

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDO GENÉTICO DA DOENÇA CELÍACA E DA
DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL**

ALESSANDRO CLAYTON DE SOUZA FERREIRA

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PREDISPOSIÇÃO GENÉTICA A DOENÇA
CELÍACA E A DOENÇA INFLAMATÓRIA
INTESTINAL**

Tese de doutorado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard

ALESSANDRO CLAYTON DE SOUZA FERREIRA

Belo Horizonte, Dezembro de 2008

Dedico este trabalho ao meu filho Miguel, que em pouco tempo se tornou meu esteio, se tornou minha fonte de alegria e paz. Com amor!!!

Dedico a Cristiane, pelo apoio incondicional. Pela força de sempre. Por seu amor!

Aos meus pais, pelo exemplo de vida. Em quem me espelho todos os dias!

Agradecimentos

À Professora Ana Lúcia Brunialti Godard por acreditar em mim mesmo quando eu duvidei. Pela extradiordinária força e determinação e pela confiança. Que esta conquista seja apenas o início de outras grandes conquistas.

À Pós-graduação em Genética do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, pelo apoio, ensinamento e agradável convivência durante todo tempo.

Ao Instituto Hermes Pardini, pela oportunidade que me foi concedida e pelo apoio na reta final.

Ao Dr. Victor Cavalcanti Pardini, pela amizade, franqueza e convívio.

À Karina Braga Gomes, pela eterna amizade.

Aos amigos do Departamento de Genética do Instituto Hermes Pardini, pela convivência, paciência e ajuda nos experimentos. Em especial à Vanessa Cristina e Frederico Scott, pelo brilhantismo de ambos.

Aos demais amigos do Instituto Hermes Pardini, pelo apoio, incentivo e torcida.

Aos membros da AMDII (Associação Mineira de Portadores de Doença Inflamatória Intestinal) que gentilmente aceitaram participar do estudo e que muito me motivaram a dar continuidade no mesmo.

A Sra. Raquel Benatti, da Associação de Celíacos do Brasil, regional RJ, e aos pacientes celíacos de todo Brasil, que participaram deste estudo.

Índice/Sumário

Lista de Figuras	VIII
Lista de tabelas e quadros	IX
Lista de Abreviaturas	XI
Resumo	11
Abstract	13
1. Introdução	14
1.1. Doença Celíaca	14
1.1.1 Genética	15
1.1.2 Epidemiologia	18
1.1.3 Diagnóstico	19
1.1.4 Tratamento	22
1.2 Doença Inflamatória Intestinal	23
1.2.1 Epidemiologia	24
1.2.2 Genética	25
1.2.3 Diagnóstico	26
1.2.4 Tratamento	27
2. Doença celíaca e DII	27
3. Objetivos	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivo específico	29
4. Material e métodos	31
4.1 Material Biológico	31
4.2 Grupo controle	31
4.3 Portadores de doença celíaca e familiares	31
4.4 Portadores de doença Inflamatória Intestinal e familiares	31
4.5 Extração de DNA	32
4.5.1 Swab Bucal	32
4.5.2 Sangue total em EDTA	32
4.6 Validação da Extração de DNA	33
4.7 Genotipagem de HLA por mini-sequenciamento	34
4.8 Detecção dos alelos de HLA por dHPLC	37

4.9 Validação das genotipagens de HLA feitas por mini-sequenciamento	40
4.10 Seqüenciamento das amostras	44
4.11 Genotipagem dos SNPs Arg702Trp, Gly908Arg, 980fs981 do gene NOD2/CARD15, A49G do Gene CTLA-4 e C3535T do gene de resistência Múltipla a Droga	40
4.11.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	41
4.11.2 Digestão enzimática dos fragmentos da Reação em Cadeia da Polimerase	42
4.12 Análise estatística	43
5. Resultados	44
5.1 Perfil demográfico dos pacientes com doença celíaca e DII	44
5.2 Extração de DNA a partir de papel de filtro	45
5.3 Genotipagem de HLA (Pedido de Patente Anexo I)	46
5.4 Frequência dos haplótipos DQ2 (DQB1*0201 e DQA1*05) e DQ8 (DQB1*0302 e DQA1*03).	47
5.5 Frequência alélica e genotípica e dos polimorfismos de base única	48
5.6 Associação da idade manifestação da doença celíaca e da doença inflamatória intestinal com o sexo dos indivíduos, haplótipo de HLA e os polimorfismos de base única.	52
6. Discussão	56
7. Conclusões	62
8. Bibliografia	63
ANEXO 1 – PATENTE REQUERIDA	69
ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	80
ANEXO 3 – Produção bibliográfica	81

Lista de Figuras

Figura 1. Achado histológico típico em paciente com doença celíaca.	14
Figura. 2. Desnutrição crônica causada pela intolerância ao glúten	15
Figura 3. Localização de polimorfismos genéticos na região CELIAC3 localizados no cromossomo 2q33	17
Figura 4 . Fluxograma de diagnóstico de doença celíaca	19
Figura 5 Principais diferenças entre a RCU e a DC no que se refere a área afetada pela doença, distribuição do processo inflamatório, achados histológicos e sintomas típicos	24
Figura 6 Esquema mostrando as diferentes análises realizadas para o diagnóstico da DII.	27
Figura 7 . Diagrama esquemático mostrando o princípio do mini seqüenciamento	34
Figura 8:.. Amplificação de G6PD nos diferentes tempos de armazenamento do papel de filtro após a impregnação com sangue total em EDTA	45
Figura 9. Eletroferograma da Cromatografia Líquida de Alta Performance desnaturante mostrando a identificação do alelo DQB1*0201.	46
Figura 10 Eletroferograma mostrando o perfil cromatográfico de quatro indivíduos com diferentes genótipos de HLA	47
Gráfico 1 Representação gráfico da tabela 14 – análise de componentes principais	53

Lista de tabelas e quadros

Tabela 1. Principais dados epidemiológicos descritivos da doença inflamatória intestinal	24
Tabela 2: Seqüência dos iniciadores e oligonucleotídeos usados na detecção dos haplótipos DQ2 e DQ8	35
Tabela 3: Previsão de tamanho de fragmentos em dHPLC e identificação alélica segundo a técnica de mini-sequenciamento desenvolvida	38
Tabela 4: seqüência dos iniciadores para a reação em cadeia da polimerase com seus respectivos tamanhos em pares de base	41
Tabela 5 Enzimas de restrição e os tamanhos dos fragmentos obtidos após a digestão enzimática do produtos de PCR.	42
Tabela 6 – Sexo, idade e idade ao diagnóstico dos pacientes com doença celíaca e com DII.	44
Tabela7: Frequência dos haplótipos DQ2 e DQ8 nos diferentes grupos estudados.	47
Tabela 8 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo SNP5 da região NOD2/CARD15 em pacientes com DII, doença celíaca e indivíduos saudáveis.	49
Tabela 9 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo Arg702Trp da região NOD2/CARD15 em pacientes com DII, doença celíaca e indivíduos saudáveis.	49
Tabela 10 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo Gly908Arg da região NOD2/CARD15 em pacientes com DII, doença celíaca e indivíduos saudáveis.	50
Tabela 11– Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo 980fs981 da região NOD2/CARD15 em pacientes com DII, doença celíaca e indivíduos saudáveis.	50
Tabela 12 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo 49 (A→G) do gene CTLA-4 em pacientes com DII, doença celíaca e indivíduos saudáveis.	51
Tabela 13 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo C3435T do gene MDR-1 em pacientes com DII, doença celíaca e indivíduos saudáveis.	51
Tabela 14: Coordenadas dos componentes principais e inércia explicada pelo sistema em relação a DII.	53
Tabela 15 Coordenadas dos componentes principais e inércia explicada pelo sistema em relação a DII.	54
Quadro 1 Programa usado para amplificação por PCR das regiões HLA DQA1 e DQB1	36

Quadro 2 Programa de extensão de base única usado para discriminação alélica	36
Quadro 3 Condições de corrida em dHPLC para a metodologia de detecção dos haplótipos de HLA DQ2 e DQ8.	37
Quadro 4 – Programa de PCR para amplificação dos polimorfismos descritos na tabela 4	41

Lista de abreviaturas

AGA	Anticorpo Antigliadina
DC	Doença de Crohn
ddNTP	dideoxynucleotídeo
dHPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance desnaturante
DII	Doença Inflamatória Intestinal
DNA	Ácido Desoxiribonucléico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
IgA	Imunoglobulina A
MHC	Complexo Maior de Histocompatibilidade
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RCU	Retocolite Ulcerativa
ACELBRA	Associação de Celíacos do Brasil
AMDII	Associação Mineira de Portadores de Doença Inflamatória Intestinal
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TEEA	Acetato de Trietilamonio
Na ₄ EDTA	Etilenodiaminotetracetato de sódio
ddGTP	Dideoxiguanidina
ddATP	Dideoximidina
ddCTP	Dideoxicitosina
tTG	Enzima Transglutaminase Tissular

Resumo

O sistema imune do trato gastro-intestinal é um sistema complexo que tem a função de autoproteção contra invasão de potenciais patógenos e é permissivo a produtos de digestão com alto poder imunogênico. Um grande número de patologias atinge este órgão, dentre elas, as de origem autoimune como a doença celíaca, a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), estas duas últimas chamadas de doenças inflamatórias intestinais (DII)

Apesar de clinicamente distintas, estas doenças parecem ter um *background* genético em comum, uma vez que ambas já foram associadas a região de HLA e a genes que controlam as reações imunológicas mediadas por células, principalmente por células T. Além disso, algumas doenças autoimunes como diabetes tipo 1, espondilite anquilosante e doença de Graves têm incidência aumentada tanto em celíacos quanto em pacientes com DII.

Nosso trabalho teve como objetivo analisar os polimorfismos do gene NOD2/CARD15, do gene MDR-1, do gene CTLA-4 e os haplótipos de HLA DQ2 e DQ8 no intuito de avaliar se tais marcadores estão associados com uma susceptibilidade comum a estas doenças. Além disso, desenvolvemos uma técnica baseada em mini-sequenciamento para tipagem dos haplótipos DQ2 e DQ8, de baixo custo, rápida e automatizável, podendo assim ser utilizada em laboratórios clínicos para triagem populacional ou auxílio diagnóstico além de uma técnica de extração de DNA proveniente de papel usado no teste do pezinho que possa ser utilizada em conjunto com a técnica de tipagem de HLA.

Nossos resultados mostraram que os polimorfismos do gene NOD2/CARD15, do gene MDR-1, do gene CTLA-4 e os haplótipos de HLA DQ2 e DQ8 parecem não estar associados a predisposição genética à DII. Entretanto, estes mesmos polimorfismos podem influenciar na idade de manifestação da mesma.

Os polimorfismos do gene NOD2/CARD15, do gene MDR-1 e do gene CTLA-4 não se mostraram associados à predisposição genética à doença celíaca, nem parecem influenciar na idade de manifestação da mesma. Entretanto, os haplótipos DQ2 e DQ8 mostraram-se altamente freqüentes em celíacos, confirmando assim os dados da literatura.

A técnica de extração de DNA, assim como a técnica para a identificação dos haplótipos DQ2 e DQ8 desenvolvidas em nosso trabalho, mostraram-se confiáveis, reprodutíveis e automatizáveis, tendo assim um provável uso em laboratórios clínicos.

Abstract

The immune system of the gastrointestinal tract is a complex system that has autoprotection function against invasion of potential pathogens, whereas it is permissive to digestion products with high immunogenic value. A great number of pathologies reach this organ, among them, the ones with autoimmune origin, such as celiac disease, Crohn disease (CD) and ulcerative colitis (UC), the last two also called inflammatory bowel diseases (IBD).

In spite of being clinically different, CD and UC seem to have a genetic background in common, since both were already associated to the HLA region and to genes that control the cell-mediated immunological reactions, mainly by T cells. Moreover, some autoimmune diseases such as diabetes type 1, espondilitis anquilosantis and Grave's disease are common in celiac patients and in patients with IBD.

Our study aimed to analyze polymorphisms of the genes NOD2/CARD15, MDR-1, CTLA-4 and of the DQ2 and DQ8 haplotypes in order to evaluate if such markers were associated to a common susceptibility to such diseases. We were also able to develop a technique based in primer extension for typing of the DQ2 and DQ8 haplotypes, with low cost, fast results and with a possibility for automation, to be used in clinical laboratories for population screening or to aid diagnosis. It is also our goal to develop a technique of extracting DNA from the same kind of paper used in the neonatal screening, which can be used together with the technique of HLA typing.

Our results pointed out that genes NOD2/CARD15, MDR-1, and CTLA-4's polymorphisms and HLA DQ2 and DQ8 seem not to be associated to genetic predisposition to IBD. However, these polymorphisms were able to influence the age onset of these diseases.

The results were not able to find an association between gene's polymorphisms NOD2/CARD15, MDR-1 and CTLA-4's polymorphisms with genetic predisposition to celiac disease, nor do these polymorphisms seem to influence the age of onset of this disease. Nevertheless, DQ2 and DQ8 haplotypes were found frequently in celiac patients, confirming current literature data.

The technique for the identification of DQ2 and DQ8 haplotype, developed in our work proved to be reliable, and could potentially be used in clinical laboratories.

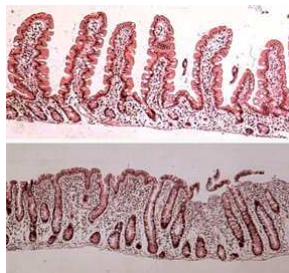
1. Introdução

O sistema imune do trato gastro-intestinal é um sistema complexo que tem a função de autoproteção contra invasão de potenciais patógenos e é permissivo a produtos de digestão com alto poder imunogênico, assim como a própria microbiota. Apesar disso, um grande número de patologias atinge este órgão, como, por exemplo, as patologias que envolvem distúrbios nos mecanismos imunológicos fundamentais (JAMES, 2005).

Entre as principais doenças de origem autoimune que afetam o trato gastro-intestinal podemos citar três, levando em conta o número de pessoas afetadas em todo o mundo e também as severas conseqüências para os pacientes: a doença celíaca, a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU), estas duas últimas chamadas de doenças inflamatórias intestinais (DII). Mesmo sendo entidades clínicas bem distintas, de maneira interessante, vários estudos demonstram uma relação entre essas doenças do ponto de vista de predisposição genética, uma vez que ambas já foram associadas a região de HLA e ao gene CTLA-4, e de incidência mútua, sendo que a incidência de DII entre os indivíduos celíacos é maior que na população de um modo geral (COTTONE et al., 2003; YANG et al., 2005; LEEDS et al., 2007;)

1.1 Doença celíaca

A doença celíaca é uma enteropatia sensível ao glúten ou, como é mais conhecida, é uma doença inflamatória autoimune que acomete o intestino, precipitada por ingestão de glúten, um componente do trigo, em indivíduos geneticamente susceptíveis. Nesses pacientes ocorre uma destruição da mucosa intestinal (Figura 1), principalmente da parte proximal do intestino delgado, causando um quadro de má absorção intestinal, o que gera sintomas e achados clínicos secundários, como desnutrição crônica (Figura 2) (DICKIE et al., 1953; SCHUPPAN, 2002).



A

B

Figura 1. Achado histológico típico em paciente com doença celíaca. A - vilosidades intestinais íntegras e B – vilosidades intestinais com achatamento, provocado pela destruição das vilosidades.

Fonte - DAVID A. NELSEN JR in Gluten-Sensitive Enteropathy (Celiac Disease): More Common Than You Think Am Fam Phvsician 2002;66:2259-66.2269-70.

