

MÁRCIA LUIZA BAPTISTA

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES *CARD15* E *IL23R* COM A  
DOENÇA DE CROHN EM UMA POPULAÇÃO BRASILEIRA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde,  
da Universidade Federal do Paraná, para a  
obtenção de título de Doutor em Medicina Interna.

Orientador: Prof. Dr. José Hermênio Cavalcante  
Lima Filho

CURITIBA

2008

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

Baptista, Márcia Luiza

**Associação de Polimorfismos dos Genes *CARD15* e  
*IL23R* com a Doença de Crohn em uma População Brasileira**  
Márcia Luiza Baptista. Curitiba, 2008. 113 f.

Orientador: Prof. Dr. José Hermênio Cavalcante Lima Filho

Tese (Doutorado) – Medicina Interna. Setor de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal do Paraná.

1. Doença de Crohn. 2. *CARD15*. 3. *IL23R*. 4. Polimorfismos.  
I. Título. II. Lima Filho, José Hermênio Cavalcante

CDU 61 (047.3)

*A Deus o meu louvor,  
pela realização deste trabalho;  
conferindo-me perseverança e ânimo  
no avanço de mais um elevado degrau do árduo e  
contínuo desafio do conhecimento médico.*

*Aos meus pais, Rosa e Antonio,  
pelo amor e abnegação próprios,  
proporcionando aos filhos  
o que de melhor poderiam dar.*

## AGRADECIMENTOS

Ao **Dr Subra Kugathasan**, professor associado de Pediatria do Medical College of Wisconsin, diretor do Centro de Doença Inflamatória Intestinal Pediátrica do Children's Hospital of Wisconsin, médico pesquisador na área de genética e epidemiologia em Doença Inflamatória Intestinal, pela grande colaboração na conquista deste trabalho, disponibilizando tecnologia avançada para realização da genotipagem.

Ao **Dr. José Hermênio Cavalcante Lima Filho**, docente do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), médico pesquisador na área de Imunologia, orientador deste trabalho, pelo seu auxílio e competência no ensino.

À **Dra. Heda Amarante**, chefe do Serviço de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas da UFPR, professora assistente da Disciplina de Gastroenterologia do Departamento de Clínica Médica da UFPR, médica responsável pelo ambulatório de Doença Inflamatória Intestinal do HC-UFPR, por toda contribuição na realização deste trabalho.

Ao **Dr. Geraldo Picheth**, professor da Disciplina de Bioquímica do Centro Politécnico da UFPR, pesquisador na área de genética em diversas patologias, pela competência, orientação e por suas valiosas sugestões no aperfeiçoamento deste trabalho.

Às colegas **Divandrea Martins Matoski** e **Andréa Souza Reis**, técnicas do Laboratório de Imunogenética do HC-UFPR, pelo auxílio na execução da metodologia laboratorial.

Aos colegas, **Umesh Babusukumar** e **Nicholas Peterson**, técnicos do Laboratório de Genotipagem do Medical College of Wisconsin, pela ajuda indispensável na realização da análise genética.

À **Dra. Vera Lúcia Sdepanian**, professora de Gastroenterologia Pediátrica da Universidade Federal de São Paulo e Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM), médica responsável pelo ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital São Paulo, pelo auxílio no recrutamento de pacientes pediátricos com doença de Crohn.

À **Dra. Eloá Marussi Morsoletto Machado**, médica do Serviço de Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva do HC-UFPR, pela ajuda com pacientes com doença de Crohn.

À **Dra. Aline Oba**, médica Gastroenterologista, coordenadora da Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn (ABCD) de Maringá/PR, pela ajuda com pacientes com doença de Crohn.

Ao **Dr. Alfredo Zeppeda Wills**, médico Gastroenterologista Pediátrico, em Londrina/PR, pela ajuda com pacientes com doença de Crohn.

À **Associação Brasileira de Colite Ulcerativa e Doença de Crohn** (ABCD) de Curitiba, pelos pacientes fornecidos e pelas palestras interessantes sobre a doença de Crohn.

À minha irmã, **Dra. Maria Aparecida Batista**, médica anesthesiologista do Hospital Nossa Senhora das Graças, pelo apoio e incentivo ao longo da jornada para realização deste trabalho.

À minha gratidão a todos os pacientes que aceitaram colaborar para a realização deste trabalho, os quais aguardam com expectativa os resultados de novas pesquisas médicas na busca do melhor entendimento da doença de Crohn e descoberta de novas terapias.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE FIGURA E GRÁFICOS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	x
<b>RESUMO</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVOS.....	4
1.1.1 Objetivo Geral.....	4
1.1.2 Objetivos Específicos.....	4
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	5
2.1 O Gene <i>CARD15</i> .....	5
2.2 Polimorfismos do Gene <i>CARD15</i> e Doença de Crohn.....	9
2.3 Polimorfismos do Gene <i>CARD15</i> e Risco da DC em Diferentes Grupos Étnicos.....	11
2.4 Associação Genótipo-Fenótipo para o Gene <i>CARD15</i> .....	14
2.5 O Papel da Interleucina 23 na Inflamação Intestinal.....	15
2.6 Polimorfismos do Gene <i>IL23R</i> .....	19
2.7 Perspectivas do Bloqueio da IL-23 para o Tratamento da Doença de Crohn.....	21
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	23
3.1 Desenho do Estudo.....	23
3.2 População de Estudo.....	23
3.3 Características Clínicas dos Pacientes em Estudo.....	24
3.4 Características Étnicas da População em Estudo.....	25
3.5 Extração de DNA em Amostra de Sangue Periférico.....	26
3.5.1 Procedimento Técnico do Método <i>Salting-Out</i> .....	26
3.5.2 Genotipagem do <i>CARD15</i> E <i>IL23R</i> .....	27
3.6 Análise Estatística.....	29
<b>4 RESULTADOS</b> .....	30
4.1 Polimorfismos do Gene <i>CARD15</i> .....	31
4.2 Polimorfismos do Gene <i>IL23R</i> .....	32
4.3 Aderências ao Equilíbrio de <i>Hardy-Weinberg</i> .....	33
4.4 Associação Genótipo-Fenótipo para os Polimorfismos dos Genes <i>CARD15</i> e <i>IL23R</i> .....	34
4.5 Associação entre Características Étnicas e Genótipos dos Genes <i>CARD15</i> e <i>IL23R</i> .....	41

<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	58
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	59
<b>APÊNDICES</b> .....	70
<b>ANEXOS</b> .....	103



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. FREQUÊNCIA DO ALELO RARO DOS POLIMORFISMOS R702W, G908R E 3020insC DO GENE <i>CARD15</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	12
TABELA 2. FREQUÊNCIA DO ALELO RARO DOS POLIMORFISMOS rs1004819, rs7517847, rs11209026, rs1495965 E rs10889677 DO GENE <i>IL23R</i> EM DIFERENTES POPULAÇÕES.....	21
TABELA 3. SÍTIOS POLIMÓRFICOS E REGIÃO FLANQUEADORA PARA OS POLIMORFISMOS EM ESTUDO.....	28
TABELA 4. CARACTERÍSTICAS DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO.....	29
TABELA 5. DISTRIBUIÇÃO DOS 187 PACIENTES DO GRUPO-CROHN DE ACORDO COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E ÉTNICAS.....	30
TABELA 6. COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA OS POLIMORFISMOS DO GENE <i>CARD15</i> NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	31
TABELA 7. COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA OS POLIMORFISMOS DO GENE <i>IL23R</i> NOS GRUPOS EM ESTUDO.....	32
TABELA 8. FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>IL23R</i> NOS PACIENTES E CONTROLES .....	33
TABELA 9. ANÁLISE DO EQUILÍBRIO DE <i>HARDY-WEINBERG</i> PARA OS POLIMORFISMOS EM ESTUDO.....	34
TABELA 10. ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E OS GENÓTIPOS DE PACIENTES PORTADORES DE POLIMORFISMOS DO GENE <i>CARD15</i> EM ESTUDO.....	35
TABELA 11. ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E OS GENÓTIPOS DE PACIENTES PORTADORES DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>IL23R</i> EM ESTUDO.....	38
TABELA 12. ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS ÉTNICAS E OS GENÓTIPOS DE PACIENTES PORTADORES DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>CARD15</i> EM	

ESTUDO..... 41

TABELA 13. ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS ÉTNICAS E OS GENÓTIPOS DE  
PACIENTES PORTADORES DOS POLIMORFISMOS DO GENE *IL23R* EM  
ESTUDO..... 41

