizono, M. de L.S., Fagundes, J.J., Leal, R.F., 2020. Assessment of disease activity in inflammatory bowel diseases: Non-invasive biomarkers and endoscopic scores. *WJGE* 12, 504–520. <https://doi.org/10.4253/wjge.v12.i12.504>

Rogier, E.W., Frantz, A.L., Bruno, M.E., Wedlund, L., Cohen, D.A., Stromberg, A.J., Kaetzel, C.S., n.d. Lessons from mother: Long-term impact of antibodies in breast milk on the gut microbiota and intestinal immune system of breastfed offspring. *Gut Microbes* 5, 6.

Rogler, G., Biedermann, L., 2015. Clinical Utility of Biomarkers in IBD. *Curr Gastroenterol Rep* 17, 26. <https://doi.org/10.1007/s11894-015-0449-x>

Rubin, D.T., Ananthakrishnan, A.N., Siegel, C.A., Sauer, B.G., Long, M.D., 2019. ACG Clinical Guideline: Ulcerative Colitis in Adults. *Am J Gastroenterol* 114, 384–413. <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000000152>

Rubin, D.T., Huo, D., Kinnucan, J.A., Sedrak, M.S., McCullom, N.E., Bunnag, A.P., Raun–Royer, E.P., Cohen, R.D., Hanauer, S.B., Hart, J., Turner, J.R., 2013. Inflammation Is an Independent Risk Factor for Colonic Neoplasia in Patients With Ulcerative Colitis: A Case–Control Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 11, 1601-1608.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.06.023>

Rutgeerts, P., Assche, G., Vermeire, S., 2006. Review article: infliximab therapy for inflammatory bowel disease - seven years on. *Aliment Pharmacol Ther* 23, 451–463. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.02786.x>

Salgado, V.C.L., Luiz, R.R., Boéchat, N.L.F., Leão, I.S., Schorr, B. do C., Parente, J.M.L., Lima, D.C., Júnior, E.S.S., Silva, G.O.S., Almeida, N.P., Vieira, A., Bueno, M.L.Q. de, Chebli, J.M., Bertges, É.R., Brugnara, L.M. da C., Neto, C.J., Campbell, S.B.G., Discacciati, L.L., Cézar, J.P.S., Nunes, T., Kaplan, G.G., Zaltman, C., 2020. Risk factors associated with inflammatory bowel disease: A multicenter case-control study in Brazil. *WJG* 26, 3611–3624. <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i25.3611>

Samoilă, I., Dinescu, S., Costache, M., 2020. Interplay between Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Inflammatory Bowel Diseases Development—A Focus on Ulcerative Colitis. *Cells* 9, 1647. <https://doi.org/10.3390/cells9071647>

Sandborn, W., Su, C., Sands, B., D’Haens, G., Vermeire, S., Schreiber, S., Danese, S., Feagan, B., 2017. Tofacitinib as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis 1723–1736.

Sandborn, W.J., Feagan, B.G., Marano, C., Zhang, H., Strauss, R., Johanns, J., Adedokun, O.J., Guzzo, C., Colombel, J., Reinisch, W., Gibson, P.R., Collins, J., Järnerot, G., Rutgeerts, P., 2014. Subcutaneous Golimumab Maintains Clinical Response in Patients With Moderate-to-Severe Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 146, 96-109.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.06.010>

Sandborn, W.J., Tremaine, W.J., Leighton, J.A., Lawson, G.M., Zins, B.J., Compton, R.F., Mays, D.C., Lipsky, J.J., Batts, K.P., Offord, K.P., Hurt, R.D., Green, J., 1997. Nicotine tartrate liquid enemas for mildly to moderately active left-sided ulcerative colitis unresponsive to first-line therapy: a pilot study. *Aliment Pharmacol Ther* 11, 663–671. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.1997.00208.x>

Sands, B.E., Tremaine, W.J., Sandborn, W.J., Rutgeerts, P.J., Hanauer, S.B., Mayer, L., Targan, S.R., Podolsky, D.K., 2001. Infliximab in the Treatment of Severe, Steroid-Refractory Ulcerative Colitis: A Pilot Study: *Inflammatory Bowel Diseases* 7, 83–88. <https://doi.org/10.1097/00054725-200105000-00001>

Satsangi, J., 2006. The Montreal classification of inflammatory bowel disease: controversies, consensus, and implications. *Gut* 55, 749–753. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.082909>

Schroeder, K., Tremaine, W., Ilstrup, D., 1987. Coated oral 5-aminosalicylic acid therapy for mildly to moderately active ulcerative colitis 1625–1629.