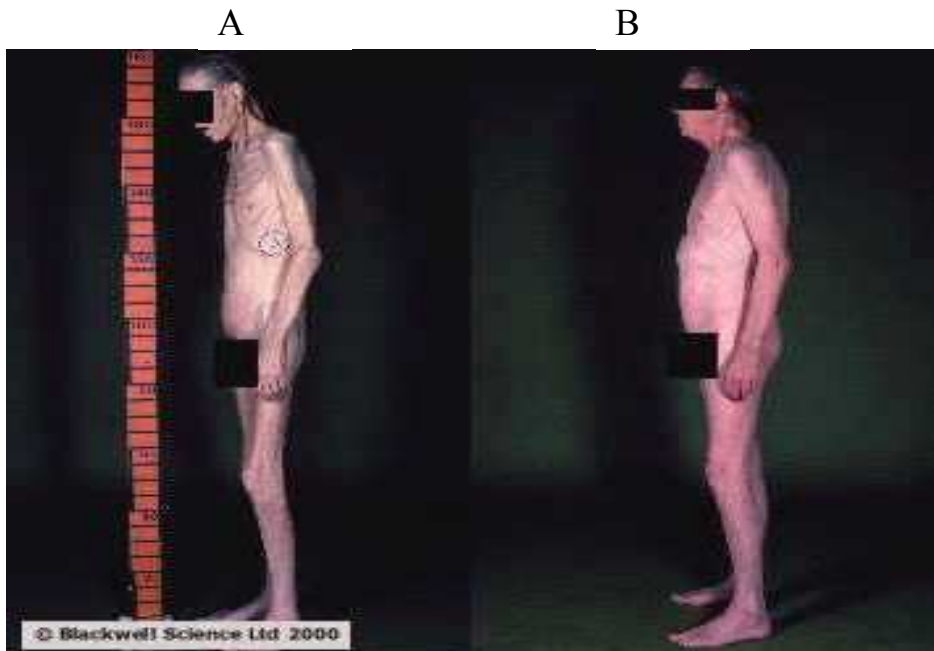


Figura. 2: Desnutrição provocada pela doença celíaca. Em A, paciente com quadro de desnutrição crônica. Em B, mesmo paciente mostrando recuperação do quadro de desnutrição seis meses após retirada do glúten na alimentação.

Fonte - Dr. Stephen Malnick, Kaplan Medical Center, Rehovot, Israel & Perkin Elmer - Finlândia

O pediatra alemão Willem Dicke foi o primeiro pesquisador a descrever a doença celíaca como uma doença causada por componentes da alimentação, quando identificou que alguns pacientes tiveram um melhora significativa do quadro clínico durante o período em que estiveram nos campos de batalha da Segunda Guerra Mundial, período este em que os indivíduos passaram por escassez alimentar. Surpreendentemente esses pacientes pioraram o quadro clínico ao retornarem dos campos de batalha e retomarem a dieta normal. Devido a essas observações, este mesmo pesquisador concluiu que proteínas derivadas do glúten eram as responsáveis pelos sintomas típicos da doença celíaca, que são diarreia, desnutrição, retardo no crescimento e inflamação no intestino delgado, além de esteatorréia, dermatite herpetiforme, aborto, etc. (DICKIE et al., 1953; SCHUPPAN, 2002; FARREL et al., 2002; JABRI et al., 2006).

1.1.1 Genética

Existe uma forte associação da doença celíaca com susceptibilidade genética, sendo 75% a taxa de concordância da doença entre gêmeos idênticos (GRECO *et al.*, 2002).

É importante salientar o fato de que parentes de primeiro grau de pacientes com biópsia positiva para doença celíaca têm aproximadamente 4% a 12% de probabilidade de desenvolver a doença. Os parentes de segundo grau também possuem maior probabilidade de desenvolver a doença do que a população em geral. Além disso, sabe-se que pacientes com diabetes

mellitus tipo 1 tem prevalência de doença celíaca na faixa de 3% a 8%. Em pacientes com Síndrome de Down, a prevalência de doença celíaca chega a ser de 5% a 12%. Além disso, a doença celíaca está associada com a síndrome de Turner, a síndrome de William's, a doença de Addison, a deficiência de IgA e várias desordens autoimunes (COLLIN *et al.*, 2002; O'LEARY *et al.*, 2002).

Vários trabalhos indicam uma forte associação entre a doença celíaca e a região de HLA (Antígeno Leucocitário Humano) (TOSI *et al.*, 1986; SACHS *et al.*, 1986, LOUKA & SOLLID, 2003, BOURGEY *et al.*, 2007). A região de HLA é um cluster de genes presentes no cromossomo 6 que codificam glicoproteínas encontradas na superfície da maioria das células. São essas proteínas que auxiliam o sistema imunológico a distinguir o que é próprio do organismo (por exemplo, células beta do pâncreas) do que é exógeno (por exemplo, proteínas de vírus e bactérias) (BELL *et al.*, 1985, KORMAN *et al.*, 1985, ERLICH *et al.*, 1986).

Os genes de HLA codificam proteínas do chamado “complexo maior de histocompatibilidade” ou MHC. Existem duas classes principais de proteínas MHC: o MHC de classe I, presente no interior das células, e o MHC de classe II, expressas na superfície celular. Em teoria, as células do sistema imunológico, em especial as células T, auxiliadas pelas proteínas codificadas por genes de HLA, deveriam ligar-se apenas a proteínas exógenas. Entretanto, em algumas ocasiões, essas células acabam ligando-se a proteínas próprias do organismo, ocasionando as chamadas doenças autoimunes, como diabetes tipo 1 (BELL *et al.*, 1985, KORMAN *et al.*, 1985, ERLICH *et al.*, 1986).

A doença celíaca é restrita a populações que possuem os fenótipos de HLA DQ2 e DQ8, comumente encontrados na Europa, Índia, norte da África, América do Norte e em populações miscigenadas como a brasileira (GRECO *et al.*, 2002), sendo que 95% dos pacientes possuem o fenótipo DQ2, codificado pelos alelos DQA1*0501 e DQB1*0201, e uma pequena porcentagem possuem o fenótipo DQ8, codificado pelos alelos DQA1*0301 e DQB1*0302 (KARREL *et al.*, 2003; MAZZARELLA *et al.*, 2003; BOURGEY *et al.*, 2007). A frequência desses alelos em indivíduos não celíacos varia de população para população, sendo em média 30% a frequência encontrada para o haplótipo DQ2, e 4% a 10% para o haplótipo DQ8 (BOURGEY *et al.*, 2007).

Testes *in vitro* mostram que peptídeos antigênicos do glúten, principalmente os ricos em prolina, quando ligados à moléculas de HLA-DQA1*0501/B1*0201 estimulam células T de pacientes com doença celíaca (MAZZARELLA *et al.*, 2003, HENDERSON *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2004). A associação do HLA com a doença celíaca pode ser explicada pela maior habilidade dos haplótipos DQ2 e DQ8 em se ligar a estes peptídeos ricos em prolina, que não foram

totalmente digeridos pelo sistema gastrointestinal e que foram desaminados pela enzima transglutaminase tecidual (MAZZARELLA et al., 2003, HENDERSON et al.,2007; KIM et al., 2004).

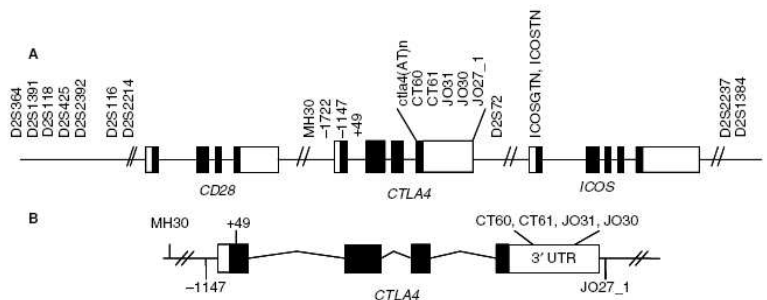
Apesar da forte associação do sistema HLA na doença celíaca, sabe-se que os haplótipos DQ2 e DQ8 são necessários, mas não suficientes para causar a doença. Outros genes, fora do sistema HLA, foram descritos como possíveis genes associados ao surgimento da doença (KING et al., 2002; MORA et al., 2003; SUSI et al.,2001; AMUNDSEN et al., 2004).

A região CD28/CTLA1/ICOS, presente no cromossomo 2q33 (CELIAC3) tem sido identificada como fator de predisposição à doença celíaca em diversas populações estudadas (KING et al., 2002; MORA et al., 2003; AMUNDSEN et al., 2004).

Esses três genes estão envolvidos diretamente na regulação da resposta imune mediada por linfócitos T, exercendo um papel de modulador da resposta imune. O fato de a ativação pelo glúten das células T presentes nas mucosas ser fator crítico no desenvolvimento da doença, faz com esta região seja forte candidata à susceptibilidade à doença celíaca. As evidências de associação entre a região CD28/CTLA-4/ICOS têm sido obtidas principalmente de estudos de associação e dados de estudos de ligação (AMUNDSEN et al., 2004). Dentre esses genes, o CTLA-4, apresenta-se como um dos mais importantes na susceptibilidade genética às doenças imunes medidas por células T, como o diabetes tipo 1, doença de Graves e doença celíaca (ABE et al., 2001; MORA et al., 2003, ZALLOULA et al., 2004).

Vários polimorfismos foram descritos nesta região (Figura 3), sendo que dentre estes destacam-se a transição de uma adenina para uma guanina (A→G) na posição 49 no primeiro exon do gene CTLA-4 e um microsatélite do tipo (AT)_n na extremidade 3' do mesmo. Apesar de ambos polimorfismos alterarem a função da molécula de CTLA-4, os prováveis mecanismos são diferentes. O plomorfismo (A→G) na posição 49, gera uma substituição de um aminoácido na molécula protéica e o polimorfismo (AT)_n na extremidade 3' do mesmo parece estar associado à instabilidade de RNA mensageiro(KING et al., 2002, FAJARDY et al., 2002).

Figura 3 - Localização de polimorfismos genéticos na região CELIAC3 presente no cromossomo 2q33. Em A, os vinte e dois polimorfismos já descritos na região. Em B, os principais polimorfismos do gene CTLA-4.



1.1.2 Epidemiologia

A incidência da doença é de aproximadamente 1% da população nos Estados Unidos e Europa, mas presume-se que grande parte dos pacientes não são diagnosticados devido ao fato de não apresentarem sintomas claros. Desta forma, podemos estimar um total de 3 milhões de pessoas afetadas na Europa e outras três milhões afetadas nos Estados Unidos, constituindo assim a maior prevalência mundial de doença (FERGUSON et al., 1993; FASANO et al., 2003).

Existe apenas uma população cuja incidência é maior do que a encontrada nas populações da América do Norte e da Europa que são os Saharawui, grupo étnico que habita o norte da África, cuja prevalência de doença celíaca pode chegar a 5% ou mais (YACHA et al., 1993).

Um fato que merece destaque é que nos países do Leste Asiático a prevalência da doença celíaca certamente está subestimada tendo em vista os hábitos alimentares das populações que lá habitam e que são baseados mais em arroz do que em trigo e em cevada (RODRIGO, 2006). Como estimativa, se assumirmos a população da China como sendo de 1 bilhão de pessoas, podemos chegar ao número de 10 milhões de celíacos neste país (considerando prevalência de 1%) (RODRIGO, 2006).

A doença celíaca também possui alta prevalência nos países e regiões do Oriente Médio, como Anatólia (sul da Turquia), Líbano, Síria, Palestina e Iraque (ROSTAMI et al., 2004).

Pelo exposto, pode-se observar que a doença celíaca possui uma alta prevalência em várias regiões e países do mundo, sendo isto um problema de saúde pública principalmente em países em desenvolvimento onde os métodos de diagnósticos e os alimentos livres de glúten não são de fácil acesso (RODRIGO, 2006).

1.1.3 Diagnóstico

Desde os anos 50, vários métodos têm sido desenvolvidos para diagnosticar e entender a patogênese da doença celíaca, sendo que, atualmente, testes sorológicos e a biópsia

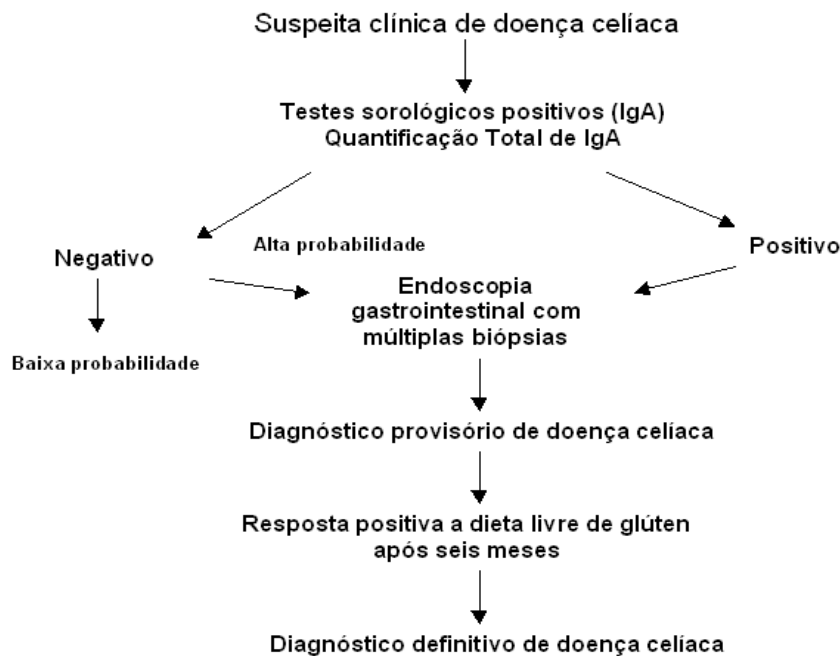


Figura 4. Fluxograma de diagnóstico de doença celíaca. Após suspeita clínica de doença celíaca se devem ser realizados os testes sorológicos para gliadina e tTG. Em caso de resultado positivo, é realizado uma endoscopia de multiplas biópsias onde já pode ser obtido o diagnóstico provisório. O diagnóstico definitivo só é obtido após melhora clínica com de dieta livre de glúten. Em alguns casos, mesmo com resposta negativa dos anticorpos IgA, a endoscopia também é indicada

intestinal têm sido utilizados rotineiramente para diagnóstico laboratorial da doença celíaca (SDEPANIAN et al., 1999; DIETERICH et al., 1998). De uma maneira geral, o diagnóstico segue o fluxograma apresentado na figura 4 (RODRIGO, 2006).

Entre os testes sorológicos necessários para o diagnóstico de doença celíaca, a dosagem do anticorpo antigliadina IgA (AGA) foi utilizada durante anos, mas atualmente está praticamente abandonada devido a sua baixa sensibilidade e especificidade (cerca de 50%). Em 1997, a enzima transglutaminase tissular 3 (tTG) foi estabelecida por Dieterich e colaboradores (DIETERICH et al., 1998) como sendo o autoantígeno para os anticorpos antiendomísio e desde então este marcador, IgA para tTG, é o mais utilizado no diagnóstico clínico devido ao fato de possuir uma boa sensibilidade (maior que 90%) e especificidade (cerca de 95%), apesar das variações existentes entre os kits comerciais (FERNANDEZ et al., 2005).

É importante chamar a atenção ao fato de que, 1,7% a 2,6% dos pacientes com doença celíaca apresentam deficiência de IgA, e neste caso, a mensuração de IgG para tTG é recomendado (CATALDO et al., 1998).

Entretanto, a presença desses anticorpos correlacionados com o grau de atrofia das vilosidades intestinais e vários outros estudos têm claramente mostrado que a sensibilidade do teste de tTG diminui em pacientes com biópsias duodenais normais ou com mudanças histológicas moderadas (RODRIGO, 2006).

É importante salientar que, o diagnóstico de doença celíaca baseado somente em testes sorológicos não é aceito, uma vez que tais testes podem apresentar resultados falso positivos e falso negativos. Sendo assim, a verificação das mudanças da mucosa duodenal, através de exame endoscópico, é necessária antes da introdução da chamada “dieta livre de glúten” (RODRIGO, 2006).

Como conclusão, pode-se afirmar que na prática clínica, testes sorológicos são freqüentemente usados para identificar tanto indivíduos sintomáticos quanto indivíduos assintomáticos de risco, que necessitarão de biópsia intestinal para confirmar o diagnóstico (SDEPANIAN et al.,1999; RODRIGO, 2006). Tal biópsia baseia-se na análise de três fragmentos de intestino, coletados em procedimento de endoscopia gastro-intestinal na segunda porção do duodeno. Nos fragmentos de biópsias de pacientes celíacos, podem ser observados infiltrado inflamatório de células T, atrofia das vilosidades intestinais e finalmente uma recuperação destas vilosidades após a retirada de glúten (RIESTRA et al.,2006).