## LISTA DE FIGURA E GRÁFICOS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENE E DA PROTEÍNA CARD15.....	6
FIGURA 2. VIAS DE SINALIZAÇÃO DOS RECEPTORES <i>TOLL-LIKE</i> E CARD15.....	8
FIGURA 3. MÚLTIPLAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DA IL-23 NA INFLAMAÇÃO INTESTINAL.....	17
FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENE <i>IL23R</i> E LOCALIZAÇÃO DOS POLIMORFISMOS ASSOCIADOS À DOENÇA DE CROHN PESQUISADOS NO PRESENTE ESTUDO.....	20
GRÁFICO 1. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO A IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA E GENÓTIPOS DO GENE <i>CARD15</i> .....	36
GRÁFICO 2. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO A LOCALIZAÇÃO DA DOENÇA E GENÓTIPOS DO GENE <i>CARD15</i> .....	36
GRÁFICO 3. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO O COMPORTAMENTO DA DOENÇA E GENÓTIPOS DO GENE <i>CARD15</i> .....	37
GRÁFICO 4. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM HISTÓRIA PRÉVIA DE CIRURGIA E GENÓTIPOS DO GENE <i>CARD15</i> .....	37
GRÁFICO 5. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO A IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA E GENÓTIPOS DO GENE <i>IL23R</i> .....	39
GRÁFICO 6. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO A LOCALIZAÇÃO DA DOENÇA E GENÓTIPOS DO GENE <i>IL23R</i> .....	39
GRÁFICO 7. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO O COMPORTAMENTO DA DOENÇA E GENÓTIPOS DO GENE <i>IL23R</i> .....	40
GRÁFICO 8. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM HISTÓRIA PRÉVIA DE CIRURGIA E GENÓTIPOS DO GENE <i>IL23R</i> .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg	-	Arginina
C	-	Citosina
CARD15	-	<i>Caspase recruitment domain-containing protein 15</i>
CXC	-	Quimiocina CX
DC	-	Doença de Crohn
DII	-	Doença Inflamatória intestinal
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
DP	-	Desvio padrão
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetracético
FA	-	Frequência alélica
FN- $\kappa\beta$	-	Fator nuclear kappa beta
Fs	-	<i>frameshift</i>
G	-	Glicina
GI	-	Gastrointestinal
Gln	-	Glutamina
Gly	-	Glicina
IBD	-	<i>Inflammatory bowel disease</i>
IFN- $\gamma$	-	Interferon gama
I $\kappa\beta$	-	Quinase kappa beta
IL	-	Interleucina
IL-1	-	Interleucina 1
IL-6	-	Interleucina 6
IL-10	-	Interleucina 10
IL-12	-	Interleucina 12
IL-17	-	Interleucina 17
IL-23	-	Interleucina 23
IL23R	-	Receptor da interleucina 23
InsC	-	Inserção de citosina
IPAF	-	Fator de ativação da protease- <i>ice</i>
K	-	Potássio
Leuc	-	Leucina
M	-	Molar
MDP	-	Muramildipeptídeo
NaCl	-	Cloreto de sódio
NK	-	<i>Natural killer</i>
nm	-	Nanômetro
NOD	-	<i>Nucleotide oligomerization domain</i>
OR	-	<i>Odds ratio</i>

PAMPs	-	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PCR	-	Reação em cadeia da polimerase
PRRs	-	<i>Pattern recognition receptors</i>
R	-	Arginina
RCLB	-	Tampão de lise de células vermelhas
RCU	-	Retocolite ulcerativa
RIP2	-	<i>Receptor-interacting protein 2</i>
rpm	-	Rotações por minuto
RRL	-	Região rica em leucina
SDS	-	Dodecil sulfato de sódio
SNPs	-	<i>Single Nucleotide polymorphisms</i>
TGF- $\beta$	-	Fator de crescimento de transformação beta
TLR	-	Receptores <i>Toll-like</i>
Th	-	Linfócito T auxiliador
TNF	-	Fator de necrose tumoral
TRAF6	-	Fator 6 associado ao receptor de TNF
Trp	-	Triptofano
U	-	Unidade
vs	-	<i>versus</i>
W	-	Triptofano

## RESUMO

A doença de Crohn (DC) é considerada uma doença inflamatória crônica multifatorial. As descobertas dos genes *CARD15/IL23R* têm conduzido à investigação da imunidade da mucosa intestinal na DC a uma nova era. Ambos genes apresentam papel importante na regulação intestinal na sinalização pró-inflamatória em resposta a distintos ligantes bacterianos, e podem estimular diversas respostas inflamatórias levando à inflamação intestinal aguda e crônica. A incidência da DC está aumentando no Brasil como observado em muitas populações ocidentais. Devido à existência de diferenças étnicas com respeito à influência de polimorfismos genéticos, e porque não tem sido descritos estudos de genotipagem em pacientes com DC no Brasil, nossos objetivos foram investigar a presença de polimorfismos dos genes *CARD15* e *IL23R* em uma população brasileira e analisar a associação genótipo-fenótipo neste grupo. Cento e oitenta e sete pacientes procedentes dos estados do Paraná e São Paulo participaram do estudo. O grupo-controle foi composto de 255 pacientes que foram pareados de acordo com idade e etnia. A etnicidade da população estudada foi composta predominantemente por brasileiros (58,9%) que negaram qualquer miscigenação étnica até a quarta geração nos seus ancestrais, e por euro-brasileiros (38,0%). Pacientes e controles foram genotipados para os três principais polimorfismos de base única (SNPs) do gene *CARD15* - R702W, G908R e 3020insC - e para cinco SNPs do gene *IL23R* - rs1004819, rs7517847, rs11209026, rs1495965 e rs10889677. As reações de genotipagem foram realizadas pela tecnologia *ABI's Taqman Assays-by-Design* usando um sistema de detecção de sequência automatizado ABI 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA). A mediana de idade foi de 33 anos (8-72 anos), e a mediana de idade de início da doença foi de 23 anos (1-60 anos). Pelo menos um SNP de risco do gene *CARD15* foi presente em 30% dos pacientes, e em 10% dos controles. Os polimorfismos do gene *CARD15* (R702W, 3020insC) e do *IL23R* (rs1004819, rs11209026 e rs10889677) foram associados à DC. O SNP R702W do gene *CARD15* e o rs1004819 do *IL23R* mostraram a mais elevada contribuição de risco à DC, enquanto o rs11209026 (Arg381Gln) conferiu efeito protetor. O presente estudo não encontrou qualquer associação entre genótipo-fenótipo. No entanto, estes resultados não refletem toda a população brasileira, não somente pela diversidade étnica do país, mas também devido a diferenças de fatores ambientais de cada região. O conhecimento do risco étnico específico para os SNPs dos genes da DC pode contribuir no desenvolvimento de medidas terapêuticas específicas para populações étnicas diferentes no futuro.

Palavras-chave: Doença de Crohn. *CARD15*. *IL23R*. Polimorfismos de Base Única (SNPs). Genótipo-Fenótipo.

## ABSTRACT

Crohn's disease (CD) is a multifactorial chronic inflammatory bowel disease. The discoveries of *CARD15/IL23R* genes have led the investigation of mucosal immunity in CD to a new era. Both genes play a major role in intestinal regulation of proinflammatory signaling in response to distinct bacterial ligands, and may stimulate diverse inflammatory responses leading to acute and chronic intestinal inflammation. The incidence rate for CD is increasing in Brazil as observed in many other western populations. Due to the existing ethnical differences with respect to the influence of gene polymorphisms, and because no replication genotyping studies on CD patients have been reported in Brazil until now, our aims were to investigate the presence of *CARD15* and *IL23R* polymorphisms in a Brazilian population and to analyse genotype-phenotype correlations in this group. One hundred eighty-seven CD patients proceeding from Paraná and São Paulo states were enrolled. Control group was composed by 255 individuals that were aged and ethnically matched. The population ethnicity was greatly composed by Brazilian (58,9%) that denied any ethnic admixture background until the fourth generation and Euro-Brazilian (38,0%). Patients and controls were genotyped for three main *CARD15* gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) – R702W, G908R and 3020insC – and for five *IL23R* SNPs – rs1004819, rs7517847, rs11209026, rs1495965 and rs10889677. All genotyping reactions were performed on ABI's Taqman Assays-by-Design technology using the ABI 7900HT automated sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA). Median age was 33 years (8-72 years), and the median disease onset age was 23 years (1-60 years). At least one *CARD15* risk SNP was present in 30% of the CD patients, and in 10% of controls. *CARD15* SNPs (R702W, 3020insC) and *IL23R* (rs1004819, rs11209026 and rs10889677) were associated with CD. The R702W SNP of the *CARD15* gene and the rs1004819 of the *IL23R* showed the strongest contribution for the risk of CD, while the rs11209026 (Arg381Gln) conferred a protective effect. However, no genotype-phenotype associations were found among Brazilian CD population with *CARD15/IL23R* polymorphisms. The present study confirms that *CARD15/IL23R* genes SNPs confer susceptibility to CD in a Brazilian population. Our study did not find any association between genotype-phenotype. Nevertheless, these results may not reflect the whole Brazilian population, not only because of the ethnic diversity of our country, but also due to the differences of the environmental factors of each region. Understanding ethnic-specific risk for SNPs in CD genes may be helpful for developing therapeutic measures specific to different ethnic populations in the future.

Key-words: Crohn's disease. *CARD15*. *IL23R*. Singlenucleotide polymorphisms (SNPs). Genotype-Phenotype.