Seidelin, J.B., Bjerrum, J.T., Coskun, M., Widjaya, B., Vainer, B., Nielsen, O.H., 2010. IL-33 is upregulated in colonocytes of ulcerative colitis. *Immunology Letters* 128, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2009.11.001>

Seldenrijk, C.A., Morson, B.C., Meuwissen, S.G., Schipper, N.W., Lindeman, J., Meijer, C.J., 1991. Histopathological evaluation of colonic mucosal biopsy specimens in chronic inflammatory bowel disease: diagnostic implications. *Gut* 32, 1514–1520. <https://doi.org/10.1136/gut.32.12.1514>

Selvaratnam, S., Gullino, S., Shim, L., Lee, E., Lee, A., Paramsothy, S., Leong, R.W., 2019. Epidemiology of inflammatory bowel disease in South America: A systematic review. *WJG* 25, 6866–6875. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i47.6866>

Shi, Y., Vatter, K.M., Sood, R., An, J., Liang, J., Stramm, L., Wek, R.C., 1998. Identification and Characterization of Pancreatic Eukaryotic Initiation Factor 2 γ -Subunit Kinase, PEK, Involved in Translational Control. *MOL. CELL. BIOL.* 18, 11.

Shkoda, A., Ruiz, P.A., Daniel, H., Kim, S.C., Rogler, G., Sartor, R.B., Haller, D., 2007. Interleukin-10 Blocked Endoplasmic Reticulum Stress in Intestinal Epithelial Cells: Impact on Chronic Inflammation. *Gastroenterology* 132, 190–207. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.10.030>

Silva, F.A.R., Rodrigues, B.L., Ayrizono, M. de L.S., Leal, R.F., 2016. The Immunological Basis of Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology Research and Practice* 2016, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2016/2097274>

Singh, S., Nagpal, S.J.S., Murad, M.H., Yadav, S., Kane, S.V., Pardi, D.S., Talwalkar, J.A., Loftus, E.V., 2014a. Inflammatory Bowel Disease Is Associated With an Increased Risk of Melanoma: A Systematic Review and Meta-analysis.

Clinical Gastroenterology and Hepatology 12, 210–218.
<https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.04.033>

Singh, S., Singh, H., Loftus, E.V., Pardi, D.S., 2014b. Risk of Cerebrovascular Accidents and Ischemic Heart Disease in Patients With Inflammatory Bowel Disease: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 12, 382–393.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.08.023>

Sokol, H., Lepage, P., Seksik, P., Doré, J., Marteau, P., 2006. Temperature Gradient Gel Electrophoresis of Fecal 16S rRNA Reveals Active *Escherichia coli* in the Microbiota of Patients with Ulcerative Colitis. *J Clin Microbiol* 44, 3172–3177. <https://doi.org/10.1128/JCM.02600-05>

Solem, C.A., Loftus, E.V., Tremaine, W.J., Harmsen, W.S., Zinsmeister, A.R., Sandborn, W.J., 2005. Correlation of C-Reactive Protein With Clinical, Endoscopic, Histologic, and Radiographic Activity in Inflammatory Bowel Disease: Inflammatory Bowel Diseases 11, 707–712. <https://doi.org/10.1097/01.MIB.0000173271.18319.53>

Souza, H.S.P., Tortori, C.J.A., Castelo-Branco, M.T.L., Carvalho, A.T.P., Margallo, V.S., Delgado, C.F.S., Dines, I., Elia, C.C.S., 2005. Apoptosis in the intestinal mucosa of patients with inflammatory bowel disease: evidence of altered expression of FasL and perforin cytotoxic pathways. *Int J Colorectal Dis* 20, 277–286. <https://doi.org/10.1007/s00384-004-0639-8>