Os achados da biópsia intestinal devem ser analisados em detalhe por patologistas experientes e interpretados de acordo com os critérios de Marsh's, que estratificam a doença em quatro tipos de estágios: o estágio zero, com biópsia duodenal normal; o estágio 1, com aumento acima de 30% do percentual de linfócitos intraepiteliais; o estágio 2, com presença de hiperplasia críptica e infiltrado inflamatório na lâmina própria, mas com vilosidades preservadas; o estágio 3, em que já se encontra atrofia nas vilosidades divididas em três níveis (médio, moderado e total ou subtotal); e finalmente o estágio 4, caracterizado pela hipoplasia total da mucosa, condição raramente vista (RIESTRA et al.,2006).

Vale a pena ressaltar o fato de as anormalidades histológicas da doença celíaca poderem ser completamente resolvidas com uma dieta livre de glúten em longo prazo, fazendo com que pacientes submetidos a este tipo de dieta tenham resultados negativos de biópsia. Da mesma maneira, os títulos dos autoanticorpos podem também diminuir e até se tornarem negativos nos testes sorológicos em pacientes submetidos a este tipo de dieta (ABDULKARIM et al., 2002, CULLIFORD & GREEN, 2003).

Esses últimos fatos fazem com que testes laboratoriais, tanto sorológicos quanto imunológicos sejam comprometidos dependendo do tipo de dieta ao qual o paciente esteja submetido (JAMES, 2005).

Os testes baseados na tipagem de HLA podem ser muito úteis na triagem de indivíduos assintomáticos, mas que apresentam riscos de desenvolver a doença (parentes de indivíduos celíacos) e no auxílio diagnóstico de indivíduos submetidos a dieta livre de glúten, uma vez que a ausência dos HLAs DQ2 e DQ8 geralmente exclui a possibilidade da doença. Esses haplótipos de HLA (DQ2 e DQ8) estão presentes em 35% a 40% da população em geral, sendo que em indivíduos celíacos esta frequência chega a ser de 90% a 95% (SACHS et al., 1986; BOURGEY et al., 2007)

A determinação ou tipagem de HLA pode ser realizada de várias maneiras: testes envolvendo citotoxicidade, a citometria de fluxo e métodos de biologia molecular (International Histocompatibility Working Group, 2006; KAUKINEN et al., 1997; DEWAR et al., 2004).

Várias metodologias e *kits* comerciais têm surgido e vêm sendo oferecidos para a tipificação dos alelos e haplótipos de HLA sendo que as metodologias mais utilizadas no momento são o PCR-SSP (Reação em Cadeia da Polimerase utilizando *primers* com seqüência específica) e o chamado PCR-SSO (Reação em Cadeia da Polimerase – Oligonucleotídeos seqüência específicos).

Com base nessas duas metodologias, várias empresas oferecem aos laboratórios que realizam tipagem de HLA *kits* comerciais contendo conjuntos de *primers* para detecção de vários HLAs. Alguns destes *kits* oferecem um conjunto de *primers* para tipagem dos HLAs A, B, DR, DQ e DP através da metodologia PCR-SSP (DynaL®, Molecular Probes®, etc.). Outros *kits* podem ser conseguidos com a metodologia PCR-SSO cujos “oligos” podem ser marcados com moléculas emissoras de luz cuja emissão pode ser detectada por fluorômetros (Wallac Perkin Elmer®).

Apesar da facilidade de uso e da comodidade de tais *kits*, uma grande desvantagem apresentada pelos mesmos é o alto custo das genotipagens, principalmente quando não se quer determinar o perfil completo de HLA de um indivíduo, mas sim identificar um determinado alelo ou haplótipo de HLA. Como exemplo, para se determinar se um indivíduo tem ou não o HLA B27, alelo associado à doença espondilite anquilosante, o uso do *kit* obriga o laboratório a genotipar praticamente todo o HLA B do indivíduo. A mesma situação se aplicaria na identificação dos HLAs envolvidos na doença celíaca.

Baseado nesse fato, vários autores têm proposto metodologias para genotipagem de HLA, em que seja possível tipificar HLAs específicos levando em consideração sua finalidade (diagnóstico de doenças específicas) e seu custo para o usuário (KAUKINEN et al., 1997; REINTON et al., 2006; OLERUP et al., 1993).

Entretanto, vale ressaltar que a grande maioria dessas metodologias propostas envolve processos manuais, como eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida, hibridação em suporte sólido etc, que dificilmente podem ser utilizadas em triagens nas quais é necessário genotipar um grande número de indivíduos (International Histocompatibility Working Group, 2006).

1.1.4 Tratamento

O tratamento da doença celíaca baseia-se na exclusão do glúten da dieta por longo prazo. Tal dieta substitutiva é chamada clinicamente “dieta livre de glúten”, podendo ser encontrada na literatura também como GFD (do inglês *gluten free diet*). Os alimentos que contém glúten são geralmente substituídos por outros à base de, principalmente, arroz, milho e seus derivados (JAMES, 2005; SCHUPPAN, 2002).

Leite e derivados devem ser evitados nas primeiras semanas da dieta livre de glúten para não ocasionar intolerância à lactose secundária à doença celíaca. Além disso, cerveja, whisky e outras bebidas que envolvam cereais no processo de fermentação devem ser completamente evitados (JAMES, 2005; SCHUPPAN, 2002; POLANCO et al., 2008).

Vale ressaltar que a dieta livre de glúten é uma dieta completa e saudável e é o único tratamento que os pacientes com doença celíaca precisam em longo prazo. A adesão à dieta é o fator de complexidade, pois a farinha de trigo está presente na maioria dos alimentos e aditivos alimentares. Pacientes que não respondem à dieta livre de glúten devem ser reavaliados clinicamente (POLANCO et al., 2008).

Apesar dos benefícios da dieta livre de glúten, sua implementação é difícil nas sociedades ocidentais incluindo os países em desenvolvimento, onde o consumo de cereais vem crescendo ao longo dos anos e grande parte da dieta da população é baseada em cereais, especialmente trigo. Várias organizações e associações multi-profissionais são formadas com o intuito de orientar os pacientes celíacos na composição de sua dieta e também para prover apoio médico e psicológico. Com a retirada do glúten, observa-se a remissão de todos os sintomas a partir da segunda semana (POLANCO et al., 2008).

1.2 Doença Inflamatória Intestinal (DII)

As doenças inflamatórias crônicas intestinais idiopáticas são doenças caracterizadas, basicamente, por inflamação e ulceração no intestino e são predominantemente divididas em duas: doença de Crohn (DC) e retocolite ulcerativa (RCU) (PODOLSKY, 1991; PODOLSKY, 2002; THORENSEN & CULLEN, 2007).

As condições clínicas destas doenças, mostram claramente um exemplo clássico de desordem multifatorial, com uma hipótese de predisposição genética com manifestação de fenótipo após exposição a um ou uma série de fatores ambientais (PODOLSKY, 1991; CALKINS & MENDELOFF, 1995; ALLAN et al., 1997; PODOLSKY, 2002; THORENSEN & CULLEN, 2007).

Estas duas doenças são entidades clínicas distintas, tendo sinais, sintomas e características microscópicas diferentes. Entretanto devido a várias similaridades, incluindo o processo inflamatório no sistema gastrointestinal, serão consideradas juntas em vários pontos em nosso trabalho.

A DC é uma síndrome de causa desconhecida caracterizada por uma inflamação crônica e recorrente do trato gastrointestinal. Esta inflamação pode acometer qualquer parte do tubo digestivo, entretanto é mais comumente localizada no íleo terminal, cólon e intestino delgado (THORENSEN & CULLEN, 2007; PODOLSKY, 1991; PODOLSKY, 2002). A DC pode acometer toda espessura da parede intestinal e levar a complicações sérias, como fístulas e estenoses do intestino e freqüentemente requer tratamento cirúrgico. Os sintomas mais comuns são diarreia, dor abdominal, fadiga, perda de peso, dor retal, febre, náusea, vômito, retardo de crescimento em crianças, dispepsia, artralgias e lesões na pele (*pyoderma gangrenosum*) (JAMES, 2005; PODOLSKY, 2002, ALLAN, 1997). Acomete homes e mulheres na mesma proporção, sendo que o surgimento da doença em relação à faixa etária geralmente é bimodal, com um pico na adolescência e idade adulta jovem, onde surgem a maioria dos casos e outro após os cinquenta anos ou mais (ALLAN, 1997).

A RCU é caracterizada por um processo inflamatório não infeccioso do trato gastrointestinal, limitado ao reto e ao cólon, onde a inflamação acomete apenas a mucosa e a submucosa do intestino. Diferentemente da DC, o processo inflamatório se manifesta de maneira contínua, proximamente a partir do reto, sendo os principais sintomas o sangramento retal, a diarreia, a dor abdominal e a perda de peso. O figura 3 apresenta as principais diferenças entre DC e RCU.

Tanto a DC quanto a RCU têm grande impacto financeiro no sistema de saúde pública, uma vez que, tanto o diagnóstico, quanto o tratamento são de alto custo para o Estado. É importante salientar que não é raro os pacientes com estas doenças se excluírem do convívio social e do trabalho, tanto devido à clínica das doenças, quanto à fatores psicológicos.

	RCU	DC
Área afetada	Cólon	Boca ao ânus
Distribuição	Contínua	Descontínua
Achados Histológicos	Úlceras superficiais, atinge mucosa e submucosa	Úlceras aftosas, granuloma transmural
Sintomas típicos	Sangramento retal, diarreia, dor abdominal, perda de peso	Dor abdominal, diarreia, febre, perda de peso, fistulas

Figura 5. Principais diferenças entre a RCU e a DC no que se refere a área afetada pela doença, distribuição do processo inflamatório, achados histológicos e sintomas típicos

1.2.1 Epidemiologia

Os principais dados epidemiológicos da DC e da RCU estão apresentados na tabela 1.

Dados	DC	RCU
Incidência (por 100.000 hab.)	0,5 a 13	0,08 a 7
Prevalência (por 100.000 hab.)	35 a 100	10 a 100
Idade	Entre 20 a 40 anos; com 2º pico entre 50 e 80 anos	
Etnia	Branco > negro > asiáticos	
Nível sócio econômico	Atinge mais indivíduos com nível socioeconômico mais alto, frequentemente que trabalham em ambientes fechados	
Países	Maior incidência e prevalência em países desenvolvidos do que em países em desenvolvimento.	

Tabela 1. Principais dados epidemiológicos descritivos da doença inflamatória intestinal

Múltiplos achados sugerem que a DII resulta de interações entre vários genes de susceptibilidade, alterações imunológicas da mucosa e da microbiota do intestino. Alguns modelos animais, como, por exemplo, animais deficientes de receptor de células T, desenvolvem inflamação intestinal crônica naturalmente. Na maioria dos modelos animais, a doença é dominada por perfil de citocinas TH1, e de uma maneira interessante, condições que aumentam citocinas TH2, como infecção intestinal de parasitas, tendem a melhorar o quadro inflamatório, o que reforça a tese de que o estilo de vida de países industrializados, com melhora das condições sanitárias e diminuição das parasitoses, contribui para o aumento da incidência da DC (MOREELS et al., 2004, NASER et al., 2004; DARFEUILLE-MICHAUD et al., 2004).

1.2.2 Genética

Existe uma importante contribuição genética relacionada ao surgimento da DC e da RCU. Esta contribuição pode ser demonstrada pela maior prevalência da doença em parentes de pacientes com DC e RCU, sendo que esta prevalência chega a ser de 2 a 13 vezes maior do que na população geral. Além disso, estudo de gêmeos demonstram uma concordância de 20% a 50% para DC em gêmeos monozigóticos, e de 16% em gêmeos dizigóticos (CALKINS & MEDELOFF, 1995; KUSTER et al, 1989).

Através de estudos de ligação, foi demonstrada a associação entre a DII e uma região do cromossomo 16, localizada em 16q12, identificada como o gene NOD2/CARD15, que foi denominada IBD1 (Inflammatory Bowel Disease 1) (HUGOT, et al., 1996). O gene NOD2/CARD15 é responsável pela codificação de uma proteína intracelular conhecida como NOD2, presente nas células apresentadora de antígenos como macrófagos, células dendríticas, células epiteliais, etc., células estas que compõem o sistema imune inato, primeira barreira de proteção do sistema gastrointestinal (HUGOT, et al., 1996; HUGOT, et al., 2001).

A identificação do IBD1 foi realizada por clonagem posicional com uma demonstração inicial em que três alelos do locus NOD2/CARD15, presentes no cromossomo 16, eram co-segregados com a doença em indivíduos afetados por DC em famílias européias (HUGOT, et al., 1996). Estes três alelos, Arg702Trp, Gly908Arg, 980fs981, mostraram freqüências aumentadas em indivíduos afetados (0.11, 0.06 e 0.12 respectivamente) em comparação com seus parentes não afetados (0.04, 0.01 e 0.02 respectivamente), com risco relativo ao genótipo para todos os três alelos de 3 para heterozigotos, 38 para homozigotos e 44 para heterozigotos compostos (HUGOT, et al., 2001; OGURA et al., 2001; SHAOUL et al., 2004).

Aproximadamente 50% dos pacientes com DC apresentam mutações nesse gene, que parece estar envolvido na imunidade ligada a peptídeoglicanos de bactérias (OGURA et al., 2001; SHAOUL et al., 2004). Esse mesmo gene, parece também estar associado à RCU, tendo sido demonstrado um risco relativo a doença menor ao encontrado na DC. Na RCU os alelos Arg702Trp, Gly908Arg tem em média um risco relativo de 7,52 e 4,31 respectivamente (GAZOULI, et al., 2005)

Outros genes têm sido descritos em associação com a DC e RCU, como um cluster de citocinas localizado em 5q31, e a região de HLA, onde o genótipo DRB30301/DRB11302 parece estar associado à susceptibilidade genética à doença de Crohn (CARIAPA et al., 1998).

Recentemente, um membro da superfamília ABCB1 (*adenosine triphosphate Y binding cassette superfamily*), conhecido como MDR-1, uma P-glicoproteína (PGP)-170, tem sido associado ao surgimento de DII com base na sua localização em uma região sugestiva de ligação genética localizada no cromossomo 7q (PANWALA et al., 1998, ARDIZZONE et al., 2007).

PGP-170 é expressa em várias células e tecidos humanos, incluindo linfócitos do sangue periférico e células epiteliais da membrana apical do jejuno e cólon. A PGP-170 exerce uma função na proteção e prevenção de apoptose assim como na imunidade mediada por células, por promoverem a migração de células apresentadoras de antígenos do sangue periférico para os linfonodos, iniciando a resposta de linfócitos T (SMYTH et al., 1998, RANDOLPH et al., 1998, HOFFMEYER et al. 2000)

O gene ABCB1 tem aproximadamente 200.000 bases e possui 28 exons com dois sítios de início de transcrição e tem se mostrado altamente polimórfico. Recentemente o polimorfismo de base única (SNP) C3435T no éxon 26 tem sido foco da atenção de vários pesquisadores principalmente pelo fato de estar associado com o nível de atividade e expressão da PGP-170 (RANDOLPH et al., 1998).

1.2.3 Diagnóstico

O diagnóstico da DII é baseado em achados clínicos, laboratoriais, radiológicos, endoscópio e anatomopatológicos (PODOLSKY, 1991; CALKINS & MENDELOFF, 1995; ALLAN et al., 1997; PODOLSKY, 2002; THORENSEN & CULLEN, 2007) resumidos na figura 6.