## 1 INTRODUÇÃO

A doença de Crohn (DC) é uma doença inflamatória crônica do trato gastrointestinal, que pode envolver qualquer segmento desde a boca até ao ânus. A presença de áreas de mucosa normal intercalando áreas afetadas pela doença, isto é, o envolvimento segmentar, acometendo toda parede do órgão e com lesões tipicamente granulomatosas do intestino caracteriza a DC, diferenciando-a da retocolite ulcerativa (RCU) que apresenta envolvimento confinado à mucosa do cólon, de forma contínua (AHMAD *et al.*, 2002).

A DC apresenta ampla heterogeneidade de manifestações clínicas que variam desde formas inflamatórias até formas graves, estenosantes e fistulizantes. A morbidade da DC está relacionada com sintomas crônicos de diarreia, dor abdominal e desnutrição, os quais têm um impacto significativo na qualidade de vida. A maioria dos pacientes necessita tratamento medicamentoso, com até 50% de terapia imunossupressora, e um número semelhante de pacientes necessita cirurgia dentro de cinco anos após o diagnóstico (HUME e SMITH, 2002).

A DC ocorre em crianças e adultos, com um pico de incidência entre 15 e 30 anos. A incidência da DC tem aumentado nas últimas três décadas em quase todos os países ocidentais. Estudos epidemiológicos mostram que a incidência e a prevalência da DC variam significativamente dependendo da área geográfica e do grupo étnico (BONEN e CHO, 2003). A distribuição das taxas de prevalência tem variado, para cada 100.000 habitantes, de 43,6 entre caucasianos, de 29,8 entre afro-americanos, de 4,1 entre hispânicos, e de 5,6 entre asiáticos. Entre os grupos étnicos, os judeus apresentam maior risco de DC comparado com caucasianos não-judeus (MARSH e McLEOD, 2003).

Avanços científicos demonstram que a DC apresenta etiopatogenia multifatorial, envolvendo uma interação complexa entre fatores ambientais (*i.e.*, microbiota intestinal), imunológicos, e predisposição genética (CHAMBERLIN e NASER, 2006; XAVIER e PODOLSKY, 2007).

A hipótese de que um único agente patogênico possa desencadear a DC tem sido investigada. Viroses específicas e bactérias, incluindo *Mycobacterium spp.*, *Listeria spp.*, *Yersinia spp.* e *Escherichia coli spp.* foram descritos, mas os resultados são contraditórios (HUME e SMITH, 2002; <sup>a</sup>GIRARDIN *et al.*, 2003).



Atualmente, evidências sugerem que a microbiota intestinal, a qual representa enorme reserva antigênica com aproximadamente  $10^{14}$  organismos de pelo menos 500 espécies, seja o alvo principal na resposta imune desregulada em pacientes com DC. Em indivíduos saudáveis a interação microbiota-hospedeiro é citoprotetora para a camada epitelial e assegura a homeostasia imune da mucosa intestinal. Porém, quando ocorre um mecanismo de quebra da tolerância imune, a microbiota é apontada como um determinante crítico da inflamação intestinal (FIOCCHI, 2004; SCHIFFRIN e DONNET-HUGHES, 2006). Evidência para esta inferência é provida pelo benefício terapêutico observado com o uso de antibióticos e, em particular, o de probióticos (FIOCCHI, 2007).

Durante a última década, mudanças gradativas ocorreram em relação ao conceito da imunopatogênese da DC, direcionando a atenção para o importante papel da imunidade inata. O reconhecimento de antígenos bacterianos pelos receptores de padrões moleculares associados a patógenos, representados pelos receptores *Toll-like* e proteínas do domínio de oligomerização nucleotídea (NOD) (*nucleotide oligomerization domain*) expressados nas células sentinelas da barreira epitelial intestinal, releva que as células epiteliais, dendríticas, e macrófagos podem estar na posição de comando da imunidade da mucosa na saúde e na inflamação (FIOCCHI, 2007; BAMIAS e COMINELLI, 2007). Uma falha na resposta imune inata parece ser o defeito primário na DC, como a alteração de sinalização do NOD2 e outras deficiências ainda não identificadas (XAVIER e PODOLSKY, 2007).

Por mais de 20 anos, foi aceito o paradigma do predomínio da resposta imune adaptativa de polarização *T helper* 1 (Th1) na DC. Este conceito está rapidamente mudando, pela evidência recente de uma nova via efetora mediadora da inflamação intestinal na DC, descrita como células Th17 (linfócitos T que produzem interleucina 17 (IL-17), IL-6, e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). Com o advento das células Th17, a IL-23/IL-17 ganhou o foco da atenção, juntamente com o fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e IL-6. Acredita-se que a IL-23 seja responsável pela manutenção ou estabilização da resposta Th17 e, junto com seu receptor, o IL-23R, são apontados como importante via de sinalização na imunopatogênese da DC (BAMIAS e COMINELLI, 2007; McGOVERN e POWRIE, 2007).

Os fatores genéticos de susceptibilidade à DC são evidenciados por estudos que demonstram maior concordância da doença em gêmeos monozigóticos que em dizigóticos, e em estudos de agregação familiar (BAYLESS *et al.*, 1996; COLOMBEL *et al.*, 1996; FIOCCHI, 1998; RICHARD, 2003). A maioria dos estudos demonstra frequência de 5% a 20% de doença inflamatória intestinal na história familiar dos pacientes com DC (RICHARD, 2003). Atualmente, a pesquisa de genes relacionados à susceptibilidade da DC representa um grande desafio por causa da complexidade dos fatores genéticos envolvidos, incluindo a ausência de um mecanismo de transmissão mendeliano, a penetrância gênica, a heterogeneidade genética, e a multiplicidade de genes de susceptibilidade envolvidos (DUERR *et al.*, 2003; ZHENG *et al.*, 2003; MENDOZA e TAXONERA, 2005).

Na última década, vários estudos de análise de ligação seguidos por estudos de análise sistêmica do genoma demonstraram evidências de polimorfismos genéticos associadas a DC em muitos genes. Esforços conjuntos em vários centros de pesquisa têm alcançado sucesso na identificação de genes na DC, incluindo *CARD15 (NOD2)* (HUGOT *et al.*, 2001; OGURA *et al.*, 2001), *DLG5* (STOLL *et al.*, 2004), *SLC22A4* e *SLC22A5* (PELTEKOVA *et al.*, 2004), *CARD4 (NOD1)* (McGOVERN *et al.*, 2005), *IL23R* (DUERR *et al.*, 2006), *ATG16L1*, *PHOX2B* e *NCF4* (RIOUX *et al.*, 2007; PARKES *et al.*, 2007). No entanto, nenhum dos *loci* destes genes confere um risco relativo maior que 2, comprovando que a DC é um distúrbio poligênico complexo (RIOUX *et al.*, 2000; AHMAD *et al.*, 2004; HUGOT e JUNG, 2006).

O conhecimento de bases genéticas na DC e em outras doenças de complexidade genética poderá revelar mecanismos patogênicos valiosos e contribuir em avanços terapêuticos direcionados ao contexto funcional de cada polimorfismo e evento tecidual específico. Dados estão rapidamente se acumulando que suportam a noção que a diversidade de manifestações clínicas da DC é um reflexo de distintas vias imunogenéticas que podem ocorrer no mecanismo fisiopatológico da doença (BAMIAS e COMINELLI, 2007).

Pela importância recentemente demonstrada de polimorfismos dos genes *CARD15* e *IL23R* na fisiopatologia da DC, e pela implicação do risco étnico específico para a DC entre vários subgrupos populacionais, considerou-se relevante a realização do presente estudo. Destaca-se ainda que o presente estudo é pioneiro

na análise dos polimorfismos dos genes *CARD15* e *IL23R* em pacientes com a DC na população brasileira.

## OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Pesquisar a associação entre polimorfismos dos genes *CARD15* e *IL23R* com a doença de Crohn em uma população brasileira.

### 1.1.2 Objetivos específicos

1. Determinar a frequência dos polimorfismos R702W, G908R e 3020insC do gene *CARD15* e dos polimorfismos rs1004819, rs7517847, rs11209026 (Arg381Gln), rs1495965 e rs10889677 do gene *IL23R* em uma população com a doença de Crohn e em um grupo-controle;
2. Associar os polimorfismos em estudo com o fenótipo da doença de Crohn;
3. Avaliar a possibilidade de uso dos polimorfismos em estudo como fatores de risco ou proteção para a doença de Crohn na população brasileira.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 O Gene *CARD15*

Em 1996, foi descoberto o primeiro *locus* de susceptibilidade para a DC, denominado IBD1 (*Inflammatory Bowel Disease*), que contribuiu para o avanço importante do entendimento da gênese genética da DC (HUGOT *et al.*, 1996). Em 2001, dois grupos independentes, HUGOT *et al.*, na França, e OGURA *et al.*, nos EUA, demonstraram associação entre DC e polimorfismos no gene *CARD15*, precisamente dentro do IBD1, na região pericentromérica do cromossomo 16 (16q12) (HUGOT *et al.*, 2001; OGURA *et al.*, 2001). A evidência da associação entre DC e o *locus* IBD1 foi demonstrado no mesmo ano, pelo Comitê Internacional de Genética, em estudo de replicação envolvendo três continentes (THE IBD INTERNATIONAL GENETICS CONSORTIUM, 2001). O relevante gene de susceptibilidade para DC originalmente conhecido como *NOD2* foi depois renomeado de gene da proteína 15 do domínio de recrutamento da caspase (*CARD15*) (*Caspase recruitment domain-containing protein 15*) pelo Comitê de Nomenclatura Internacional, e é o gene mais estudado na DC (HAMPE *et al.*, 2002).