Stepaniuk, P., Bernstein, C.N., Targownik, L.E., Singh, H., 2015. Characterization of Inflammatory Bowel Disease in Elderly Patients: A Review of Epidemiology, Current Practices and Outcomes of Current Management Strategies. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology* 29, 327–333. <https://doi.org/10.1155/2015/136960>

Sung, J., Ho, K., Chiu, H., Ching, J., Travis, S., Peled, R., 2012. The use of Pillcam Colon in assessing mucosal inflammation in ulcerative colitis: a multicenter study. *Endoscopy* 44, 754–758. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1309819>

Tabas, I., Ron, D., 2011. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 13, 184–190. <https://doi.org/10.1038/ncb0311-184>

Tahara, T., Shibata, T., Kawamura, T., Okubo, M., Ichikawa, Y., Sumi, K., Miyata, M., Ishizuka, T., Nakamura, M., Nagasaka, M., Nakagawa, Y., Ohmiya, N., Arisawa, T., Hirata, I., 2015. Fusobacterium Detected in Colonic Biopsy and Clinicopathological Features of Ulcerative Colitis in Japan. *Dig Dis Sci* 60, 205–210. <https://doi.org/10.1007/s10620-014-3316-y>

Takahashi, K., Nishida, A., Fujimoto, T., Fujii, M., Shioya, M., Imaeda, H., Inatomi, O., Bamba, S., Andoh, A., Sugimoto, M., 2016. Reduced Abundance of Butyrate-Producing Bacteria Species in the Fecal Microbial Community in Crohn's Disease. *Digestion* 93, 59–65. <https://doi.org/10.1159/000441768>

Taleban, S., Li, D., Targan, S.R., Ippoliti, A., Brant, S.R., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Silverberg, M.S., Vasilias, E.A., Rotter, J.I., Haritunians, T., Shih, D.Q., Dubinsky, M., Melmed, G.Y., McGovern, D.P.B., 2016. Ocular Manifestations in Inflammatory Bowel Disease Are Associated with Other Extra-intestinal Manifestations, Gender, and Genes Implicated in Other Immune-related Traits. *ECCOJC* 10, 43–49. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjv178>

Tatiya-aphiradee, N., Chatuphonprasert, W., Jarukamjorn, K., 2018. Immune response and inflammatory pathway of ulcerative colitis. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 30, 1–10. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2018-0036>

Thomas, S., Baumgart, D.C., 2012. Targeting leukocyte migration and adhesion in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Inflammopharmacol* 20, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s10787-011-0104-6>

Timani, S., Mutasim, D.F., 2008. Skin manifestations of inflammatory bowel disease. *Clinics in Dermatology* 26, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2007.10.018>

Todd, D.J., Lee, A.H., Glimcher, L.H., 2008. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* 8, 663–674. <https://doi.org/10.1038/nri2359>

Tréton, X., Pédruzzi, E., Cazals-Hatem, D., Grodet, A., Panis, Y., Groyer, A., Moreau, R., Bouhnik, Y., Daniel, F., Ogier-Denis, E., 2011. Altered Endoplasmic Reticulum Stress Affects Translation in Inactive Colon Tissue From Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 141, 1024–1035. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2011.05.033>

Truelove, S., Witts, L., 1955. Cortisone in Ulcerative Colitis 1041–1048.

Tsuru, A., Fujimoto, N., Takahashi, S., Saito, M., Nakamura, D., Iwano, M., Iwawaki, T., Kadokura, H., Ron, D., Kohno, K., 2013. Negative feedback by IRE1 optimizes mucin production in goblet cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110, 2864–2869. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212484110>

Ungar, B., Levy, I., Yavne, Y., Yavzori, M., Picard, O., Fudim, E., Loebstein, R., Chowers, Y., Eliakim, R., Kopylov, U., Ben-Horin, S., 2016. Optimizing Anti-TNF- α Therapy: Serum Levels of Infliximab and Adalimumab Are Associated With Mucosal Healing in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 14, 550-557.e2. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2015.10.025>

Urra, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., Hetz, C., 2013. When ER stress reaches a dead end. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833, 3507–3517. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.07.024>