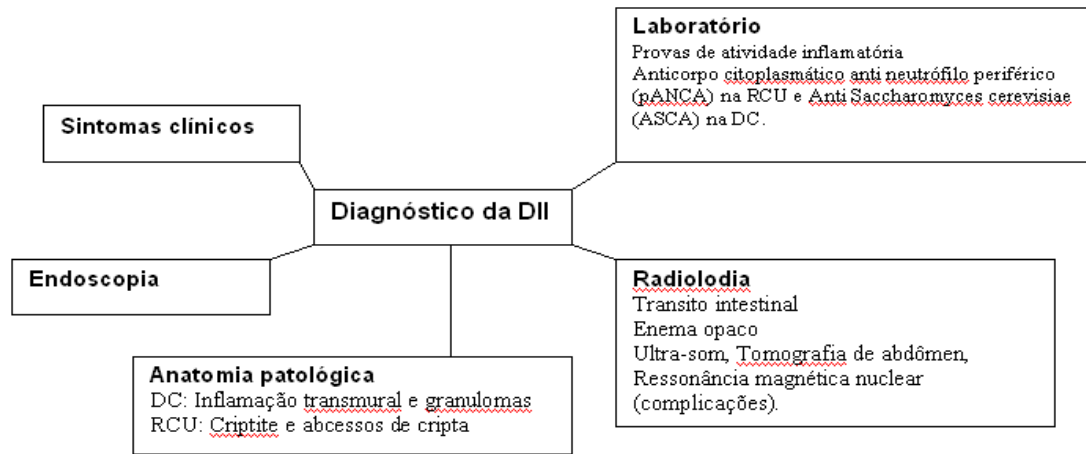


Figura 6 - Esquema mostrando as diferentes análises realizadas para o diagnóstico da DII. O diagnóstico é feito analisando a sintomatologia clínica, resultados de endoscopia, anatomia patológica, radiologia e provas laboratoriais.

1.2.4 Tratamento

O tratamento das doenças inflamatórias intestinais é extremamente complexo e envolve geralmente o uso de imunomoduladores. As drogas disponíveis para tratamento são os aminossalicilatos (como sulfassalazina e ácido 5-aminossalicílico), corticóides e imunomoduladores (como azatioprina, 6 mercaptopurina, ciclosporina, metotrexato e tracolimus) (PODOLSKY, 2002; THORENSEN & CULLEN, 2007)

Recentemente a chamada terapia biológica tem se mostrado como grande avanço no tratamento da DII. As drogas desta categoria atualmente disponível é o Infliximabe, um anticorpo monoclonal quimérico anti-TNF e o andalimumabe, um anticorpo humanizado anti-TNF (THORENSEN & CULLEN, 2007).

Em ambas as doenças, RCU e DC, a abordagem cirúrgica ainda é usada em um grande número de pacientes (PODOLSKY, 1991; CALKINS & MENDELOFF, 1995; ALLAN et al., 1997; PODOLSKY, 2002; THORENSEN & CULLEN, 2007).

2. Doença celíaca e DII

A doença celíaca e a DII, são entidades clínicas diferentes do ponto de vista de sintomatologia, achados micro e macroscópicos e tratamento. Entretanto alguns fatores importantes falam a favor de ambas terem um “background” genético em comum (RODRIGO, 2004, JAMES, 2005)

Neste sentido, ambas já foram associadas a região de HLA e a genes que controlam atividade de células T, como o gene CTLA-4, o NOD2/CARD 15 e o gene MDR-1. Além disso de uma maneira interessante, existe uma maior incidência de DII em pacientes com doença celíaca (NEUHAUSEN, 2008).

Outro ponto interessante é o fato de que, algumas doenças de natureza autoimune, como espondilite anquilosante, diabetes tipo 1, tireoidite e doença de Graves, serem mais comuns em pacientes com doença celíaca e DII (RODRIGO, 2005; HADITHI, 2007).

Desse modo, torna-se importante verificar se os genes descritos como predisponentes ao surgimento de uma delas (à doença celíaca por exemplo) são importantes no surgimento da DII e vice-versa.

Além disso, alguns dos genes citados neste trabalho, são usados na prática clínica como auxílio diagnóstico da DII em alguns países da Europa. Faz-se necessário então, verificar se, tais genes são importantes no surgimento dessa doença em pacientes brasileiros.

Finalmente, devido ao fato de um dos genes associados a ambas doenças ser da região de HLA, e devida alta incidência de doença celíaca em várias populações, o estabelecimento de uma metodologia para tipagem de HLA, de baixo custo e com capacidade de automação torna-se importante tanto do ponto de vista técnico, quanto do ponto de vista financeiro.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Estudo de predisposição genética a doença celíaca e a doença inflamatória intestinal

3.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer uma metodologia para determinação dos alelos de risco de desenvolvimento de doença celíaca (DQB1-0201, DQB1-0302, DQA1-05 e DQA1-03) de custo mais baixo do que as metodologias de seqüenciamento, SSP, SSO e PCR em tempo real, que possa ser usada em larga escala tanto para auxílio diagnóstico quanto para *screening* neonatal.
2. Estabelecer uma metodologia de extração de DNA de baixo custo, que possa ser usada para extrair DNA de qualidade de gotas de sangue colhidas em papel de filtro, sistema usado hoje para triagem neonatal ou “teste do pezinho”.
3. Avaliar a freqüência de alguns polimorfismos de base única (SNPs) associados à regulação do sistema imunológico em indivíduos portadores de doença celíaca e em familiares destes indivíduos. Especificamente serão analisados os polimorfismos Arg702Trp, Gly908Arg, 980fs981, do gene NOD2/CARD15, assim como o polimorfismo (A→G) na posição 49 no primeiro exon do gene CTLA-4 e o polimorfismo C3435T do gene de resistência múltipla a drogas (MDR-1).
4. Avaliar a freqüência dos polimorfismos de base única (SNP) supramencionados em indivíduos não celíacos e sem história familiar de doença celíaca.
5. Determinar o grau de associação dos SNPs e da doença celíaca através da determinação de Odds Ratio (OR), baseado nas freqüências alélicas e genotípicas encontradas.
6. Avaliar a freqüência de alguns polimorfismos de base única (SNPs) supramencionados em indivíduos portadores de DII (DC e RCU) e em familiares destes indivíduos.
7. Avaliar a freqüência de alguns polimorfismos de base única (SNPs) supramencionados em indivíduos não portadores de DII e sem história familiar de doença inflamatória intestinal.

8. Determinar o grau de associação dos SNPs e da DII através da determinação de Odds Ratio (OR), baseado nas frequências alélicas e genóticas encontradas.
9. Verificar se algum dos SNPs supramencionados pode estar associado à idade de surgimento da doença celíaca e da doença inflamatória intestinal.

4. Materiais e Métodos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais sob o número CAAE - 0577.0.203.000-05.

4.1 Material Biológico

A coleta de material biológico para nosso estudo foi realizada em todos os grupos envolvidos, após orientação verbal e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo II).

O material biológico coletado foi de duas espécies: Sangue total colhido em anticoagulante EDTA e swab bucal colhido através de escovas apropriadas, acondicionados em tubos Eppendorf® de 2mL, contendo 1,5 mL de álcool comercial.

4.2 Grupo controle

Como grupo controle para doença celíaca e para DII foram utilizados 100 indivíduos sem as patologias em questão, caracterizados tanto clínica como laboratorialmente. Além disso tais indivíduos foram triados quanto histórico familiar dessas doenças através de questionários. A idade média para este grupo foi de 29 ±8 anos.

4.3 Portadores de doença celíaca e familiares

Os 52 indivíduos portadores de doença celíaca e seus familiares foram encaminhados pela ACELBRA (Associação de Celíacos do Brasil). A coleta foi realizada nas dependências do Instituto Hermes Pardini (quando feita na cidade de Belo Horizonte) ou por laboratórios indicados pela instituição supramencionada, quando os voluntários residiam em outras cidades do Brasil.

4.4 Portadores de doença Inflamatória Intestinal

Os 48 indivíduos portadores de DII e seus familiares foram encaminhados principalmente pela AMDII (Associação Mineira de Portadores de Doença Inflamatória

Intestinal). A coleta foi realizada nas dependências do Instituto Hermes Pardini (quando feita na cidade de Belo Horizonte) ou por laboratórios indicados pela instituição supramencionada, quando os voluntários residiam em outras cidades do Brasil.

4.5 Extração de DNA

4.5.1 Swab bucal

O material foi coletado em swab bucal do tipo *brush*. A escova foi fricionada na mucosa bucal de cada indivíduo durante 30 segundos e agitada no tubo eppendorff contendo 1,5 mL de álcool comercial. Os tubos foram centrifugados a 500 g durante 5 minutos.

Em seguida o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo o *pellet* de células invertidos em papel toalha para secagem durante 15 minutos.

Após este tempo, foi adicionado aos tubos 1,0 mL de solução de NaOH 0,1M. Os tubos foram então, aquecidos em banho seco a 95 °C durante 15 minutos; após este tempo foi adicionado 0,5 mL de solução de Tris HCl 0,5M pH 8,0 a 4°C.

Após este procedimento, as amostras foram armazenadas em refrigerador de 4°C a 8°C até o momento do uso.

4.5.2 Sangue Total em EDTA

O sangue colhido em EDTA foi submetido a dois processos de extração de DNA.

O primeiro processo foi baseado na técnica de precipitação alcoólica utilizando o *kit* PUREGENE® (GENTRA SYSTEMS®, EUA), de acordo com o seguinte protocolo: 1 mL de sangue total foi adicionado à 600 µL de solução de lise hemácias e incubado por 10 minutos. Após centrifugação por um minuto à 14.000 rpm e retirada do sobrenadante, o *pellet* de células brancas foi ressuscitado com 400µL solução de lise de células leucocitárias. Adicionou-se a 100 µL de solução de precipitação de proteínas e após centrifugação à 14.000 rpm durante três minutos, o DNA foi precipitado em 600 µL isopropanol concentrado. Posteriormente, este material foi lavado com etanol 70% e hidratado com solução fornecida pelo kit. O DNA extraído foi armazenado à temperatura de -70°C, até o momento de sua utilização para os testes. Durante a manipulação deste material sua conservação foi à temperatura de -20°C.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

4.6 Validação da Extração de DNA

Para validar a técnica de extração de DNA através do papel de filtro comum, realizamos a amplificação de parte do Gene Glicose-6-fostato desidrogenase (G6PD).

Para tal amplificação foram utilizados os seguinte iniciadores:

- Forward- 5' CAGCCACTTCTAACCAC 3'

- Reverse- 5'AACCAGGCTGGGGGAG 3

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: Desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 95°C de desnaturação por 45 segundos, anelamento a 55°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos e extensão final de 72°C durante 10 minutos.

A reação foi realizada em 25 µL, sendo que o produto da PCR, cujo tamanho esperado é de 320 pares de base, foi corrido em gel de agarose 1% e visualizado em luz ultra-violeta após coloração com brometo de etídeo.

4.7 Genotipagem de HLA

A técnica desenvolvida para identificação dos alelos de predisposição a doença celíaca é baseada no mini-seqüenciamento.

O *mini-seqüenciamento gênico* baseia-se em uma reação em cadeia da polimerase em dois estágios (amplificação externa e hibridação interna) e depende de pelo menos três *primers* com tamanhos específicos. Cada *primer* deve ter uma base a menos que o nucleotídeo correspondente ao códon de interesse. Após a reação em cadeia da polimerase, um oligonucleotídeo anela-se imediatamente antes do polimorfismo de interesse e na presença do dNTP e ddNTP; estende-se uma ou duas bases dependendo da seqüência do sítio polimórfico, produzindo dois produtos alelo específicos conforme a figura 3. Depois da extensão, os produtos alelos específicos podem ser visualizados em seqüenciadores automáticos ou por cromatografia líquida de alta performance desnaturante (dHPLC) (HOOGENDOON et al., 1999).

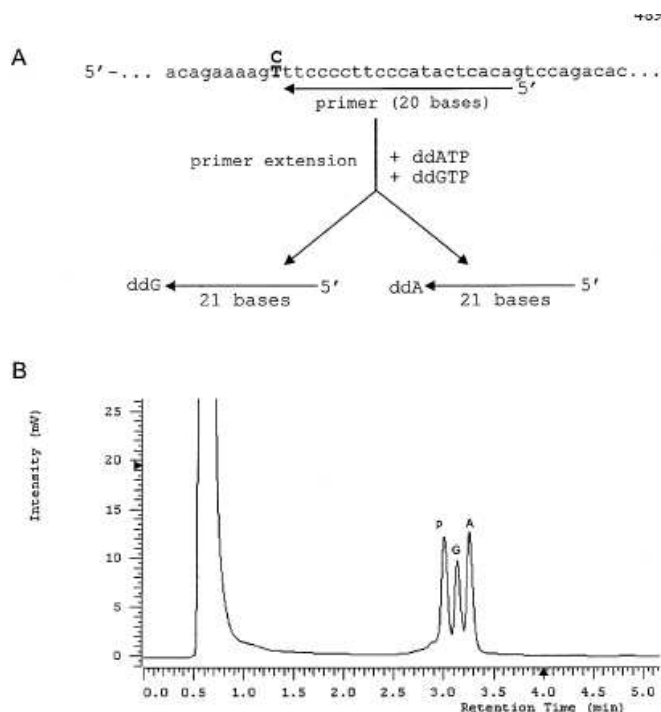


Figura 7. Diagrama esquemático mostrando o princípio do mini seqüenciamento.

A – Dependendo da seqüência do polimorfismo gera-se fragmentos com composição ou tamanhos diferentes.

B – Representação de eletroferograma gerado por cromatografia líquida de alta performance desnaturante.

Fonte: Hoogendoorn *et al.*, 1999

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

A reação de mini-seqüenciamento foi realizada em duas etapas, sendo a primeira a amplificação da região gênica de interesse e a segunda chamada de reação de extensão.

A amplificação das regiões de HLA DQA1 e DQB1 foram feitas em volume final de 60 μ L, 2mM de MgCL₂, 0,1mM de cada *primer* (DQB1F e DQB1R para HLA DQB1 e DQA1F e DQA1R para HLA DQA1) , 0,25mM de dNTP, 3,6 U de Taq Platinum® (Invitrogen) e tampão Platinum® 1X (Invitrogen).

As reações de extensão foram realizadas de acordo com o programa descrito no quadro 1.

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
94°C	5 minutos	1 ciclo
94°C	1 minuto	40 ciclos
54°C	45 segundos	
72°C	1 minuto	
72°C	10 minutos	
4°C	10 minutos	1ciclo
10°C	...	

Quadro 1 – Programa usado para amplificação por PCR das regiões HLA DQA1 e DQB1

Após a etapa de amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a um processo de limpeza utilizando a enzima EXOSAP (GE Health Care). Para isso, 1,7 μ L da enzima é adicionada a 8 μ L do produto de PCR. A reação é levada para termociclador e aquecida a 37°C por 30 minutos, seguida de uma desnaturação a 80°C por 15 minutos.

As reações de extensão foram realizadas em volume final de 25 μ L utilizando tampão Thermo Sequenase (GE Health Care) 1X, 0,5mM de cada oligo, 0,5mM de cada dideoxynucleotídeo necessário, 9 U de Thermo sequenase (GE Health Care).

A reação de extensão foi realizada de acordo com o protocolo descrito no quadro 2:

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
94°C	10 segundos	1 ciclo
94°C	10 segundos	55 ciclos
50°C	10 segundos	
60°C	1 minuto	

Quadro 2 – Programa de extensão de base única utilizado para discriminação alélica

4.8 Detecção dos alelos de HLA por Cromatografia Líquida de Alta Performance desnaturante (dHPLC):

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

4.9 Validação das genotipagens de HLA feitas por mini sequenciamento.

Como o objetivo de nosso trabalho é a montagem e validação de uma técnica molecular para identificação dos alelos de predisposição à doença celíaca, os resultados obtidos pela técnica desenvolvida foram validados através de seqüenciamento direto.

Para a reação de seqüenciamento utilizaram-se os mesmos iniciadores das reações de PCR. As duas fitas de DNA foram seqüenciadas em duplicata para confirmação do resultado.

Para tanto, os produtos de PCR das regiões DQB1 e DQA1 foram amplificados de acordo com o protocolo previamente descrito e os produtos de PCR purificados utilizando o Kit GFX PCR DNA (GE) e Gel Band Purification Kit (GE) seguindo instruções do manual do fabricante.