O gene *CARD15* contém 12 exons, incluindo o primeiro exon como facultativo (Figura 1). Atualmente, mais de 30 diferentes mutações, também chamadas de variantes ou polimorfismos, espalhadas ao longo do gene *CARD15*, foram identificadas em pacientes com DC. Entretanto, somente três polimorfismos comuns, que representam 82% do total das mutações do gene *CARD15* foram associados com um risco aumentado de desenvolvimento da DC (LESAGE *et al.*, 2002). São polimorfismos de base única (SNPs), designados SNP8, SNP12 e SNP13, que se mostram independentemente associados à DC, e correspondem aos números de acesso rs17860491, rs2066845, rs5743293 da base de dados SNP do “*National Center for Biotechnology Information*” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) (HUGOT *et al.*, 2001; DIEGO *et al.*, 2006). Dois destes SNPs levam à troca de um aminoácido, e são mutações de substituição: Arg702Trp ou R702W (SNP8), no exon 4, e Gly908Arg ou G908R (SNP12), no exon 8. O terceiro polimorfismo, Leu1007insC (SNP13), no exon 11, é uma mutação de inserção da citosina na posição 3020 (3020insC) da seqüência codificada do gene

*CARD15*, e introduz a um códon de parada prematuro levando a uma proteína truncada com deleção de 33 aminoácidos distais (HUGOT *et al.*, 2001; VAN DER LINDE *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2003).

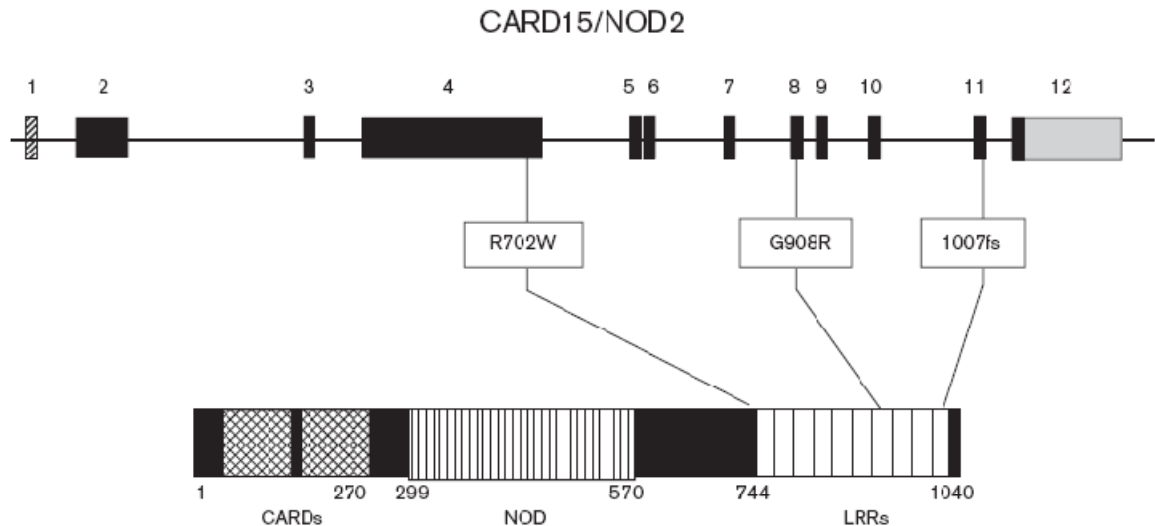


Figura 1. Representação esquemática do gene e da proteína *CARD15* (Adaptado de HUGOT *et al.*, 2003).

O gene *CARD15* codifica uma proteína intracelular de expressão principalmente citoplasmática com homologia à da superfamília Apaf-1/CARD4 de reguladores da apoptose, que se expressa predominantemente em monócitos. A semelhança com a proteína R encontrada em plantas resistentes a doenças, sugeriu que as moléculas NOD poderiam ter uma função na detecção de patógenos em mamíferos (VAN HEEL, McGOVERN e JEWELL, 2001).

A proteína *CARD15* contém 1040 aminoácidos e apresenta na sua estrutura dois domínios de recrutamento da caspase na porção N-terminal, um domínio central de ligação nucleotídica; e uma região rica em repetições de leucina na porção C-terminal (RRL) (*leucine rich repeat*, LRR) (Figura 1). As proteínas pertencentes à família NOD contêm estrutura semelhante, como o *CARD1* para *NOD1* e *IPAF* (fator de ativação da protease-*ice*). A região RRL parece prover uma estrutura versátil para propiciar a formação da interação proteína-proteína (MURILLO *et al.*, 2003; TAYLOR e FRANCIS, 2003 ).

Atualmente, o *CARD15/NOD2* é reconhecido como uma nova classe de receptores envolvidos na detecção de componentes bacterianos. São receptores localizados dentro do citoplasma e pertencem à família de ligação de nucleotídeos e de receptores semelhantes à NOD (*NOD-like*). Juntamente com a família dos

receptores Toll-like (TRL), que se localizam, preferencialmente, na superfície celular, são chamados de receptores de padrões moleculares associados a patógenos, derivado do inglês “*Pathogen Associated Molecular Patterns - PAMPs*” e, assim, passaram a ser denominados “receptores de reconhecimento de padrões” (*Pattern recognition receptors - PRRs*) (CARIO, 2005).

Os receptores NODs e os Toll-like constituem um sistema de interação entre a flora intra-luminal comensal e o sistema imune inato, e desempenham importante função na regulação da homeostasia do trato gastrointestinal. Os TLRs são moléculas transmembranares capazes de reconhecer lipopeptídeos (TLR1 e 6), ácido lipoteicóico (TLR2 e 6), DNA de vírus (TLR3, 7, e 8), lipopolissacarídeo (TLR4), flagelina (TLRS), DNA bacteriano (TLR9), e ainda outras moléculas. Os NODs são vistos como a parte preferencial no reconhecimento intracelular dos PRRs (MEINZER e HUGOT, 2005).

Inicialmente, o *CARD15* era considerado um receptor de lipopolissacárides, mas recentemente foi descoberto que a estrutura essencial que se liga ao receptor *CARD15* é o muramildipeptídeo (MDP), derivado da degradação de peptidoglicanos (<sup>a</sup>GIRARDIN *et al.*, 2003; ABREU, 2005). Os peptidoglicanos são constituintes da parede celular de bactérias gram-positivas e gram-negativas, e o MDP representa o motif bioativo mínimo comum destas bactérias. O *CARD1/NOD1* reconhece o ácido gama-D-glutamil-meso-diaminopimélico como ligante, que também é resultante da degradação de peptidoglicanos, porém é mais comumente encontrado em bactérias gram-negativas; e o IPAF reconhece a flagelina, um constituinte do flagelo de bactérias (CHAMAILLARD *et al.*, 2003; <sup>b</sup>GIRARDIN *et al.*, 2003; RESCIGNO e NIEUWENHUIS, 2007).

A proteína *CARD15* induz a apoptose e a ativação da via de sinalização do fator de transcrição nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B). O NF- $\kappa$ B desempenha função importante na manutenção da homeostasia da mucosa e também age como mediador nas respostas específicas a patógenos. É um importante fator de transcrição pró-inflamatório induzindo a expressão de mediadores como TNF ou IL-1 e outras citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, entre tantos outros mediadores inflamatórios (<sup>a</sup>BONEN *et al.*, 2003; MURILLO *et al.*, 2003; MURILLO, MORRÉ e PEÑA, 2003; VERMEIRE *et al.*, 2004; ROGLER, 2004; BAMIAS e COMINELLI, 2007).