Vermeire, S., 2006. Laboratory markers in IBD: useful, magic, or unnecessary

toys? Gut 55, 426–431. <https://doi.org/10.1136/gut.2005.069476>

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N., 2005. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 84, 627–639. <https://doi.org/10.1007/s00277-005-1065-x>

Vidal, R.L., Hetz, C., 2012. Crosstalk between the UPR and autophagy pathway contributes to handling cellular stress in neurodegenerative disease. *Autophagy* 8, 970–972. <https://doi.org/10.4161/auto.20139>

Vieira, A., Fang, C., Rolim, E., Klug, W., Steinwurz, F., Rossini, L., Candelária, P., 2009. Inflammatory bowel disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with laboratory parameters, clinical, endoscopic and histological indexes. *BMC Res Notes* 2, 221. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-221>

Wang, S., Ye, Q., Zeng, X., Qiao, S., 2019. Functions of Macrophages in the Maintenance of Intestinal Homeostasis. *Journal of Immunology Research* 2019, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2019/1512969>

Xiang, J.-Y., Ouyang, Q., Li, G.-D., Xiao, N.-P., 2008. Clinical value of fecal calprotectin in determining disease activity of ulcerative colitis. *WJG* 14, 53. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.53>

Xu, K., Al-ani, M.K., Sun, Y., Xu, W., Pan, L., Song, Y., Xu, Z., Pan, X., Yang, L., 2017. Platelet-rich plasma activates tendon-derived stem cells to promote regeneration of Achilles tendon rupture in rats: Platelet-rich plasma activates TDSCs. *J Tissue Eng Regen Med* 11, 1173–1184. <https://doi.org/10.1002/term.2020>

Xu, L., Lochhead, P., Ko, Y., Claggett, B., Leong, R.W., Ananthakrishnan, A.N., 2017. Systematic review with meta-analysis: breastfeeding and the risk of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 46, 780–789. <https://doi.org/10.1111/apt.14291>

Xu, X., Lai, Y., Hua, Z.-C., 2019. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports* 39, BSR20180992. <https://doi.org/10.1042/BSR20180992>

Xue, X., Piao, J.-H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Kojima, Y., Mori, K., Yagita, H., Okumura, K., Harding, H., Nakano, H., 2005. Tumor Necrosis Factor α (TNF α) Induces the Unfolded Protein Response (UPR) in a Reactive Oxygen Species (ROS)-dependent Fashion, and the UPR Counteracts ROS Accumulation by TNF α . *Journal of Biological Chemistry* 280, 33917–33925. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505818200>

Yamamoto, K., Sato, T., Matsui, T., Sato, M., Okada, T., Yoshida, H., Harada, A., Mori, K., n.d. Transcriptional Induction of Mammalian ER Quality Control Proteins Is Mediated by Single or Combined Action of ATF6 α and XBP. *Developmental Cell* 12.

Yang, Y., Liu, B., Dai, J., Srivastava, P.K., Zammit, D.J., Lefrançois, L., Li, Z., 2007. Heat Shock Protein gp96 Is a Master Chaperone for Toll-like Receptors and Is Important in the Innate Function of Macrophages. *Immunity* 26, 215–226. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.12.005>

Zaltman, C., Parra, R.S., Sassaki, L.Y., Santana, G.O., Ferrari, M. de L.A., Miszputen, S.J., Amarante, H.M.B.S., Kaiser Junior, R.L., Flores, C., Catapani, W.R., Parente, J.M.L., Bafutto, M., Ramos, O., Gonçalves, C.D., Guimaraes, I.M., da Rocha, J.J.R., Feitosa, M.R., Feres, O., Saad-Hossne, R., Penna, F.G.C., Cunha, P.F.S., Gomes, T.N., Nones, R.B., Faria, M.A.G., Parente, M.P.P.D., Scotton, A.S., Caratin, R.F., Senra, J., Chebli, J.M., 2021. Real-world disease activity and sociodemographic, clinical and treatment characteristics of moderate-to-severe inflammatory bowel disease in Brazil. *WJG* 27, 208–223. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i2.208>