Após a purificação, 10,0 µL do produto de PCR purificado de cada região de HLA (20 a 30ng) foi utilizado no seqüenciamento. Para isso foi utilizado o kit de seqüenciamento Dyanamic™ ET Dye Terminator (GE). A reação foi realizada num termociclador Applied Biosystems® (Singapura) modelo 9700, utilizando o seguinte programa:

25 ciclos: 95°C - 10 segundos

50°C - 15 segundos

60°C – 1 minuto e 30 segundos

4.10 Seqüenciamento das amostras

Para o seqüenciamento foi utilizado um seqüenciador automático capilar da Mega Bace® (EUA), modelo 1000, e o software *Sequence Analyser* para análise e comparação das seqüências.

4.11 Genotipagem dos SNPs Arg702Trp, Gly908Arg, 980fs981 do gene NOD2/CARD15, A49G do Gene CTLA-4 e C3535T do gene MDR-1

A genotipagem dos polimorfismos escolhidos no trabalho foi realizada através da técnica PCR-RFLP.

4.11.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 15 µL na presença de 100 ng de DNA Genômico, 0,25 mM de cada iniciador, 1,5 µL do tampão de PCR STR 10X (Invitrogen) e 1,5 U de Taq Platinum (Invitrogen).

A seqüência dos *primers* para a PCR está apresentada na tabela 3 :

Polimorfismo	Seqüência dos iniciadores	Tamanho do fragmento
SNP5	5' AGT AGA GTC CGC ACA GAG AG 3' 5' TGC CTC TTC TTC TGC CTT CC 3'	422 pares de base
Arg702Trp	5' CCC ACA CTG CAA ATG TCA AC 3' 5' TTC AGA TCA CAG CAG CCT TC 3'	185 pares de base
Gly908Arg	5'TCT TCA CCT GAT CTC CCC AA 3' 5' AGC CAC TGA AAA CTC TTG G 3'	163 pares de base
980fs981	5' GAA TGT CAG AAT CAG AAG G 3' 5' ATT GTA TCT TCT TTT CCA GG 3'	151 pares de base
Leu1007Pro	5' GAA TGT CAG AAT CAG AAG G 3' 5' ATT GTA TCT TCT TTT CCA GG 3'	151 pares de base
A49G	5' AGT CTC ACT CAC CTT TGC AG 3' 5' GCT CTA CTT CCT GAA GAC CT 3'	162 pares de base
C3435T	5' CTT ACA TTA GGC AGT GAC TCG 3' 5' TTG ATG GCA AAG AAA TAA AGC 3'	207 pares de base

Tabela 4: Seqüência dos iniciadores para a reação em cadeia da polimerase com seus respectivos tamanhos em pares de base

A amplificação dos polimorfismos escolhidos foi padronizada de maneira que o maior número de marcadores pudesse ser amplificado no mesmo programa de PCR

O programa está descrito no quadro 4:

Temperatura	Tempo	Número de Ciclos
94°C	3 minutos	1 ciclo
94°C	48 segundos	10 ciclos
58°C	48 segundos	
72°C	1 minuto	
90°C	48 segundos	18 ciclo
56°C	48 segundos	
72°C	1 minutos	
72°C	15 minutos	1 ciclo
4°C	5 minutos	
10°C	∞	

Quadro 4 – Programa de PCR para amplificação dos polimorfismos descritos na tabela 4

4.11.2 Digestão enzimática dos fragmentos da reação em cadeia da polimerase

A digestão enzimática foi realizada para cada polimorfismo estudado. As respectivas enzimas de restrição e os tamanhos dos fragmentos obtidos após a digestão e visualizados em gel de acrilamida a 6% e corados com corante SyberGren estão descritas na tabela 5.

Polimorfismo	Enzima de Restrição	Nucleotídeo	Tamanho do fragmento
SNP5	Ava II	C	56, 119, 247
		T	56, 366
Arg702Trp	Msp I	C	19, 31, 38, 54, 76, 95
		T	19, 31, 38, 95, 130
Gly908Arg	Hha I	G	352
		C	125, 227
980fs981	Nla IV	-	21, 90, 116
		C	21, 41, 76, 90
Leu1007Pro	Apa I	-	151
		C	20, 131
A49G	Bbv I	A	162
		G	88, 74
C3435T	BSp 1431	C	207
		T	145, 62

Tabela 5: Enzimas de restrição, nucleotídeos polimórficos e tamanhos dos fragmentos obtidos após a digestão enzimática do produtos de PCR e corrida em gel de poliacrilamida 6%.

4.12 Análises estatísticas

As análises estatísticas descritivas e o cálculo de Odds Ratio foram feitas utilizando o software Bioestat versão 4.0 (Bioestat®, aplicações estatísticas na área de ciências biomédicas. Manuel Ayres, Belém, Pará – Brasil, 2005).

A análise de componentes principais foi feita utilizando o *software* Infostat® (Infostat – Software estadístico, Cordoba – Argentina, 2004).

A análise de componentes principais foi originalmente descrita por Person em 1901 e desenvolvida por Hotelling em 1933. Esta análise permite que um certo número de variáveis sejam analisadas concomitantemente. Isto torna possível verificar as relações existentes entre elas, por meio de uma abordagem descritiva onde, através de um modelo gráfico, podemos observar o comportamento de cada variável em relação às demais. Havendo n variáveis, haverá um espaço de n dimensões com até n eixos principais, cada um deles correspondendo a uma componente principal. Normalmente a análise é feita com as três primeiras componentes principais – a primeira contendo um maior valor de inércia e as demais definidas seqüencialmente no sentido decrescente. Juntas, devem somar mais de 70% da inércia, segundo critério citado por Sampaio IBM; 1993, para serem consideradas significativas.

O resultado da análise pode ser observado através de um gráfico de três dimensões, correspondente aos três primeiros componentes principais. A inércia define a regularidade ou constância do sistema proposto, ou seja, um valor alto de inércia mostra que a associação encontrada é constante e regular.

Pela distância euclidiana (distância entre dois pontos) e a posição nos quadrantes do gráfico, podemos visualizar as relações entre as variáveis. Variáveis situadas em um mesmo quadrante e próximas entre si são fortemente associadas; variáveis situadas em quadrantes opostos são inversamente associadas. Variáveis distantes uma da outra, situadas no mesmo lado, porém em quadrantes diferentes, apresentam associação fraca (Sampaio, 1993).

5. Resultados:

5.1 Perfil demográfico dos pacientes com doença celíaca e DII

Na tabela 6 estão apresentados alguns dados demográficos dos pacientes com doença celíaca e com DII.

Dados	Doença celíaca	DII
Sexo	21,43 % homens 78, 57 % mulheres	45 % homens 55 % mulheres
Idade	29,70 ± 19,0	37,29 ± 15,89
Idade ao diagnóstico	10,8 ± 13,9 para homens 21,8 ± 19,1 para mulheres	25,2 ± 9.2 para homens 31,7 ± 10.2 para mulheres

Tabela 6 – Sexo, idade e idade ao diagnóstico dos pacientes com doença celíaca e com DII. Nota-se pela tabela uma distribuição desigual entre homens e mulheres na doença celíaca, não vista de maneira significativa na DII. A idade de manifestação da doença mostra-se diferente entre homens e mulheres na doença celíaca, não existindo tal diferença na DII.

Os dados da tabela 6 mostram uma distribuição desigual da doença celíaca entre homens e mulheres, fato não visto nos pacientes com DII. Entretanto, o fato mais importante é a diferença da idade ao diagnóstico na doença celíaca, onde podemos observar que nos pacientes que participaram do nosso estudo, os homens foram diagnosticados mais precocemente do que as mulheres. Utilizando o teste t *Student* para verificar se a diferença entre as médias é estatisticamente significativa (considerando um valor de p significativo < 0,05), obtivemos um valor de p = 0,053, ou seja, pouco acima do limite de significância.

A DII apresentou-se com distribuição semelhante entre homens e mulheres, com idade do diagnóstico também semelhante, não havendo diferença estatística na idade ao diagnóstico.

5.2 Extração de DNA a partir de papel de filtro

A figura 6 mostra o perfil de amplificação de parte do gene da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), que foi usado como controle de amplificação para validar a extração de DNA a partir de papel de filtro comum.

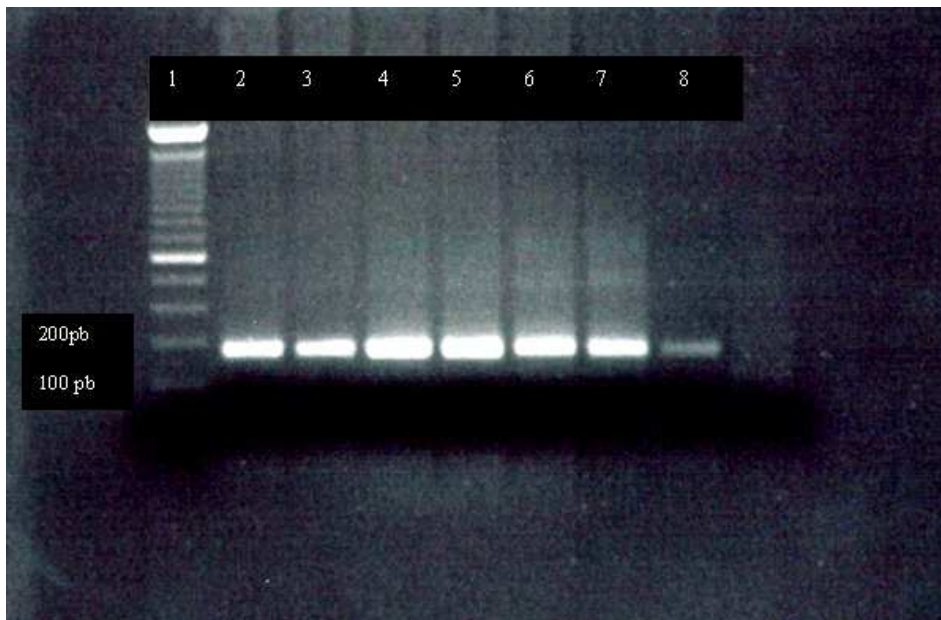


Figura 8. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo mostrando a amplificação de G6PD nos diferentes tempos de armazenamento de papel de filtro após o gotejamento de sangue total em EDTA. 1 – Padrão de peso molecular de 100 pares de bases; 2 a 8 - tempos de armazenagem do papel de filtro após gotejamento de sangue total antes do processo de extração (24h, 48h, 72h, 7 dias, 15 dias, 30 dias, 60 dias respectivamente).

Pela figura, podemos observar que a extração de DNA a partir de papel de filtro comum, mostrou-se eficiente e o DNA mostrou-se estável até 60 dias de armazenagem. Aos 90 dias a banda de amplificação já se mostra menos intensa, podendo indicar degradação de DNA.

5.3 Genotipagem de HLA (Pedido de Patente - Anexo I)

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

5.4 Frequência dos haplótipos DQ2 (DQB1*0201 e DQA1*05) e DQ8 (DQB1*0302 e DQA1*03).

A tabela abaixo apresenta as frequências do haplótipos DQ2 e DQ8 nos pacientes com doença celíaca e em seus parentes de primeiro grau, nos pacientes com DII e em seus parentes de primeiro grau, e nos indivíduos controle.

	DQ2	DQ8
Celíacos	92,31%	9,6%
Parentes 1° grau celíacos	41,94 %	6,9 %
DII	34,1%	4,4 %
Parentes 1° grau de DII	29.2 %	3,9 %
Controles	29,0 %	4,0%

Tabela 7: Frequência dos haplótipos DQ2 e DQ8 nos diferentes grupos estudados.

Dos 52 pacientes com doença celíaca, 48 (92,31%) apresentaram o haplótipo DQ2 (DQB1*0201 e DQA1*05) mostrando uma diferença estatística significativa em relação ao grupo controle, que apresentou uma frequência de 29% para este haplótipo.

Em relação ao haplótipo DQ8, 5 pacientes (9,6%) e 4 controles (4 %) apresentaram este haplótipo.

Dentre os pacientes que apresentaram o haplótipo DQ8, 4 apresentaram também o haplótipo DQ2.

Desta forma, entre os 52 pacientes com doença celíaca, os haplótipos DQ2 e DQ8 foram encontrados em 49 indivíduos (94,23%).

Não foi detectada em nenhum paciente com doença celíaca, a presença dos alelos DQB1*0201 e DQA1*05 isolados, ou seja, todas as vezes que estes alelos foram identificados nos pacientes, eles estavam associados formando o haplótipo DQ2.

Entre os parentes de primeiro grau de pacientes celíacos, a frequência do haplótipo DQ2 foi de 41,94%, mostrando uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação aos controles.

Para o haplótipo DQ8, foi observada uma frequência de 6,9% entre os parentes de primeiro grau dos celíacos, sendo esta diferença também significativa ($p < 0,05$) em relação aos controles.

Entre os indivíduos com DII e os parentes destes indivíduos, as frequências dos haplótipos DQ2 e DQ8 não se mostraram estatisticamente diferentes do grupo controle, podendo indicar que tais haplótipos não contribuem para o surgimento de tal doença.

5.5 Frequência alélica e genotípica e dos polimorfismos de base única

Os polimorfismos de base única foram tipados em três grupos de indivíduos distintos: Pacientes com doença inflamatória intestinal, pacientes com doença celíaca e controles (indivíduos não portadores de ambas as doenças e sem histórico familiar destas doenças).

Os resultados das frequências alélicas, genotípicas e o Odds Ratio estão apresentados nas tabelas a seguir.

Tabela 8 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo SNP5 da região NOD2/CARD15 em pacientes com DII e seus familiares, doença celíaca e seus familiares, e grupo controle.

	Alelos				Genótipos				
	C	T	OR	Valor de p	CC	CT	TT	OR	Valor de p
DII	72,0	28,0	1,024	0,86	58,0	28,1	13,9	1,056	0,88
Celíacos	71,0	29,0	1,013	0,81	52,0	39,0	9,0	1,013	0,72
Controles	77,5	22,5			58,9	37,2	3,9		
Parentes de DII	77,8	22,2			61,1	33,3	5,6		
Parentes de celíacos	79,9	20,1			67,6	24,5	7,8		

OR – Odds Ratio. Valores de p foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Valores de frequência dados em percentual.

Tabela 9 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo Arg702Trp da região NOD2/CARD15 em pacientes com DII e seus familiares, doença celíaca e seus familiares, e grupo controle.

	Alelos				Genótipos				
	C	T	OR	Valor de p	CC	CT	TT	OR	Valor de p
DII	94,0	6,0	0,56	0,56	89,0	11,0	0	0,57	0,91
Celíacos	95,0	5,0	0,68	0,78	89,0	11,0	0	0,57	0,91
Controles	91,0	9,0			82,0	18,0	0		
Parentes de DII	96,7	3,3			93,3	6,7	0		
Parentes de celíacos	98,0	2,0			96,1	3,9	0		

OR – Odds Ratio. Valores de p foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Valores de frequência dados em percentual.

Tabela 10 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo Gly908Arg da região NOD2/CARD15 em pacientes com DII e seus familiares, doença celíaca e seus familiares, e grupo controle.

	Alelos				Genótipos				Valor de p
	C	T	OR	Valor de p	CC	CT	TT	OR	
DII	97,0	3,0	1,0	0,98	95,0	5,0	0	1,0	0,96
Celiacos	98,0	2,0	0,88	0,73	97,0	3,0	0	0,73	0,68
Controles	97,0	3,0			95,0	5,0	0		
Parentes de DII	95,1	4,9			90,3	9,7	0		
Parentes de celiacos	99,3	0,7			98,6	1,4	0		

OR – Odds Ratio. Valores de p foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Valores de frequência dados em percentual.

Tabela 11 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo 980fs981 da região NOD2/CARD15 em pacientes com DII e seus familiares, doença celíaca e seus familiares, e grupo controle.

	Alelos				Genótipos				Valor de p
	C	T	OR	Valor de p	CC	CT	TT	OR	
DII	97,2	2,8	2,94	0,09	94,0	6,0	0,0	3,22	0,08
Celiacos	100,0	0,0	-	-	100,0	0,0	0,0	-	-
Controles	100,0	0,0	-		100,0	0,0	0,0		
Parentes de DII	100,0	0,0			100,0	0,0	0,0		
Parentes de celiacos	100,0	0,0			100,0	0,0	0,0		

OR – Odds Ratio. Valores de p foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Valores de frequência dados em percentual.