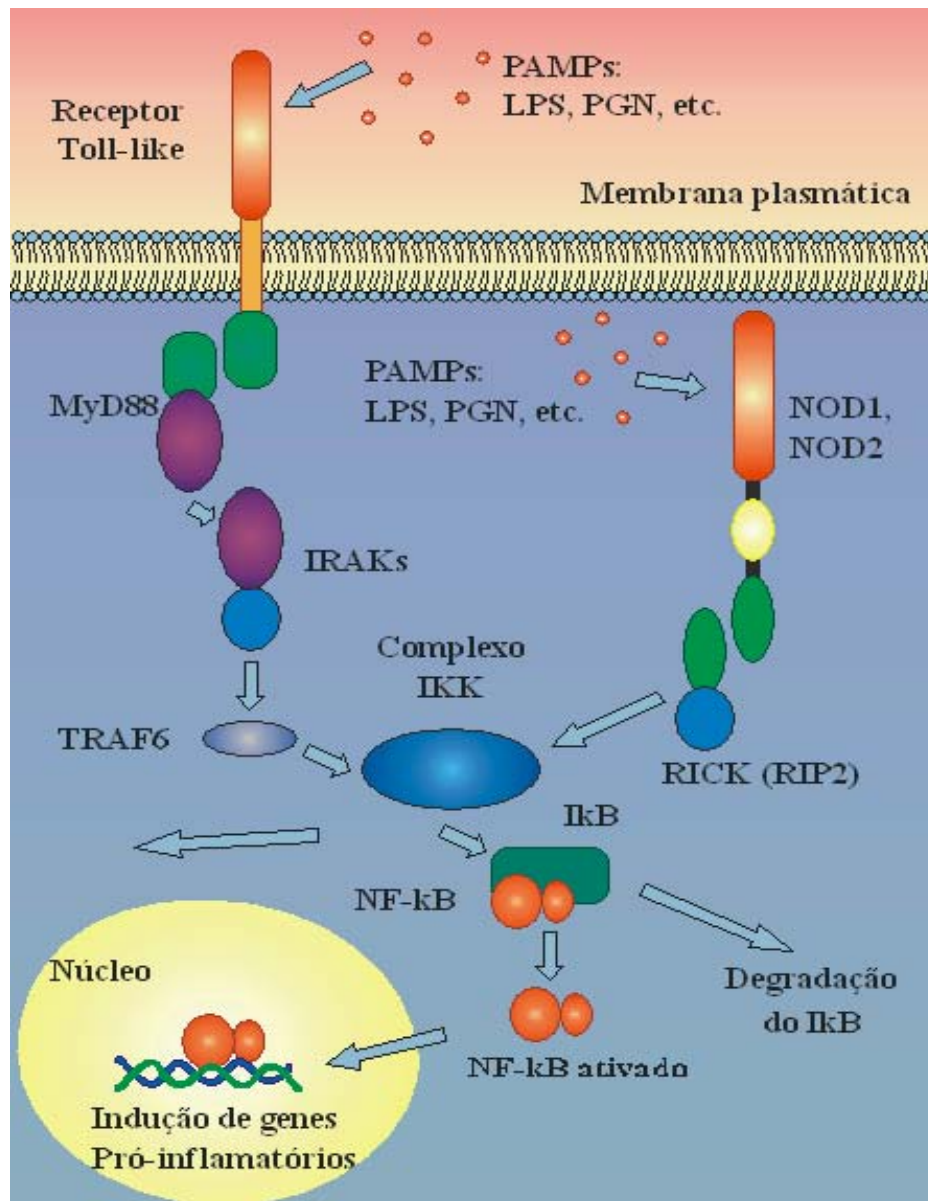


Figura 2. Ativação do fator NF- $\kappa$ B mediante via de sinalização dos receptores *toll-like* e CARD15, que reconhecem estruturas bacterianas. O receptor *toll-like* ativado recruta a proteína adaptadora MyD88, a qual está associada com a quinase associada ao receptor da IL-1 (IRAK). O IRAK é então fosforilado e se associa com uma proteína adaptadora, fator associado ao receptor 6 (TRAF6), o qual leva a fosforilação da quinase- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), e ocorre subsequente dissociação do NF- $\kappa$ B ativo e I $\kappa$ B. O CARD15 interage por meio do domínio CARD com o RICK levando à mesma via final de ativação da quinase I $\kappa$ B e do NF- $\kappa$ B, e conseqüentemente leva à indução de genes pró-inflamatórios (Adaptado de BONEN e CHO, 2004).

Em circunstâncias normais, o MDP é detectado na região RRL da proteína NOD2, induzindo a via de sinalização para a ativação do fator NF- $\kappa$ B. É aceito que o NOD2 interage por meio do domínio CARD com a proteína serina treonina quinase (RIP2) (*receptor-interacting protein 2*, também conhecido como RICK) levando à ativação da quinase I $\kappa$ B e do NF- $\kappa$ B, e conseqüentemente à indução de genes codificadores de citocinas pró-inflamatórias (Figura 2) (BONEN e CHO, 2004; MEINZER e HUGOT, 2005; ECKMANN e KARIN, 2005; RESCIGNO e NIEUWENHUIS, 2007).

## 2.2 Polimorfismos do Gene *CARD15* e Doença de Crohn

Os polimorfismos Arg702Trp (R702W), Gly908Arg (G908R) e Leu1007insC (3020insC) do gene *CARD15* podem ser encontrados em até 1/3 dos pacientes com DC. Indivíduos portadores de um destes polimorfismos têm um risco aumentado de 2 a 4 vezes para o desenvolvimento da DC, enquanto que portadores homocigotos ou heterocigotos compostos aumentam a possibilidade de expressão da doença em 20 a 40 vezes. O aumento na susceptibilidade da DC quando há polimorfismos de risco associados do gene *CARD15* mostra uma relação dose efeito desses. É importante observar que os polimorfismos do gene *CARD15* não estão associados com a retocolite ulcerativa (RCU) (LESAGE *et al.*, 2002; <sup>a</sup>GIRARDIN *et al.*, 2003; VERMEIRE *et al.*, 2004; BAMIAS e COMINELLI, 2007).

A primeira evidência de um defeito genético ligado ao reconhecimento bacteriano e a resposta imune inata na DC surgiu com a descoberta dos polimorfismos R702W, G908R e 3020insC do gene *CARD15*. Estes polimorfismos localizam-se dentro ou perto da região RRL, e se mostraram deficientes no reconhecimento da MDP. Alguns estudos funcionais experimentais *in vitro* descrevem perda de função com os polimorfismos R702W, G908R e 3020insC, comparado com a forma selvagem dos alelos do *CARD15* (OGURA *et al.*, 2001; INOHARA *et al.*, 2001; ABREU *et al.*, 2002; <sup>b</sup>BONEN *et al.*, 2003). A falta de ligação do MDP com o *CARD15* prejudica a ativação do NF- $\kappa$ B, afetando a sua habilidade de interagir com proteínas bacterianas levando à alteração da tolerância do sistema imune da mucosa a bactérias intra-luminais (INOHARA *et al.*, 2005).



Evidências indicam que a interação entre *CARD15* e TLR pode representar um mecanismo modulatório importante da resposta imune de pacientes com DC. O *CARD15* é um modulador de sinais transmitidos por meio do TR2, TLR4 e TLR3, mas não por meio do TLR5, TLR9 ou TLR7. Estudo recente demonstrou que o gene *CARD15* modula a via de ativação do TLR2, após estímulo microbiano com PGN, levando a um efeito sinérgico na produção de citocinas pró- e anti-inflamatórias (WATANABE *et al.*, 2004). No entanto, em pacientes portadores de polimorfismos, após o estímulo com PGN foi observado uma produção deficiente da IL-10, a qual pode levar a uma supressão inflamatória devido a uma resposta Th1 diminuída como evidenciada pela baixa produção de IL-12 (JONG *et al.*, 2006).

Entretanto, este novo conceito de perda de função na patogênese da DC, com reduzida transcrição de genes relacionados ao sistema imune, difere do antigo paradigma de uma excessiva produção de citocinas Th1 como causa predominante da inflamação na DC. Assim, a hiporesponsividade e não a hiper-responsividade a antígenos bacterianos poderia ser o problema etiológico relevante, pelo menos em um subgrupo de pacientes com DC (<sup>b</sup>GIRARDIN *et al.*, 2003; ROGLER, 2004; CARIO, 2005; ECKMANN e KARIN, 2005; CHAMBERLIN e NASER, 2006; BOEDEKER, 2007; RESCIGNO e NIEUWENHUIS, 2007).

A distribuição e o nível de expressão da proteína *CARD15* pode trazer alterações nas funções nas várias células sentinelas do reconhecimento bacteriano na mucosa intestinal, como as células dendríticas, as células de Paneth e as células epiteliais. Uma falha de sinalização do *CARD15* na célula dendrítica pode ser importante alvo para resposta imune defeituosa. Estudo recente demonstrou a supressão da secreção da IL-10 em células dendríticas da mucosa de pacientes com DC portadores de polimorfismos do *CARD15* após estimulação com MDP. Isto poderia levar à perda de elementos regulatórios, com falha para conter a resposta inflamatória, e manifestações pró-inflamatórias descontroladas (KRAMER *et al.*, 2006).