Zhang, B., Su, X.Y., Xie, Z.Y., Ding, H., Wang, T., Xie, R.Y., Wen, Z.L., 2020. Inositol-Requiring Kinase 1 Regulates Apoptosis via Inducing Endoplasmic Reticulum Stress in Colitis Epithelial Cells. *Digestive Diseases and Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06622-7>

Zhang, H.-S., Chen, Y., Fan, L., Xi, Q.-L., Wu, G.-H., Li, X.-X., Yuan, T.-L., He, S.-Q., Yu, Y., Shao, M.-L., Liu, Yang, Bai, C.-G., Ling, Z.-Q., Li, M., Liu, Yong, Fang, J., 2015. The Endoplasmic Reticulum Stress Sensor IRE1 α in Intestinal Epithelial Cells Is Essential for Protecting against Colitis. *Journal of Biological Chemistry* 290, 15327–15336. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.633560>

Zhao, F., Edwards, R., Dizon, D., Afrasiabi, K., Mastroianni, J.R., Geyfman, M., Ouellette, A.J., Andersen, B., Lipkin, S.M., 2010. Disruption of Paneth and goblet cell homeostasis and increased endoplasmic reticulum stress in *Agr2*^{-/-} mice. *Developmental Biology* 338, 270–279. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.12.008>

Zheng, W., Rosenstiel, P., Huse, K., Sina, C., Valentonyte, R., Mah, N., Zeitlmann, L., Grosse, J., Ruf, N., Nürnberg, P., Costello, C.M., Onnie, C., Mathew, C., Platzer, M., Schreiber, S., Hampe, J., 2006. Evaluation of AGR2 and AGR3 as candidate genes for inflammatory bowel disease. *Genes Immun* 7, 11–18. <https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364263>

Zhu, G., Lee, A.S., 2015. Role of the unfolded protein response, GRP78 and GRP94 in organ homeostasis: UPR AND GRPs REGULATE ORGAN HOMEOSTASIS. *J. Cell. Physiol.* 230, 1413–1420. <https://doi.org/10.1002/jcp.24923>

8. Anexos

8.1 Anexo 1 – Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA 								
PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP								
DADOS DA EMENDA Título da Pesquisa: Estudo de biomarcadores em doença inflamatória intestinal. Pesquisador: Raquel Franco Leal Área Temática: Genética Humana: (Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;); Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro; Versão: 9 CAAE: 14872313.0.0000.5404 Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP Patrocinador Principal: Laboratório de Gastroenterologia do Instituto IDIBAPS- Hospital Clínic Barcelona								
DADOS DO PARECER Número do Parecer: 4.237.201 Apresentação do Projeto: As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas do documento Informações Básicas da Pesquisa (PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1578065_E1.pdf de 16/06/2020). INTRODUÇÃO 1. Introdução A incidência crescente das doenças inflamatórias intestinais (DII), em particular a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa inespecífica (RCUI), tem suscitado pesquisas com relação à etiopatogenia e a biomarcadores envolvidos com essas afecções. A DC e RCUI são doenças crônicas intestinais, multifatoriais, que ocorrem principalmente entre a segunda e terceira décadas de vida em países desenvolvidos. Estudos epidemiológicos demonstram o aumento da incidência da DC nas últimas três décadas na maioria dos países ocidentais, refletindo o efeito de mudanças nos fatores ambientais, certamente importantes na patogênese da doença. A prevalência da DC nos Estados Unidos é de 43,6/100.000 habitantes da raça branca, 29,8/100.000 habitantes afro-americanos, 4,1/100.000 habitantes hispânicos e 5,6/100.000 habitantes de								
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2">Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar</td> </tr> <tr> <td>Bairro: Asa Norte</td> <td>CEP: 70.719-040</td> </tr> <tr> <td>UF: DF</td> <td>Município: BRASILIA</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (01)3315-5877</td> <td>E-mail: conep@saude.gov.br</td> </tr> </table>	Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar		Bairro: Asa Norte	CEP: 70.719-040	UF: DF	Município: BRASILIA	Telefone: (01)3315-5877	E-mail: conep@saude.gov.br
Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar								
Bairro: Asa Norte	CEP: 70.719-040							
UF: DF	Município: BRASILIA							
Telefone: (01)3315-5877	E-mail: conep@saude.gov.br							