Tabela 12 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo 49 (A→G) do gene CTLA-4 em pacientes com DII e seus familiares, doença celíaca e seus familiares, e grupo controle.

	Alelos				Genótipos				
	A	G	OR	Valor de p	AA	AG	GG	OR	Valor de p
DII	67,5	32,5	1,64	0,36	38,0	62,0	0,0	0,15	0,12
Celíacos	64,4	35,4	1,09	0,49	37,0	52,0	11,0	0,71	0,45
Controles	65,5	34,5			43,6	43,6	12,8		
Parentes de DII	73,2	26,8			53,6	39,3	7,1		
Parentes de celíacos	70,1	29,9			51,9	36,5	11,5		

OR – Odds Ratio. Valores de p foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Valores de frequência dados em percentual.

Tabela 13 – Distribuição alélica e genotípica do polimorfismo C3534T do gene MDR1 em pacientes com DII e seus familiares, doença celíaca e seus familiares, e grupo controle.

	Alelos				Genótipos				
	C	T	OR	Valor de p	CC	CT	TT	OR	Valor de p
DII	42,0	58,0	0,79	0,46	18,0	50,0	32,0	0,81	0,12
Celíacos	32,0	68,0	1,30	0,45	6,0	53,0	41,0	1,41	0,38
Controles	37,1	62,9			7,9	58,4	33,7		
Parentes de DII	36,2	63,8			17,2	37,9	44,8		
Parentes de celíacos	42,7	57,3			14,7	56,0	29,3		

OR – Odds Ratio. Valores de p foram considerados significantes quando $p < 0,05$. Valores de frequência dados em percentual.

Os resultados descritos nas tabelas 8, 9, 10 e 11 demonstram que os marcadores da região NOD2/CARD15 parecem não estar associados a predisposição genética da doença celíaca e nem as DII. Este fato é demonstrado pelo valor de Odds Ratio (determinado comparando a frequência de expostos a um certo fator entre um grupo de indivíduos que apresenta a doença – casos – e outro que não a tem – controle), que não obteve valor estatisticamente significativo.

Vale ressaltar que o polimorfismo 980fs981 não se mostrou polimórfico no grupo dos pacientes celíacos e também no grupo dos pacientes com DII, fator este não encontrado em outros estudos.

Através de teste de Qui-quadrado, observamos que as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos da região NOD2/CARD15 não possuem diferenças estatísticas significativas entre os indivíduos afetados pelas doenças, seus familiares de primeiro grau e os indivíduos controle.

Tal resultado contraria outros artigos (HUGOT, et al., 2001; OGURA et al., 2001; SHAOUL et al., 2004) que mostraram alta associação da região NO2/CARD15 com as DII, principalmente na população europeia, sendo inclusive usados em vários países como auxílio diagnóstico.

As tabelas 12 e 13 demonstram que tanto o polimorfismo 49 (A→G) no gene CTLA-4, quanto o polimorfismo C3534T do gene MDR-1, também parecem não estarem associados a predisposição a doença celíaca nem com a DII. As frequências alélicas entre o grupo de pacientes, seus familiares e os controles não tem diferença estatística significativa.

A análise dos polimorfismos genéticos em conjunto também não apresentou nenhuma associação com a predisposição ao surgimento das doenças aqui estudadas.

5.6 Associação da idade de manifestação da doença celíaca e da doença inflamatória intestinal com o sexo dos indivíduos, haplótipo de HLA e os polimorfismos de base única.

A tabela 14 apresenta as coordenadas dos três componentes principais, as variáveis analisadas e a inércia explicada pelo sistema, ao relacionar idade de manifestação da doença inflamatória intestinal com os marcadores genéticos analisados.

Variáveis	Componentes principais		
	F1	F2	F3
HLA	0.63	0.23	-0.21
SNP5	0.5	0.15	-0,16
981	0.4	-0.36	-0.44
CTLA-4	-0.43	-0.48	-0.02
908	0.28	0.48	-0.32
702	0.39	0.46	0.31
MDR	-0.4	0.19	-0.42
Sexo	0.26	-0.35	0.38
Idade	0,35	0,15	0,51
Inércia explicada	32%	22%	17%
Inércia acumulada	32%	54%	71%

Tabela 14: Coordenadas dos componentes principais e inércia explicada pelo sistema em relação a DII.

A representação gráfica da tabela está apresentada no gráfico 1.

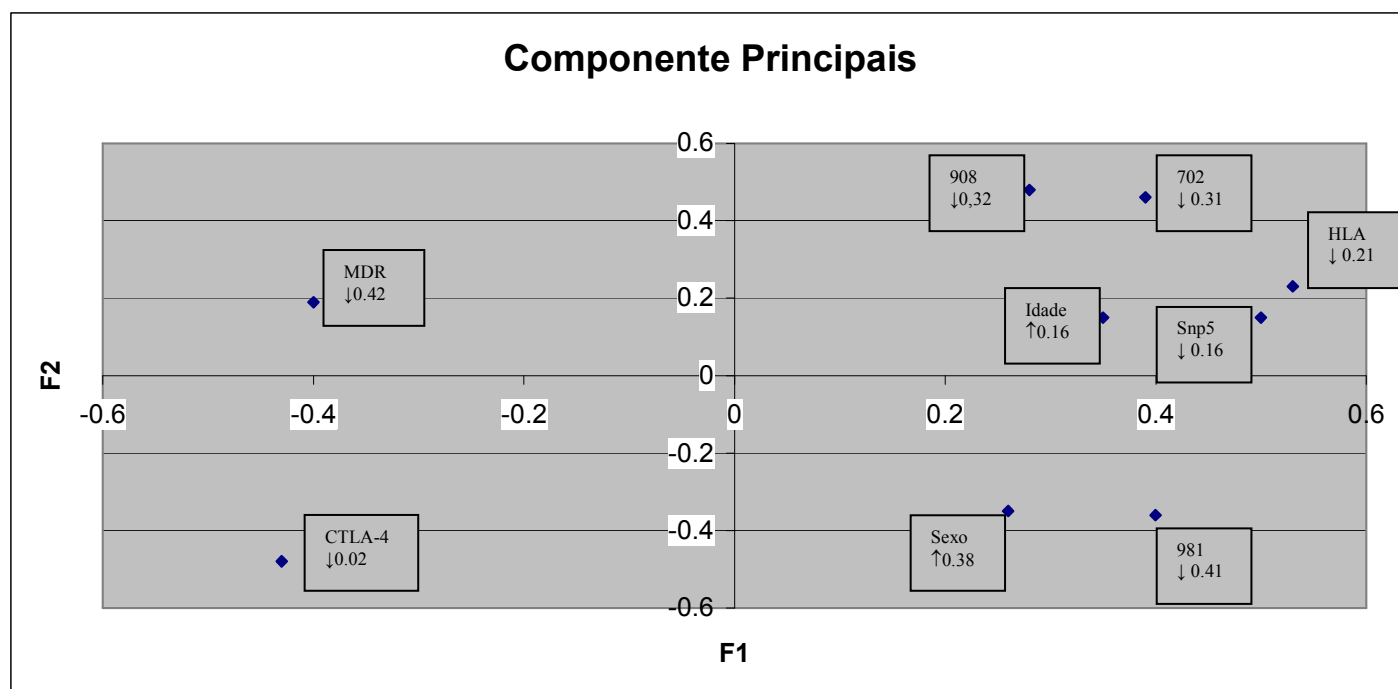


Gráfico 1: Representação gráfica da tabela 14, onde as posições dos marcadores no terceiro eixo (F3) é demonstrada nos pontos (o símbolo ↑ significa valores positivos e o símbolo ↓ significa valores negativos). A associação entre os marcadores é dada pela posição relativa nos quadrantes e a força desta associação é dada pela distância euclidiana.

De acordo com a representação gráfica da análise de componentes principais, podemos observar que, a idade de surgimento da doença inflamatória intestinal e os marcadores, HLA, SNP5, Gly908Arg e Arg702Trp, se situam no mesmo quadrante em relação a F1 e F2, indicando uma relação direta entre eles. Entretanto, o fato de estarem em lados opostos do plano (sinal trocado) indicado pelo componente F3, indica que tal associação é fraca.

Esses dados sugerem que a presença das mutações SNP5, Gly908Arg e Arg702Trp, assim como a presença do DQ2 ou DQ8, podem influenciar a idade de surgimento da doença celíaca, fazendo esta doença se manifestar mais tardiamente quando da presença destes polimorfismos no paciente.

Em contrapartida, o CTLA-4 ficou situado em um quadrante oposto a idade de manifestação da doença inflamatória intestinal, indicando uma relação inversa entre estas variáveis. Além disso estas variáveis estão em lados opostos do plano, indicando uma associação forte. Em outras palavras, a presença da mutação 49 (A→G) faz com que a doença inflamatória intestinal se manifeste mais cedo.

Vale ressaltar o fato de que a inércia total acumulada foi de mais de 70%, significando com isso que, as associações encontradas nesta análises são consistentes e significativas.

Em relação a doença celíaca, a tabela 15 abaixo apresenta as coordenadas dos três componentes principais, as variáveis analisadas e a inércia explicada pelo sistema ao relacionar idade de manifestação da doença celíaca, com os marcadores genéticos analisados.

Variáveis	Componentes principais		
	F1	F2	F3
HLA	0.23	0.39	0.12
SNP5	0.47	0.23	0.34
981	0	0	0
CTLA-4	-0.4	-0.3	-0.01
908	0.19	0.67	-0.16
702	0.35	-0.10	0.66
MDR	0.34	-0.49	-0.12
Sexo	0.44	-0.4	-0.17
Idade	0.44	-0.05	-0.62
Inércia explicada	25%	21%	17%
Inércia acumulada	25%	46%	64%

Tabela15 : Coordenadas dos componentes principais e inércia explicada pelo sistema em relação à doença celíaca.

De acordo com o que podemos observar na tabela, a inércia total acumulada foi de 64%, indicando que as relações entre os marcadores genéticos, a idade de manifestação da doença e o sexo dos pacientes não são consistentes e significativas.

6.0 Discussão

Apesar de clinicamente distintas, a doença celíaca, a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa têm várias características em comum do ponto de vista imunológico e genético. Tais características podem ser demonstradas na prática, através da confirmação por vários autores de que a incidência de retocolite ulcerativa e doença de Crohn é maior em pacientes com doença celíaca (HADITHI et al., 2007).

Além disso, é possível constatar através da literatura que outras doenças autoimunes, como diabetes tipo 1 e tireoidite de hashimoto, também têm sua incidência aumentada nos portadores de retocolite ulcerativa, doença de Crohn e doença celíaca, sugerindo um *background* comum entre estas patologias (NEUHAUSEN et al., 2008).

Analizamos em nosso trabalho, se estas duas doenças possuem marcadores genéticos em comum, uma vez que existem características genéticas comuns entre elas. Ambas já foram associadas a região de HLA e ambas já foram associadas a polimorfismos genéticos de genes que têm importante papel na regulação de células T envolvidas na resposta imunológica.

Ao iniciarmos a investigação dos haplótipos DQ2 e DQ8, conhecidamente associados a doença celíaca, nos deparamos com a possibilidade de usar várias técnicas para a identificação destes haplótipos, indo desde um PCR alelo específico, até o seqüenciamento direto do gene.

Além disso, na maioria das vezes, tais técnicas são caras, demoradas e proibitivas do ponto de vista de produção em escala (KAUKINEN et al., 1997; REINTON et al., 2006; OLERUP et al., 1993). Por outro lado, percebemos através da literatura que a doença celíaca possui uma alta incidência e alta prevalência em várias populações, incluindo a brasileira (SDEPANIAN et al., 1999, FARREL et al., 2002; JABRI et al., 2006).

Isto posto, nos propomos a desenvolver uma técnica de genotipagem de HLA, que tivesse custo baixo, rápida e que principalmente, pudesse ser realizada em larga escala, como em testes de screening neonatal (teste do pezinho).

Antes mesmo da padronização da técnica de genotipagem propriamente dita, fez-se necessário a padronização de uma extração de DNA, que tivesse os mesmos critérios citados anteriormente para a técnica de tipagem de HLA, ou seja, que fosse rápida, barata e pudesse ser feita em larga escala.

Como tínhamos a intenção de usar a técnica de tipagem de HLA em screening neonatal, padronizamos nossa extração de DNA a partir do material que hoje é colhido no teste do pezinho, ou seja, a partir de gotas de sangue em papel de filtro comum.

O resultado obtido desta padronização da extração de DNA proveniente de papel de filtro comum, apesar de simples do ponto de vista técnico, tem uma importância muito grande no aspecto econômico e financeiro do teste.

Esta padronização permitiu a redução de custo de extração de DNA em uma escala muito grande e dificilmente encontrada em *kits* comerciais convencionais.

A extração demonstrada aqui já está implantada no Departamento de Genética Humana do Instituto Hermes Pardini. Esta instituição usava um *kit* comercial cujo custo final de extração era de R\$ 7,32 por amostra (incluindo reagentes, papel FTA Card® - Watman e descartáveis). Utilizando a nova extração aqui descrita, e cuja metodologia está com requerimento de patente, o custo final por amostra foi reduzido para R\$1,92, uma diferença de R\$ 5,40 por amostra.

Apesar do valor absoluto unitário ser pequeno, ao pensarmos em termos de escala, o montante final pode representar uma grande economia para empresas que por ventura usarem tal técnica.

O segundo resultado aqui demonstrado é a montagem, padronização e validação da técnica de mini-sequenciamento para identificação dos haplótipos de HLA DQ2 e DQ8, associados com predisposição à doença celíaca.

A técnica de mini-sequenciamento vem sendo utilizada para inúmeras finalidades e se mostra muito eficiente quando se faz necessário a genotipagem de vários polimorfismos e a análise de vários fragmentos de DNA (79).

Nos últimos anos, o mini-sequenciamento vem sendo realizado utilizando sequenciadores capilares e, mais recentemente, a cromatografia líquida de alta performance desnaturante (dHPLC) (HOOGENDOORN et al., 1999, XIAO & OEFNER, 2001).

A metodologia desenvolvida em nosso trabalho pode ser usada em ambos os equipamentos, mas por motivos didáticos e pelo caráter inovador, resolvemos focar nossos esforços no uso do dHPLC. Além disso, o dHPLC tem maior capacidade de produção, é automatizável e possui custo operacional mais baixo quando comparado com sequenciadores de DNA.

Apesar do grande grau de dificuldade de padronização da técnica de mini-sequenciamento em dHPLC, uma vez padronizada a técnica mostra-se reprodutível e passível de ser utilizada em rotinas clínico-laboratoriais (HOOGENDOORN et al., 1999, XIAO & OEFNER, 2001).

Foi encontrado um alto grau de dificuldade na construção das seqüências dos oligonucleotídeos internos que se constitui no passo essencial para a discriminação alélica. Esta dificuldade se deve principalmente ao fato da região de HLA se mostrar altamente

polimórfica e muitas vezes um alelo é discriminado de outros por mais de uma alteração de base, tornando a construção dos oligonucleotídeos mais difícil.

Apesar disso, a técnica desenvolvida neste trabalho mostrou-se reprodutível, confiável e automatizável, fazendo com que ela tenha um grande potencial de uso em rotinas laboratoriais.

Vale ressaltar que os resultados de genotipagem obtidos pelo mini-seqüenciamento foram validados pela metodologia de seqüenciamento direto, onde foi possível observar 100% de concordância dos resultados.

Os resultados encontrados de freqüência dos haplótipos DQ2 e DQ8 (92,31% e 9,6% respectivamente) na população de celíacos estudada são semelhantes a outros dados divulgados em outras populações (TOSI et al., 1986; SACHS et al., 1986, LOUKA & SOLLID, 2003, BOURGEY et al., 2007). O que nos chamou a atenção foi o fato de que a grande maioria dos pacientes que possuíam o haplótipo DQ8 já possuem o haplótipo DQ2.