Defeitos na expressão do *CARD15* nas células de Paneth estão implicados na patogênese da DC (LALA *et al.*, 2003; RESCIGNO e NIEUWENHUIS, 2007). As células de Paneth são provavelmente a maior fonte celular de *CARD15* e são predominantemente expressadas no íleo terminal. Estão localizadas nas criptas epiteliais do intestino delgado e apresentam importante função protetora contra

bactérias intraluminais por meio da secreção de substâncias antibacterianas, como as  $\alpha$ -defensinas e as criptidinas (KOBAYASHI *et al.*, 2005; SCHREIBER, 2006; BOEDEKER, 2007). As  $\alpha$ -defensinas, HD-5 e HD-6, exercem um papel de peptídeos antibióticos naturais e representam importante mecanismo na defesa inata por exterminar eficientemente bactérias fagocitadas, ajudando a prevenir bactérias patogênicas de atravessarem a barreira da mucosa intestinal. Estudos demonstram que a expressão ileal das  $\alpha$ -defensinas está diminuída em pacientes com DC, no entanto, o déficit é significativamente maior em pacientes portadores de polimorfismos do *CARD15*, o que pode explicar em parte, o predomínio do fenótipo ileal da DC (WEHKAMP *et al.*, 2004; CARIO, 2005).

À semelhança do mecanismo das células de Paneth, uma perda de função em macrófagos derivados de monócitos foi observada em pacientes com polimorfismos do *CARD15*. Demonstrou-se diminuição da produção da IL-8 após estimulação do *CARD15* mutante com MDP. Isto poderia levar à diminuição e atraso no recrutamento de neutrófilos, e subsequente falha na depuração de bactérias, propiciando a inflamação crônica (VAN LIEROP *et al.*, 2006).

Foi atribuída uma função antimicrobiana direta do *CARD15* sobre as células epiteliais da mucosa intestinal. O *CARD15* age como um fator antibacteriano nas células epiteliais, e defeitos na sinalização do *CARD15* nestas células podem propiciar um aumento na colonização e na penetrância de bactérias e seus produtos pela camada epitelial (SCHREIBER, 2006; RESCIGNO e NIEUWENHUIS, 2007). Isto favorece um constante estímulo para início e perpetuação da inflamação. Demonstrou-se que a depuração da bactéria *Salmonella typhimurium* é fortemente acelerada nas células epiteliais com expressão da proteína *CARD15* funcional, enquanto que, as células epiteliais com expressão do polimorfismo 3020insC são virtualmente incapazes de depurar o patógeno *in vitro* (CARIO *et al.*, 2005).

### 2.3 Polimorfismos do Gene *CARD15* e Risco da DC em Diferentes Grupos Étnicos

Diversos estudos têm documentado a contribuição dos polimorfismos do gene *CARD15* na susceptibilidade da DC em várias populações caucasianas da Europa (HAMPE *et al.*, 2001; CUTHBERT *et al.*, 2002; AHMAD *et al.*, 2002; VAVASSORI *et al.*, 2002; LESAGE *et al.*, 2002; SUN *et al.*, 2003; MENDOZA *et al.*,

2003; VAN DER LINDE *et al.*, 2003; ESTERS *et al.*, 2004; NUÑEZ *et al.*, 2004; ANNESE *et al.*, 2004; BUNING *et al.*, 2005; GAZOULI *et al.*, 2005; DIEGO *et al.*, 2006). No entanto, estudos mostram que os polimorfismos do gene *CARD15* apresentam importantes diferenças entre populações como mostrado na tabela 1. Os polimorfismos comuns do gene *CARD15* associados à suscetibilidade para DC não foram encontrados em associação com a DC em asiáticos (INOUE *et al.*, 2002; CROUCHER *et al.*, 2003; GUO *et al.*, 2004). Recentemente, um estudo multicêntrico na América do Norte mostrou que a frequência de polimorfismos do gene *CARD15* entre crianças afro-americanas e hispânicas são menores quando comparadas com crianças caucasóides (KUGATHASAN *et al.*, 2005). Associações importantes entre *CARD15* e DC são descritas também em populações da Austrália, Canadá e Estados Unidos (CAVANAUGH *et al.*, 2003; VERMEIRE *et al.*, 2002; ABREU *et al.*, 2002). No Brasil e em outros países da América do Sul não foram descritos estudos de susceptibilidade à DC associados a polimorfismos do gene *CARD15*.

TABELA 1. FREQUÊNCIA DO ALELO RARO DOS POLIMORFISMOS R702W, G908R E 3020insC DO GENE *CARD15* EM DIFERENTES POPULAÇÕES.

Países (Referência)	N	Frequência alélica (%)		
		702W	908R	3020insC
<b>Europa</b> (HUGOT <i>et al.</i> , 2001)				
Pacientes	ND	11	6	12
Controles	ND	4	1	2
<b>Alemanha/Reino Unido</b> (HAMPE <i>et al.</i> , 2001)				
Pacientes	335	ND	ND	11
Controles	272	ND	ND	2
<b>Países da Europa Ocidental</b> (LESAGE <i>et al.</i> , 2002)				
Pacientes	453	11	6	11
Controles	103	4	1	2
<b>Canadá (Quebec)</b> (VERMEIRE <i>et al.</i> , 2002)				
Pacientes	231	12,9	5,2	10,3
Controles	71	4,2	0,7	0,7
<b>Reino Unido</b> (AHMAD <i>et al.</i> , 2002)				
Pacientes	244	12,5	3,3	9,4
Controles	354	5,2	1,4	1,6
<b>Reino Unido, Alemanha, Holanda</b> (CUTHBERT <i>et al.</i> , 2002)				
Pacientes	429	9,1	3,4	6,6
Controles	290	3,5	0,6	2,1
<b>Itália</b> (VAVASSORI <i>et al.</i> , 2002)				
Pacientes	133	ND	ND	14,3
Controles	81	ND	ND	2,5
<b>EUA</b> (ABREU <i>et al.</i> , 2002)				
Pacientes	201	16,4	11,4	11,4
Controles	175	5,7	1,7	3,4

Países (Referência)	N	Frequência alélica (%)		
		702W	908R	3020insC
<b>Japão</b> (INOUE <i>et al.</i> , 2002)				
Pacientes	350	0	0	0
Controles	292	0	0	0
<b>Japão</b> (YAMAZAKI <i>et al.</i> , 2002)				
Pacientes	483	0	0	0
Controles	ND	ND	ND	ND
<b>Judeus/EUA</b> (ZHOU <i>et al.</i> , 2002)				
Pacientes	481	5,1	8,3	6,1
Controles	110	4,5	5,5	3,6
<b>Alemanha</b> (SUN <i>et al.</i> , 2003)				
Pacientes	55	14,0	5,0	26,0
Controles	0	ND	ND	ND
<b>EUA (Nova York)</b> (TOMER <i>et al.</i> , 2003)				
Pacientes	101	2,9	5,7	8,6
Controles	136	0,7	2,9	1,8
<b>EUA</b> (BONEN <i>et al.</i> , 2003)				
Pacientes (judeus/ não judeus)	172/303	2,6/ 10,7	8,7/ 4,3	7,3/ 8,4
Controles (judeus/ não judeus)	62/288	4,8/ 4,0	3,2/ 1,6	1,6/ 3,8
<b>Austrália</b> (CAVANAUGH <i>et al.</i> , 2003)				
Pacientes	267	11	2	7
Controles	409	5	1	1
<b>Finlândia</b> (HELIO <i>et al.</i> , 2003)				
Pacientes	271	3,3	0,6	4,8
Controles	300	1,8	0	1,7
<b>Espanha</b> (MENDOZA <i>et al.</i> , 2003)				
Pacientes	204	13,7	8,3	14,2
Controles	140	4,3	2,1	4,3
<b>Holanda</b> (VAN DER LINDE <i>et al.</i> , 2003)				
Pacientes	61	ND	ND	14
Controles	81	ND	ND	2
<b>Coréia</b> (CROUCHER <i>et al.</i> , 2003)				
Pacientes	126	0	0	0
Controles	116	0	0	0
<b>Alemanha</b> (BUNING <i>et al.</i> , 2004)				
Pacientes	180	7,2	4,2	12,2
Controles	97	3,6	2,1	2,1
<b>Bélgica</b> (ESTERS <i>et al.</i> , 2004)				
Pacientes	570	12,9	6	8,6
Controles	165	5,8	1,8	3
<b>EUA (Wisconsin)</b> (KUGATHASAN <i>et al.</i> , 2004)				
Pacientes	186	6,6	6	13,1
Controles	ND	ND	ND	ND
<b>Espanha</b> (NUÑEZ <i>et al.</i> , 2004)				
Pacientes	165	6,7	4,5	4,5
Controles	165	5,8	1	1
<b>Escócia/Irlanda</b> (ARNOTT <i>et al.</i> , 2004)				
Pacientes (escoceses/ irlandeses)	252/113	7,2/9,7	1,8/2,2	4,6/3,0
Controles (escoceses/ irlandeses)	245/59	5,3/5,0	0,3/0,9	2,1/0,9
<b>Canadá</b> (NEWMAN <i>et al.</i> , 2004)				
Pacientes (judeus/ não judeus)	131/355	4,9/10,3	7,3/3,7	8,4/4,9
Controles (judeus/ não judeus)	94/100	3,2/5,0	4,3/2,0	3,7/3,0
<b>EUA e Israel</b> (TUKEL <i>et al.</i> , 2004)				