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.237.201

atividade da doença e mesmo na sua evolução e prognóstico. O esperado, quando se transpõe esses conceitos para as condições potencialmente inflamatórias na mucosa de pacientes com doença inflamatória intestinal (DII), é que haja a possibilidade de se antever futuras transformações, dentro desta cascata inflamatória, que poderiam estar associadas à ocorrência das mesmas. Além disso, há grande interesse no desenvolvimento de biomarcadores sanguíneos nas DII que possam auxiliar no diagnóstico e prognóstico da enfermidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

EMENDA 1

Justificativa:

Emenda nº 1 que tem como objetivos:

- Incluir como membro da pesquisa o aluno de Doutorado, Bruno Lima Rodrigues, que irá realizar seu estudo com os dados provenientes do sequenciamento transcricional realizado e previsto no estudo já aprovado pelo CEP.

- Alterações no projeto: consistem na inclusão de mais um objetivo específico (estudo de transcritos das vias de estresse do retículo endoplasmático). Os pesquisadores irão estudar os transcritos que codificam proteínas das vias do estresse do retículo endoplasmático que apareceram diferencialmente modulados no sequenciamento realizado, e os resultados serão validados por qPCR e análise histológica, também metodologias já previstas no projeto.

Como esse objetivo específico estava contemplado nos objetivos gerais do projeto, não houve modificações nos TCLEs.

Centro participante:

Instituição: Hospital de Clínicas – UNICAMP

Pesquisador Responsável: Raquel Franco Leal

Centro co participante:

Instituição: Laboratório de Doenças Inflamatórias Intestinais, IDIBAPS, Barcelona

Pesquisador Responsável: Azucena Salas Martinez

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-040

UF: DF Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 4.237.201

Documentos Postados:

PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1578065_E1.pdf, gerado pela Plataforma Brasil 16/06/2020

PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_770243.pdf, postado na Plataforma Brasil em 16/06/2020

Carta_CEP.doc, postado na Plataforma Brasil em 16/06/2020

Carta_CEP.pdf, postado na Plataforma Brasil em 16/06/2020

Projeto_emenda_1.pdf, postado na Plataforma Brasil em 16/06/2020

Projeto_emenda_1.doc, postado na Plataforma Brasil em 16/06/2020

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Verificar item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram encontrados óbices éticos na presente emenda.

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação da emenda proposta ao projeto de pesquisa.

Situação: Emenda aprovada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1578065_E1.pdf	16/06/2020 16:32:51		Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CONEP_770243.pdf	16/06/2020 15:58:14	Raquel Franco Leal	Aceito
Outros	Carta_CEP.doc	16/06/2020 15:57:57	Raquel Franco Leal	Aceito
Outros	Carta_CEP.pdf	16/06/2020 15:56:08	Raquel Franco Leal	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_emenda_1.pdf	16/06/2020 15:55:44	Raquel Franco Leal	Aceito

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.719-040

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5877

E-mail: conep@saude.gov.br

8.2 Anexo 2 – Parecer de aprovação do Comitê de  tica em Pesquisa do Hospital Clínic

Xavier Carné Cladellas, Presidente del Comit   tico de Investigación
Clínica (CEIC) del Hospital Clínic de Barcelona.

CERTIFICA:

Que el Comit  de Investigación del Hospital Clínic, en la sesión
celebrada en el día de hoy, ha analizado el proyecto de investigación
titulado:

*Biologic Assessment of Response and relation to Clinical activity,
Endoscopic and radiologic Lesions, in IBD patients ON Anti TNF-
therapies (BARCELONA). V.1 de 25 d'octubre de 2012*

cuyo investigador principal es el Dr. **Pan s Díaz, Julián**

del Servicio de **Gastroenterología**

entendiendo que dicho estudio se incluye en una de las líneas de
investigación biomédica acreditadas en este centro, cumpliendo
los requisitos metodológicos necesarios, y que es viable en todos
sus términos, por lo que lo ha considerado adecuado y ha decidido
su aprobación.

Lo que firmo en Barcelona, a 22/11/2012



CLÍNIC
BARCELONA
Hospital Universitari
COMIT   TIC
INVESTIGACIÓ CLÍNICA

Registro: 2012 / 7956