Esse dado nos fornece uma evidência de que pode não ser necessário a tipagem de ambos os haplótipos (DQ2 e DQ8) para uma eventual utilização laboratorial da tipagem de HLA para doença celíaca, o que tornaria o exame ainda mais barato e rápido. Na literatura, alguns autores já sugerem a genotipagem apenas dos alelos DQB1*0201 e DQA1*0501, que formam o haplótipo DQ2 (SACHETTI et al., 2001)

As freqüências dos haplótipos DQ2 e DQ8 nos parentes de primeiro grau dos pacientes celíacos (41,94% e 6,9%) mostraram-se com valor intermediário entre os valores das freqüências dos pacientes e dos controles (29,0% para DQ2 e 4% para DQ8). Além disso, a diferença entre as freqüências haplotípicas dos parentes de celíacos e os controles mostrou-se estatisticamente significativa, indicando que este grupo de parentes de pacientes possui um risco significativo ao surgimento da doença embora, por algum motivo, não manifesta a mesma. Este motivo pode estar associado a fatores ambientais ou até mesmo, a influência de outros genes fora da região de HLA, em um fenômeno de epistasia.

Outros marcadores genéticos foram tipados com o intuito de identificar alguma contribuição dos mesmos para o desenvolvimento da doença celíaca. Estes marcadores (Arg702Trp, Gly908Arg, 980fs981, 1007fs do gene NOD2/CARD15, assim como o polimorfismo (A→G) na posição 49 no primeiro éxon do gene CTLA-4 e o polimorfismo C3435T do gene MDR-1, já foram previamente associados com predisposição ao surgimento de doenças autoimunes como diabetes tipo 1, DC, RCU e a própria doença celíaca (ARDIZZONE et al., 2007, MORA et al., 2003, HUGOT et al., 1996). É importante salientar o fato de que os genes NOD2/CARD15, CTLA-4 e MDR-1 estão associados à regulação do sistema imunológico, tendo

portanto uma possível relação funcional com doenças autoimunes (HUGOT et al., 1996; AMUNDSEN et al., 2004; RANDOLPH et al., 1998)

De acordo com os resultados obtidos, nenhum destes polimorfismos parece estar associado com doença celíaca, nem individualmente nem em conjunto.

A falta de associação entre esses marcadores e a predisposição à doença celíaca pode indicar que a manifestação da doença em indivíduos brasileiros parece estar mais associada à região de HLA e a fatores ambientais.

De maneira surpreendente, no que diz respeito a DC e a RCU, o que observamos é que os mesmos genes também parecem não estar associados ao surgimento destas doenças nos pacientes testados. Do mesmo modo, a frequência dos haplótipos DQ2 e DQ8 nos mesmos pacientes não se mostrou diferente em relação aos indivíduos controle.

Esses achados, apesar de não identificarem um fator genético de risco para o desenvolvimento de DC e de RCU são extremamente importantes, uma vez que principalmente os polimorfismos da região NOD2/CARD15 são amplamente usados em *screening* e até mesmo como exame genético de auxílio diagnóstico para RCU e DC em vários países do mundo.

Esta falta de associação entre os polimorfismos analisados e DII deve ser vista com cautela, não significando necessariamente que o gene NOD2/CARD15, o gene CTLA-4 e o gene MDR-1 não contribuam para o surgimento da DII.

Estudos feitos em várias populações mostram uma forte associação com estes genes e o surgimento da DII e sendo assim a análise de outras mutações nos mesmo genes pode ser de grande valia na identificação de polimorfismos associados à DII (HUGOT et al., 1996; HUGOT et al., 2001, ARDIZZONE et al., 2007, KRISTIANSEN et al., 2001)

Em relação a frequência genotípica e alélica dos polimorfismos estudados e a frequência dos haplótipos de HLA, não foram identificadas diferenças estatísticas significativas entre os pacientes com DII, seus parentes de primeiro grau, e os controles.

Realizamos também uma análise estatística multivariada, no intuito de identificar algum fator genético que pudesse influenciar na idade de manifestação da doença celíaca e da DII.

Essa análise torna-se interessante principalmente em pacientes com DII, onde existe claramente uma distribuição bimodal na idade de manifestação da doença, tendo um primeiro pico na adolescência e fase adulta jovem, e um segundo pico após os 50 a 60 anos de idade.

A análise multivariada escolhida foi a análise de componentes principais, onde é possível analisar uma grande variedade de fatores concomitantemente, e avaliar suas relações através de um gráfico em três dimensões.

Pela distância euclidiana (distância entre dois pontos) e a posição nos quadrantes do gráfico, podemos visualizar as relações entre as variáveis. Variáveis situadas em um mesmo quadrante e próximas entre si são fortemente associadas; variáveis situadas em quadrantes opostos são inversamente associadas. Variáveis distantes uma da outra situadas no mesmo lado, porém em quadrantes diferentes, apresentam associação fraca (HOTELING, 1933).

A força e consistência da possível associação encontrada, é dada pela inércia acumulada nos três componentes principais, sendo considerada significativa uma inércia acima de 70% (SAMPAIO, 1993).

De acordo com esta análise, não encontramos associação entre os marcadores genéticos aqui estudados e a idade de manifestação da doença celíaca, uma vez que a inércia acumulada nos três primeiros componentes principais foi de 64%.

Entretanto, em relação a DII, foi possível observar uma forte associação entre o polimorfismo 49 (A→G) do gene CTLA-4 e a idade de manifestação da doença. Pelo fato de estarem em quadrantes opostos e em planos diferentes, esta associação é inversa, ou seja, pacientes com o polimorfismo, tendem a manifestar a doença mais precocemente do que aqueles que não apresentam. Esta relação teve uma inércia acumulada de 71%, demonstrando assim que se trata de um achado significativo e consistente.

A associação do polimorfismo 49 (A→G) do gene CTLA-4 e idade precoce de surgimento da DII pode ser explicada pela importância que tal gene tem na regulação do sistema imunológico. O gene CTLA-4 codifica uma proteína que atua como um modulador na reação imunológica mediada por células T. Mais especificamente, esta molécula controla a proliferação de células T e a apoptose mediada por este tipo de célula. Alterações neste gene pode levar a uma perda nesta função regulatória, causando uma perda do controle das reações imunológicas e facilitando o surgimento de doenças autoimunes desde os primeiros dias de vida (KIM et al. 2004; KING et al., 2002).

Este resultado reforça a necessidade do gene CTLA-4 ser investigado mais detalhadamente no que se refere a sua importância na predisposição ao surgimento da DII em pacientes brasileiros.

O gene CTLA-4 tem sido associado com doenças autoimunes e inflamatórias, mas nunca tinha sido descrito associado a idade de manifestação da DII (KRISTIANSEN et al., 2001).

Através da análise de componentes principais, foi observado também uma associação direta, apesar de fraca, entre os polimorfismo SNP5, Gly908Arg e Arg702Trp assim como os

haplótipos DQ2 e DQ8 com a idade de manifestação da doença, indicando que pacientes que possuem tais polimorfismos ou haplótipos tendem a manifestar a DII mais tardiamente.

Estes dados de associação dos marcadores genéticos com a idade de surgimento da DII, podem ajudar na compreensão da distribuição bimodal desta doença, e nos indica mais uma vez que, uma investigação mais detalhada é necessária para elucidar a real contribuição dos genes NOD2/CARD15, CTLA-4 e MDR-1 na predisposição genética à doença inflamatória intestinal.

7 Conclusões

De acordo com os resultados obtidos em nosso trabalho podemos concluir que os polimorfismos presentes nos genes CTLA-4, NOD2/CARD15 e MDR-1 parecem não influenciar de maneira significativa o surgimento da doença celíaca em pacientes brasileiros.

Estes mesmos genes, assim como os haplótipos de HLA DQ2 e DQ8, a princípio parecem não influenciar o surgimento da doença inflamatória intestinal. Entretanto estes genes parecem ter grande influência na idade de manifestação da DII, fato este visto através da análise de componentes principais.

O polimorfismo 49 (A→G) do gene CTLA-4 mostrou-se altamente associado com a idade precoce ao surgimento da DII, sendo que este fato, pode auxiliar na compreensão da manifestação bimodal da doença.

Em relação aos haplótipos de HLA DQ2 e DQ8, tais marcadores mostraram-se altamente freqüentes nos pacientes celíacos, tendo uma diferença significativa em relação ao grupo controle e aos pacientes com DII.

A freqüência dos haplótipos DQ2 e DQ8 nos familiares de primeiro grau dos pacientes celíacos mostrou-se elevada em relação ao grupo controle, indicando assim um risco aumentado ao desenvolvimento da doença.

Com isto, concluímos que os marcadores genéticos analisados podem não ser o elo genético comum entre a doença celíaca e a DII. Entretanto, estudos de outras mutações e polimorfismos nos genes aqui analisados são necessários.

A técnica de extração de DNA em papel de filtro comum e de tipificação de haplótipos de HLA aqui proposta, mostraram-se confiáveis, reprodutíveis e facilmente automatizáveis. Com estas características concluímos que ambas podem ser usadas como técnicas de rotina em laboratório clínico, tanto para uso em diagnóstico como para programas de *screening* populacional.

A técnica de extração de DNA em papel de filtro comum e a técnica de tipagem dos haplótipos de HLA DQ2 e DQ8 são objetos de pedido de patente (ANEXO 1), tanto isoladamente quanto na forma de kit de diagnóstico.

8. Referências Bibliográficas

1. Abdulkarim AS, Burgart LJ, See J, Murray JA. Etiology of nonresponsive celiac disease: results of a systematic approach. *Am J Gastroenterol*, v. 97, p. 2016-202, 2002.
2. DAVID A. NELSEN JR. Gluten-Sensitive Enteropathy (Celiac Disease): More Common Than You Think *Am Fam Physician* 2002;66:2259-66,2269-70.
3. Abe T, Yamaguchi Y, Takino H, Fujita N, Yamauchi-Degawa M, Ozaki M, Yamakawa K, Sera Y, Sakamaki H, Uotani S, Kawasaki E, Awata T, Yamasaki H, Eguchi K. CTLA4 gene polymorphism contributes to the mode of onset of diabetes with antiglutamic acid decarboxylase antibody in Japanese patients: genetic analysis of diabetic patients with antiglutamic acid decarboxylase antibody. *Diabet Med*. v. 18(9), p.726-731, 2001.
4. Allan RN, Rhodes JM, Hanauer SB, Keighley MRB, Alexander-Williams J, Fazio VW. *Inflammatory Bowel Disease*. Churchill Livingstone 3rd, New York, 1997.
5. Amundsen SS, Naluai AT, Ascher H, Ek J, Gudjonsdottir AH, Wahlstrom J, Lie BA, Sollid L. Genetic analysis of the CD28/CTLA4/ICOS (CELIAC3) region in coeliac disease. *Tissue Antigens*, v. 64(5), p. 593, 2004.
6. Ardizzone S, Maconi G, Bianchi V, Russo A, Colombo E, Cassinotti A, Penati C, Tenhini ML, Bianchi PG. Multidrug resistance 1 gene polymorphism and susceptibility to inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, v. 13(5), p. 516-23, 2007.
7. Bell JI, Denny DW Jr, McDevitt HO. Structure and polymorphism of murine and human class II major histocompatibility antigens. *Immunol Rev*, v. 84, p. 51-71, 1985.
8. Bourgey M, Calcagno G, Tinto N, Gennarelli D, Margaritte-Jeannin P, Greco L, Limongelli MG, Esposito O, Marano C, Troncone R, Spampinato A, Clerget-Darpoux F, Sacchetti L. HLA related genetic risk for coeliac disease. *Gut*, v. 56(8), p. 1054-9, 2007.
9. Calkins BM, Mendeloff AL. Epidemiology of idiopathic inflammatory bowel disease. In: Kirner JB, Shorter RG. *Inflammatory Bowel Disease*. 4th ed, Williams & Williams, Baltimore, p.31-8, 1995.
10. Cariappa A, Sands B, Forcione D, Finkelstein D, Podolsky DK, Pillai S. Analysis of MHC class II DP, DQ and DR alleles in Crohn's disease. *Gut*. v. 43(2), p. 210-5, 1998.
11. Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Italian Society of Paediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and "Club del Tenue" Working Groups on Coeliac Disease. *Gut*, v. 42, p. 362-365, 1998.
12. Collin P, Kaukinen K, Valimaki M, Salmi J. Endocrinological disorders and celiac disease. *Endocr Rev*,; v. 23, p. 464-483, 2002.

13. Cottone M, Marrone C, Casà A, Oliva L, Orlando A, Calabrese E, Martorana G, Pagliaro L. Familial occurrence of inflammatory bowel disease in celiac disease. *Inflamm Bowel Dis*, v. 9(5), p. 321-3, 2003.
14. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology*, v. 127, p. 412-21, 2004.
15. Dickie WK, Weijers HÁ, and Van de Kamer JH. The presence in wheat of a factor having a deletion a deleterius effects in cases os celiac disease. *Acta Paediatr*,v. 42, p. 34-42. 1953.
16. Dieterich W, Laag E, Schopper H, Volta U, Ferguson A, Gillett H, Riecken EO, Schuppan D. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology*, v. 115(6), p.1317-21, 1998.
17. Erlich H, Lee JS, Petersen JW, Bugawan T, DeMars R. Molecular analysis of HLA class I and class II antigen loss mutants reveals a homozygous deletion of the DR, DQ, and part of the DP region: implications for class II gene order. *Hum Immunol*, v. 16(2), p. 205-19, 1986.
18. Fajardy I, Vambergue A, Stuckens C, Weill J, Danze PM, Fontaine P. CTLA-4 49 A/G dimorphism and type 1 diabetes susceptibility: a French case-control study and segregation analysis. Evidence of a maternal effect. *Eur J Immunogenet*, v. 29(3), p. 251-257, 2002.
19. Farrell RJ, Kelly CP. Celiac sprue. *N Engl J Med*, v. 346, p.180-8, 2002.
20. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K. Prevalence of celiac disease in at-risk and notat-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med* ,v. 163, p. 286-292, 2003.
21. Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of coeliac disease-- active, silent, latent, potential. *Gut*; v. 34, p. 150-151, 1993.
22. Fernandez E, Riestra S, Rodrigo L, Blanco C, Lopez-Vazquez. A, Fuentes D, Moreno M, Lopez-Larrea C. Comparison of six human anti-transglutaminase ELISA-tests in the diagnosis of celiac disease in the Saharawi population. *World J Gastroenterol*, v.11, p. 3762-3766, 2005.
23. Gazouli M, Mantzaris G, Kotsinas A, Zacharatos P, Papalambros E, Archimandritis A, Ikonomopoulos J, Gorgoulis VG. Association between polymorphisms in the Toll-like receptor 4,CD14, and CARD15/NOD2 and inflammatory bowel disease in the Greek population *World J Gastroenterol*, v. 11(5) p. 681-685, 2005
24. Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, Paparo F, Gasperi V, Limongelli MG, Cotichini R, D'Agate C, Tinto N, Sacchetti L, Tosi R, Stazi MA. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*, v. 50, p. 624-628, 2002.

25. Gribben JG, Feeman GJ, Boussiotis VA, Rennert P, JellisCL, Greenfield E, et al. CTLA4 mediates antigen-specific apoptosis of human T Cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 92, p.811-5, 1995.
26. Hadithi M, de Boer H, Meijer JW, Willekens F, Kerckhaert JA, Heijmans R, Peña AS, Stehouwer CD, Mulder CJ. Coeliac disease in Dutch patients with Hashimoto's thyroiditis and vice versa. *World J Gastroenterol*, v.13(11), p. 1715-22, 2007.
27. Henderson KN, Tye-Din JA, Reid HH, Chen Z, Borg NA, Beissbarth T, Tatham A, Mannering SI, Purcell AW, Dudek NL, van Heel DA, McCluskey J, Rossjohn J, Anderson RP. A structural and immunological basis for the role of human leukocyte antigen DQ8 in celiac disease. *Immunity*, v. 27(1), p. 23-34, 2007
28. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. v. 97, p. 3473-3478, 2000.
29. Hoogendoorn B, Owen MJ, Oefner PJ, Williams N, Austin J, O'Donovan MC. Genotyping single nucleotide polymorphisms by primer extension and high performance liquid chromatography. *Hum Genet*, v. 104, p. 89-93, 1999.
30. Hotelling, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *Journal of educational psychology*, v. 24, p. 417-441, 498-520, 1933.
31. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, v. 411, p. 599-603, 2001.
32. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugier L, Naom I, Dupas JL, Van Gossum A, Orholm M, Bonaiti-Pellie C, Weissenbach J, Mathew CG, Lennard-Jones JE, Cortot A, Colombel JF, Thomas G. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature*, v 379, p. 821-823, 1996.
33. International Histocompatibility Working Group, 2006. Class II HLA Typing Primers and Probes. 10-3-2006.
34. Jabri B, Sollid LM. Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.*, v. 3(9), p. 516-25, 2006
35. James SP. Prototypic disorders of gastrointestinal mucosal immune function: Celiac disease and Crohn's disease. *J Allergy Clin Immunol*, v 115 (1), p. 25-30, 2005.
36. Kaukinen, K., Partanen, J., Maki, M., Collin, P. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. *Am. J. Gastroenterol.* v. 97, p. 695-699, 2002.