Países (Referência)	N	Frequência alélica (%)		
		702W	908R	3020insC
Pacientes (judeus)	215	6,9	8,3	5,6
Controles (judeus)	246	2,8	4,3	3
<b>China</b> (GUO <i>et al.</i> , 2004)				
Pacientes	15	ND	ND	3,3
Controles	172	ND	ND	0,3
<b>Itália</b> (ANNESE <i>et al.</i> , 2005)				
Pacientes	316	8,7	7,3	9,3
Controles	205	4,1	2,7	0,7
<b>Hungria</b> (BUNING <i>et al.</i> , 2005)				
Pacientes	148	7,1	3	10,8
Controles	208	2,6	1,2	2,2
<b>Grécia</b> (GAZOULI <i>et al.</i> , 2005)				
Pacientes	120	10	14,2	17,9
Controles	100	1	3,5	6
<b>Suécia</b> (IDESTROM <i>et al.</i> , 2005)				
Pacientes	58	5,2	0	3,4
Controles	ND	ND	ND	ND
<b>Nova Zelândia</b> (GEARRY <i>et al.</i> , 2005)				
Pacientes	201	3,0	1,2	1,0
Controles	ND	ND	ND	ND
<b>Tunísia</b> (ZOUITEN-MEKKI <i>et al.</i> , 2005)				
Pacientes	130	4,9	1,9	1
Controles	90	2,7	0,5	0
<b>Espanha</b> (DIEGO <i>et al.</i> , 2006)				
Pacientes	183	7,6	3	4,6
Controles	172	3,4	1,1	2
<b>Turquia</b> (UYAR <i>et al.</i> , 2006)				
Pacientes	56	0,9	8	1,8
Controles	100	0,5	0	1
<b>Croácia</b> (CUKOVIC-CAVKA <i>et al.</i> , 2006)				
Pacientes	136	13,97	4,4	11,76
Controles	91	5,49	1,12	4,4

\* ND= dado não disponível

## 2.4 Associação Genótipo-Fenótipo para o Gene *CARD15*

Vários estudos de interação genótipo-fenótipo têm sido realizados para avaliar a possibilidade de impacto dos polimorfismos do gene *CARD15* nas diversas características clínicas da DC. Alguns autores relatam significativa associação entre os principais polimorfismos do gene *CARD15* com a idade de início precoce da doença, localização ileal, e forma estenosante da DC (MURILLO, MORRÉ e PEÑA, 2003; VERMEIRE *et al.*, 2002; CUTHBERT *et al.*, 2002; AHMAD *et al.*, 2002; RADLMAYR *et al.*, 2002; FOLWAACZNY *et al.*, 2002; LOUIS *et al.*, 2003; BUNING *et al.*, 2004; ANNESE *et al.*, 2005). Outros estudos mostram que os polimorfismos

do *CARD15* foram inversamente correlacionados com a forma colônica da doença (LALA *et al.*, 2003; AHMAD *et al.*, 2004).

A predileção para a localização ileal da DC pode ser também atribuída à diferença entre mecanismos de tolerância imune do íleo e do cólon; uma vez que o cólon é exposto a concentrações muito maiores de bactérias do que o íleo, e pode utilizar mecanismos imunes que não sejam dependentes da função intacta do *CARD15* (ACOSTA e PEÑA, 2007).

Não há dados disponíveis da influência dos polimorfismos do gene *CARD15* na resposta ao tratamento com aminossalicilatos, esteróides, antibióticos ou imunossupressores. Sugeriu-se que os polimorfismos do gene *CARD15* podem estar envolvidos na resposta ao Infiximabe®, devido à ativação alterada do NF- $\kappa$ B e subsequentemente produção do TNF- $\alpha$ , mas estudos atuais não mostraram relação entre polimorfismos do *CARD15* com este tratamento (ACOSTA e PEÑA, 2007).

O uso diagnóstico da genotipagem dos polimorfismos do gene *CARD15* ainda não é recomendado para teste de triagem na prática clínica, em virtude da baixa sensibilidade do teste. A ausência de polimorfismos em indivíduos saudáveis não exclui a possibilidade da DC, e a presença de polimorfismos não leva necessariamente ao desenvolvimento da DC (COLOMBEL, 2003; CARIO, 2004; VERMEIRE, 2004).

## 2.5 O Papel da Interleucina 23 na Inflamação Intestinal

Até recentemente era aceito que a inflamação crônica em pacientes com DC, como também em muitos modelos animais, fosse causada pela excessiva resposta CD4+ Th1 (linfócitos T *helper* 1) mediada predominantemente pela interleucina-12 (IL-12), interferon- $\gamma$  (IFN) e TNF. O recente sucesso na utilização de terapias anti-TNF e anti-IL-12 fortaleceu esta teoria. Resultados encorajadores foram relatados em ensaios clínicos com a administração de anticorpos monoclonais anti-IL-12p40 em pacientes com DC (HUE *et al.*, 2006).

No entanto, a descoberta que a subunidade p40 da IL-12 pode também combinar uma específica subunidade IL-23p19 para formar a citocina IL-23 suscitou uma reavaliação do papel da IL-12 e IL-23 em várias doenças inflamatórias (NEURATH, 2007).

A IL-23 foi descrita recentemente como sendo um novo membro da família da IL-12 que desempenha um papel crítico na indução da proliferação da memória das células Th1 (OPPMANN *et al.*, 2000). As IL-12 e IL-23 apresentam semelhanças estruturais e biológicas, sendo ambas produzidas por monócitos, macrófagos e células dendríticas ativadas, mas apresentam funções distintas. A IL-12 é uma citocina heterodimérica tipo I que compreende a subunidade IL-12p40 junto com a subunidade IL-12p35, e apresenta importante função na resposta Th1 clássica caracterizada pela produção do IFN- $\gamma$ . A IL-23 confere sustentação a uma população de células T que é caracterizada pela produção de citocinas relacionadas a IL-17, IL-17A e IL-17F, induzidas pela IL-6 e TGF- $\beta$ . Como resulta em uma proeminente produção de IL-17, estas células T foram denominadas de células Th17 (Figura 3) (MACKENZIE, KASTELEIN e CUA, 2006; WEAVER *et al.*, 2006; STEINMAN, 2007).

Estudos recentes em modelos animais evidenciaram o papel crítico da via Th17 no desenvolvimento da inflamação crônica na maioria dos casos de colite investigados. YEN *et al.* (2006) estudaram ratos com deficiência dupla de IL-10/IL-23p19 e IL-10/IL-12p35 e demonstraram que a IL-23, mas não a IL-12, é essencial para o desenvolvimento da inflamação intestinal em um modelo de indução espontânea de colite por deficiência da IL-10. A administração de IL-23 recombinante exacerbou a gravidade da colite induzida em ratos deficientes de RAG (gene ativador da recombinase), os quais são destituídos de células T e B maduras, e desenvolvem colite em 10-12 semanas após transferência de células T ( $CD4^+CD45RB^{high}$ ) ou células T de memória ( $CD4^+CD45RB^{low}$ ) de ratos deficientes de IL-10. A IL-23 induziu a ativação de uma população de células T de memória pró-inflamatória que é capaz de produzir IL-17 e IL-6, as quais mediarão o dano tissular.

Achados semelhantes foram descritos em outro modelo animal de colite dependente de células T induzida por *Helicobacter hepaticus*. Neste modelo, a IL-23 e IL-17 foram hiper-expressadas no cecum inflamado e o anticorpo bloqueador da IL-23p19 significativamente melhorou os parâmetros inflamatórios da colite, incluindo a diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF, IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6 e IL-17. A transferência de células  $CD4^+CD45RB^{high}$  adotivas em ratos deficientes de RAG com falta da expressão da subunidade p35 ( $p35^{RAG^{-}}$ )

resultou em grave colite, enquanto  $p19RAG^{-/-}$  ou  $p40RAG^{-/-}$  foram protegidos de colite. Estes resultados indicam que a IL-23, mas não a IL-12, é essencial para a indução da inflamação intestinal crônica mediada por mecanismos imunes inatos ou adaptativos (HUE *et al.*, 2006).