37. Kim CY, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C, Sollid LM. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 101(12), p. 4175-9, 2004.
38. King AL, Moodie SJ, Fraser JS, Curtis D, Reid E, Dearlove AM, Ellis HJ, Ciclitira PJ. CTLA-4/CD28 gene region is associated with genetic susceptibility to coeliac disease in UK families. *J Med Genet*, v. 39(1), p. 51-4, 2002.
39. Korman AJ, Boss JM, Spies T, Sorrentino R, Okada K, Strominger JL. Genetic complexity and expression of human class II histocompatibility antigens. *Immunol Rev*. v. 85, v. 45-86, 1985.
40. Kristiansen O, Larsen ZM, Pociot F. CTLA-4 in autoimmune diseases – a general susceptibility gene to autoimmunity? *Genes and Immunity* v. 1, 170–184, 2000.
41. Kuster W, Pascoe L, Purmann J, et al. The genetics of Crohn disease: complex segregation analysis of a family study with 265 patients with Crohn disease and 5,387 relatives. *Am J Med Genet*.v. 32, p.105-108, 1989.
42. Leeds JS, Höroldt BS, Sidhu R, Hopper AD, Robinson K, Toulson B, Dixon L, Lobo AJ, McAlindon ME, Hurlstone DP, Sanders DS. Is there an association between coeliac disease and inflammatory bowel diseases? A study of relative prevalence in comparison with population controls. *Scand J Gastroenterol*, v. 42(10), p. 1214-20, 2007.
43. Lo W, Sano K, Lebowitz B, Diamond B, Green PH. Changing presentation of adult celiac disease. *Dig Dis Sci*, v. 48, p. 395-398, 2003.
44. Louka AS, Sollid LM. HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens*, v.61(2), p. 105-117, Review, 2003.
45. Mazzarella G, Maglio M, Paparo F, Nardone G, Stefanile R, Greco L, van de Wal Y, Kooy Y, Koning F, Auricchio S, Troncone R. An immunodominant DQ8 restricted gliadin peptide activates small intestinal immune response in in vitro cultured mucosa from HLA-DQ8 positive but not HLA-DQ8 negative coeliac patients. *Gut*. v. 52(1), p. 57-62, 2003.
46. Mora B, Bonamico M, Indovina P, Megiorni F, Ferri M, Carbone MC, Cipolletta E, Mazzilli MC. CTLA-4 +49 A/G dimorphism in Italian patients with celiac disease. *Hum Immunol*, v. 64(2), p. 297-301, 2003.
47. Moreels TG, Nieuwendijk RJ, De Man JG, De Winter BY, Herman AG, Van Marck EA, Pelckmans PA. Concurrent infection with *Schistosoma mansoni* attenuates inflammation induced changes in colonic morphology, cytokine levels, and smooth muscle contractility of trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. *Gut*, v. 53(1), p. 99-107, 2004.

48. Naser SA, Ghobrial G, Romero C, Valentine JF. Culture of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis from the blood of patients with Crohn's disease. *Lancet*, v. 364, p.1039-44, 2004.
49. Neuhausen SL, Steele L, Ryan S, Mousavi M, Pinto M, Osann KE, Flodman P, Zone JJ. Co-occurrence of celiac disease and other autoimmune diseases in celiacs and their first-degree relatives. *J Autoimmun.* v. 31(2), p. 160-5, 2008.
50. O'Leary C, Walsh CH, Wieneke P, O'Regan P, Buckley B, O'Halloran DJ, Ferriss JB, Quigley EM, Annis P, Shanahan F, Cronin CC. Coeliac disease and autoimmune Addison's disease: a clinical pitfall. *QJM*,; v. 95, p. 79-82, 2002.
51. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nunez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, v. 411: p. 603-606, 2001.
52. Olerup O, Aldener A, Fogdell A . HLA DQB1 and DQA1 typing by PCR amplification with sequence specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 1993 (41): 119-134.
53. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, et al. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med.* v. 324, p. 84-88, 1991.
54. Panwala CM, Jones JC, Viney JL. A novel model of inflammatory bowel disease: mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis. *J Immunol.* v.161 p. 5733-5744, 1998.
55. Person, K., On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *Philosophical Magazine.* v. 6(2), p559-572, 1901.
56. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, v.347, p. 417-429, 2002.
57. Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, v.325, p. 928-937, 1991.
58. Polanco I. Celiac disease. *J Pediatr Gastroenterology*, v. 47 Suppl 1:S3-6, 2008
59. Randolph GJ, Beaulieu S, Pope M, et al. A physiologic function for pglycoprotein (MDR-1) during the migration of dendritic cells from skin via afferent lymphatic vessels. *Proc Natl Acad Sci USA.* v. 95, p. 6924-6929, 1998.
60. Reinton N, Helgheim A, Shegarfi H, Moghaddam A. A one-step real-time PCR assay for detection of DQA1*05, DQB1*02 and QB1*0302 to aid diagnosis of celiac disease. *Journal of Immunological Methods* 316 (2006) 125-132.
61. Riestra S, Dominguez F, Fernandez-Ruiz E, Garcia-Riesco E, Nieto R, Fernandez E, Rodrigo L. Usefulness of duodenal biopsy during routine upper gastrointestinal endoscopy for diagnosis of celiac disease. *World J Gastroenterol*, v. 12, p. 5028-5032, 2006.

62. Rodrigo L. Celiac disease. *World J Gastroenterol* , v.12(41), p. 6585-6593, 2006.
63. Rostami K, Malekzadeh R, Shahbazkhani B, Akbari MR, Catassi C. Coeliac disease in Middle Eastern countries: a challenge for the evolutionary history of this complex disorder? *Dig Liver Dis*, v. 36, p. 694-697, 2004.
64. Sachs JA, Awad J, McCloskey D, Navarrete C, Festenstein H, Elliot E, Walker-Smith JA, Griffiths CE, Leonard JN, Fry L. Different HLA associated gene combinations contribute to susceptibility for coeliac disease and dermatitis herpetiformis. *Gut*. V. 27(5), p. 515-20, 1986.
65. Sampaio, I. Relatório das atividades de pós-doutorado desenvolvidas no período de 03/09/92 a 04/03/93. Madrid: Universidade politécnica de Madrid, 1993, 123f.
66. Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology*, v. 119, p. 234-242. 2002.
67. Sdepanian VL, Morais MB de, Fagundes-Neto U. Doença celíaca: a evolução dos conhecimentos desde sua centenária descrição original até os dias atuais. *Arq Gastroentero*, v.36 (4), p. 244-257, 1999.
68. Shaoul R, Karban A, Weiss B, Reif S, Wasserman D, Pacht A, Eliakim R, Wardi J, Shirin H, Wine E, Leshinsky-Silver E, Levine A. NOD2/CARD15 mutations and presence of granulomas in pediatric and adult Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. v. 10(6), p. 709-14, 2004.
69. Smyth MJ, Krasovski E, Sutton VR, et al. The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v . 95, p. 7024-7029, 1998.
70. Susi M, Holopainen P, Mustalahti K, Mäki M, Partanen J. Candidate gene region 15q26 and genetic susceptibility to coeliac disease in Finnish families. *Scand J Gastroenterol*, v. 36(4), p. 372-4, 2001
71. Thoreson R, Cullen JJ. Pathophysiology of Inflammatory Bowel Disease: An Overview. *Surg Clin N Am*, v. 87, p.575–585, 2007.
72. Xiao W, Oefner P. Deanturing High Performance Liquid Chromatography: A review. *Human Mutation*, v. 17, p.439-474, 2001.
73. Yachha SK, Misra S, Malik AK, Nagi B, Mehta S. Spectrum of malabsorption syndrome in north Indian children. *Indian J Gastroenterol*; v.12, p. 120-125, 1993.
74. Yang A, Chen Y, Scherl E, Neugut AI, Bhagat G, Green PH. Inflammatory bowel disease in patients with celiac disease. *Inflamm Bowel Dis*, v.11(6), p. 528-32, 2005.
75. Zalloua PA, Abchee A, Shbaklo H, Zreik TG, Terwedow H, Halaby G, Azar ST. Patients with early onset of type 1 diabetes have significantly higher GG genotype at position 49 of the CTLA4 gene. *Hum Immunol*. v. 65(7), p. 719-24, 2004.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

Metodologia indisponível temporariamente até a obtenção de registro junto ao Instituto Nacional de propriedade Intelectual.

Metodologia submetida à pedido de patente.

Anexo II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto: Predisposição genética a doença celíaca e a doença inflamatória intestinal

A doença celíaca, doença de Crohn e colite ulcerativa são doenças que afetam o trato gastro intestinal e que causam um quadro de diarreia com conseqüente desnutrição crônica em Algumas situações, o diagnóstico diferencial entre estas doenças torna-se difícil pois elas possuem vários sintomas em comum. Por possuírem um caráter genético, este trabalho tem como objetivos: identificar genes que possam influenciar no desenvolvimento da doença de auxiliar no diagnóstico diferencial destas

Fica garantido a todos o sigilo sobre os dados clínicos e laboratoriais, e a proteção de sua identidade em caso de publicação na imprensa científica. Não recairá sobre os participantes da pesquisa nenhum ônus ou despesa financeira.

A coordenadoras do projeto é a Profa. Dra. ANA LÚCIA BRUNIALTI GODARD e será desenvolvido no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Todo o material biológico, após a extração de DNA, será descartado segundo normas da Vigilância Sanitária.

Eu, _____, concordo em participar do trabalho “Determinação e identificação de predisposição genética a doença celíaca, doença de Crohn e colite ulcerativa em indivíduos com quadro de desnutrição crônica”. Eu declaro que fui orientado das finalidades da pesquisa e que não terei nenhum ônus em participar desta Eu concordo com a coleta de sangue em mim ou em membros da minha família para o estudo acima citado.

Assinatura: _____

Data: ___ / ___ / ___

Prof. Dra. Ana Lúcia Brunialti Godard
Coordenadora do projeto

Anexo III Produção bibliográfica durante o período de Doutorado.

ARTIGOS ACEITOS

Type 1 diabetes susceptibility determined by HLA alleles and CTLA-4 and insulin genes polymorphisms in Brazilians. Alessandro Clayton Souza Ferreira, Karina Braga Gomes, Ivan Barbosa Machado Sampaio, Vanessa Cristina de Oliveira, Victor Cavalcanti Pardini, Ana Lúcia Brunialti Godard

Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 2008

ARTIGOS SUBMETIDOS

Evidence of genetic influence on Type I diabetes onset age in Brazilian individuals. Ferreira ACS, Sampaio IBM, Pardini VC, Godard ALB

Enviado à Biometrics – Fevereiro de 2008

Mutação A985G no gene da MCAD: É preciso fazer rastreamento neonatal no Brasil. Alessandro Clayton Souza Ferreira*, Maria da Penha de Almeida Orlandi*, Vanessa Cristina de Oliveira, Karina Braga Gomes, Frederico Scott Varela Malta, Fabíola Andrade Caxito, Eugênia Ribeiro Valadares, Ana Lucia Brunialti Godard.

Enviado a Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, em 28/11/08

S65C: What does Brazil have to say about this rare mutation in HFE gene?"

Vanessa Cristina de Oliveira, Fabíola Andrade Caxito, Karina Braga Gomes, Amanda Máfia de Castro, Victor Cavalcanti Pardini e Alessandro Clayton de Souza Ferreira.

Enviado a Genetics and Molecular Research, em 03/12/08.

ARTIGOS PUBLICADOS

FERREIRA, Alessandro C Souza; CABRAL, ACV.; ANGELO, PC; LEITE, HV; PEREIRA, AK; LOPES, APBM.; OLIVEIRA, MB; GOMES, Karina Braga; PARDINI, Victor Cavalcanti. Isolamento, diferenciação e aspectos bioquímicos de células tronco de líquido amniótico. Rev. Assoc. Med. Bras. 54(6):489-93, 2008.

C.O. Possamai, F.M. Carvalho, M.F.C. Silva, E.V. Wolfgramm, M.P.N. Sartori, F.S.V. Malta, V.P. Ribeiro, V.P. Spina, K.B. Gomes, A.C.S. Ferreira and I.D. Louro. Utility of STR markers for the molecular diagnosis of a large Brazilian family with Charcot-Marie-Tooth disease. Genet. Mol. Res. 7 (4): 1179-1185 (2008)

REIS, AHO; FERREIRA, Alessandro C de Souza; GOMES, Karina Braga; Aguiar, MJB.; FONSECA, CG.; Cardoso, FE. ; PARDINI, Victor Cavalcanti; Carvalho, MRS. Frequency of FMR1 premutation in individuals with ataxia and/or tremor and/or parkinsonism. Genetics and Molecular Research, v. 7, p. 74-84, 2008.

OLIVEIRA, Vanessa Cristina; CAXITO, Fabiola Andrade; GOMES, Karina Braga; CASTRO, Amanda Mafia; PARDINI, Victor Cavalcanti; FERREIRA, Alessandro C Souza. Prevalence of mutations C282Y and H63D of gene HFE in individuals under clinical suspicion of Hereditary Hemochromatosis from Brazil. Rev. Bras. Hematol. Hemot. v.30(5):379-83, 2008.

OLIVEIRA, Vanessa Cristina; MALTA, Frederico S Varela; PEDROSA, Willian; PARDINI, Victor Cavalcanti; FERREIRA, Alessandro C Souza. Importância da identificação das mutações do proto-oncogene RET e sua atuação na formação do fenótipo das neoplasias endócrinas múltiplas tipo 2. RBAC, 2008. 40(3): 237-41.

PAIVA, Sabrina Guimaraes; SOARES, Jerusa Batistele; OLIVEIRA, Vanessa Cristina; PARDINI, Victor Cavalcanti; FERREIRA, Alessandro C Souza. Mutações predisponentes à trombofilia em indivíduos de Minas Gerais - Brasil com suspeita clínica de trombose. Rev. Bras. Hematol. Hemot, 2008. v 30.

MALTA, Frederico S Varela; TORRES, Patrícia Oliveira Ribeiro; FERREIRA, Alessandro C Souza; PARDINI, Victor Cavalcanti. Determinação do sexo do feto através de uma nova técnica não invasiva baseada em PCR. RBAC, 2008. 40(3):203-4.

K. B. GOMES, V. CAVALCANTI PARDINI, A. CLAYTON DE SOUZA FERREIRA and A. P. FERNANDES. Phenotypic heterogeneity in biochemical parameters correlates with mutations in AGPAT2 or Seipin genes among Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy patients. J. Inherit. Metab. Dis. 28 (2005) 1123–1131

K. B. Gomes, V. C. Pardini, A. C. S. Ferreira, C. G. Fonseca and A. P. Fernandes. Founder Effect of the 669insA Mutation in BSCL2 Gene Causing Berardinelli-Seip Congenital Lipodystrophy in a Cluster from Brazil

CAPÍTULO DE LIVRO PUBLICADO

FERREIRA, Alessandro Clayton de Souza; PARDINI, Victor Cavalcanti;. DOENÇAS GENÉTICAS FETAIS. In: Antonio Carlos Vieira Cabral. (Org.). O feto como paciente. 01 ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2005, v. 01, p. 117-127.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)