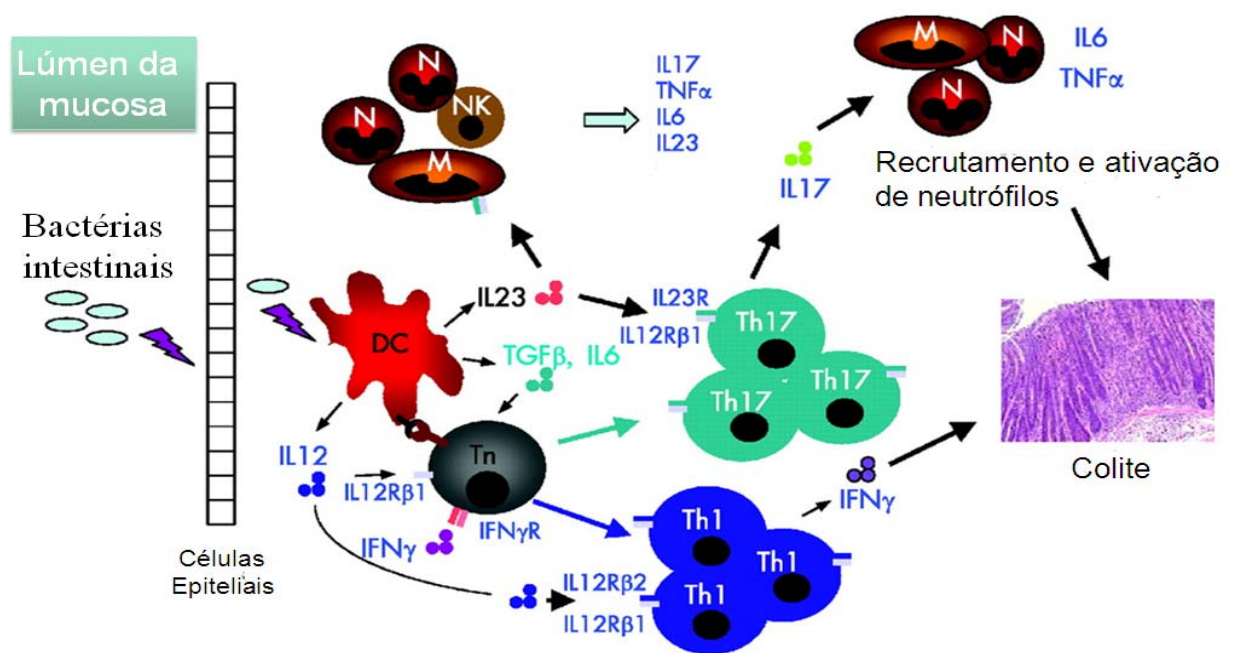


Figura 3. Múltiplas vias de sinalização da IL-23 na inflamação intestinal. A estimulação bacteriana induz a produção de citocinas pelas células epiteliais, células dendríticas (DCs) e macrófagos (M). O interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e a IL-12 agem nas células estimuladoras de antígenos  $CD4^+$  T (Tn) para induzir a diferenciação de células tipo T *helper* (Th1) secretoras de IFN $\gamma$ , enquanto o fator de crescimento transformador  $\beta$  (TGF $\beta$ ) e IL-6 promovem as células Th17 que produzem IL-17 e expressam o receptor da IL-23 (IL23R). A IL-23 produzida pela ativação das DCs sustenta a resposta Th17 e também ativa células inatas incluindo as células mielóides e células *natural killer* (NK) para produzir citocinas inflamatórias incluindo a IL-6, TNF $\alpha$  e IL-17 que induz inflamação intestinal. A IL-17 estimula a produção de citocinas pelos macrófagos ativados e pode induzir à produção de citocinas e quimiocinas pelas células endoteliais, levando ao recrutamento de neutrófilos (N) (Adaptado de McGOVERN e POWRIE, 2007).



Outros estudos em modelos animais documentaram que ratos deficientes de IL-17 (IL-23p19<sup>-/-</sup>) são resistentes à artrite colágeno-induzida (ACI), encefalomielite auto-imune experimental, e doença inflamatória intestinal. O tratamento com anticorpos antagonistas da IL-17 pode reverter a progressão da ACI, consistente com a noção da participação da IL-17 durante a fase efetora da resposta inflamatória (LANGRISH *et al.*, 2005). A expressão da IL-23 em ratos transgênicos resulta em inflamação sistêmica grave, incluindo o intestino delgado e o grosso, ressaltando o papel particular desta via na indução da ativação de células T efectoras e perpetuação de respostas inflamatórias órgão-específicas (WIEKOWSKI *et al.*, 2001).

Diferenças funcionais importantes entre o sistema imune do intestino delgado e do cólon em ratos normais foram demonstradas, revelando produção elevada da IL-23 na região do íleo distal. A concentração bacteriana elevada nesta região pode ativar a transcrição do gene p40 em células dendríticas da lâmina própria por meio do NF- $\kappa$ B. Estes dados sugerem uma predisposição do íleo terminal de desenvolver resposta inflamatória crônica por meio da IL-23 mostrando importante função desta citocina na homeostasia da flora intestinal. Isto pode prover mais uma explicação molecular para a manifestação clínica preferencial da DC nesta parte do intestino (BECKER *et al.*, 2003).

A expressão de ambas citocinas IL-23 e IL-17 está aumentada nas lesões inflamatórias de pacientes com DC. Esta observação aumenta a possibilidade de que os mecanismos imunológicos elucidados em ratos sejam igualmente importantes para humanos. Parece possível que o efeito benéfico dos anticorpos anti-p40 na DC sejam exercidos por meio da inibição da sinalização da IL-23 ao invés da IL-12. A demonstração que a produção da IL-17 e IL-6 está diminuída em pacientes que receberam anticorpos anti-p40 reforça esta hipótese (ABREU, 2005; BAMIAS e COMINELLI, 2007).

Recentes observações sugerem uma importante função da IL-23 na resposta imune precoce a patógenos pela indução direta de produção da IL-17. A IL-23 é produzida nas células dendríticas e macrófagos dentro de poucas horas após exposição a lipopolissacárides e outros produtos bacterianos. Isto desencadeia rápida resposta IL-17 de células T  $\alpha$ - $\beta$  e  $\gamma$ - $\delta$  residentes e linfócitos T NK. A IL-17 promove a produção de IL-1, IL-6, IL-8, CXCL1 e TNF no

estroma, nas células epiteliais e endoteliais, e também em um subgrupo de monócitos. Juntas, estas citocinas pró-inflamatórias rapidamente recrutam neutrófilos para o sítio da infecção. Desta forma, a resposta aguda a estímulos bacterianos recebidos em tecidos como do pulmão, pele e intestinos inclui a ativação imediata da via IL-23/IL-17, provendo rápida proteção contra a invasão microbiana (MACKENZIE, KASTELEIN e CUA, 2006; HUE *et al.*, 2006; McGOVERN *et al.*, 2007).

Dados evidentes mostram que a IL-23 inicia e perpetua ambas respostas inflamatórias inata e mediada por células T, mas parece ser claramente associada com a produção da IL-17 e IL-17A-F (McGOVERN *et al.*, 2007). A IL-17 é uma citocina importante durante a inflamação, e particularmente proeminente nas lesões crônicas (STEINMAN, 2007). Estudo de avaliação da expressão da IL-17 na mucosa intestinal e no soro de pacientes com doença inflamatória intestinal mostrou aumento da expressão da IL-17 nos pacientes com DC e RCU, comparado com pacientes com colite infecciosa, colite isquêmica e controles saudáveis (FUJINO *et al.*, 2003). A IL-17 foi encontrada em muitas doenças auto-imunes, incluindo esclerose múltipla, artrite reumatóide e psoríase (LANGRISH *et al.*, 2005).

Em 2002, foi descoberta uma nova subunidade do receptor da IL-23, o IL-23R. O complexo IL-23R compartilha uma subunidade com o receptor da IL-12, o IL-12R $\beta$ 1, mas não se liga à subunidade IL-12R $\beta$ 2. O complexo IL-23R e IL-12R $\beta$ 1 confere responsividade à IL-23 nas células que expressam ambas subunidades. A IL-23 ativa a mesma sinalização molecular Jak-Stat da IL-12: JAK 2, TyK 2, e Stat 1, -3, -4, e -5, mas a ativação Stat 4 é substancialmente mais fraca e diferentes complexos Stat de ligação com DNA se formam em resposta à IL-23 comparado com a IL-12 (PARHAM *et al.*, 2002).

## 2.6 Polimorfismos do Gene *IL23R*

Recentemente, foi descoberta a associação de polimorfismos do gene *IL-23R* com a DC em independentes coortes de pacientes com DC. O gene receptor da interleucina 23 (*IL-23R*) codifica uma subunidade do receptor da IL-23 tornando evidente o papel da IL-23 na regulação da imunidade intestinal. O gene *IL-23R* está localizado no cromossomo 1p31 e está contido dentro de dois blocos amplos de desequilíbrio de ligação. Os polimorfismos ou marcadores estão no bloco

centromérico, que contêm os exons 5-11 e parte da região intergenética entre o *IL-23R* e *IL12R $\beta$ 2*, aonde há a associação mais forte com sinalização (Figura 4) (DUERR *et al.*, 2006).

O importante estudo de DUERR *et al.* (2006) avaliou mais de 308.332 SNPs em análise sistêmica de genoma, em 547 indivíduos descendentes de europeus com a DC e 548 controles saudáveis. Três marcadores mostraram associação altamente significativa com DC, dois dos quais foram no gene *CARD15*. O terceiro marcador foi um polimorfismo raro encontrado no gene *IL-23R*, rs11209026 (c.1142G>A, p.Arg381Gln), que confere proteção contra a doença. Nove outros polimorfismos do gene *IL23-R* foram potencialmente relacionados com a DC: rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs1343151, rs10889677, rs11209032 e rs1495965.

Apesar das conseqüências funcionais dos polimorfismos do gene *IL-23R* ainda não serem conhecidos, há algumas possibilidades. Por exemplo, polimorfismos que levam à perda de função do *IL-23R* podem suprimir a ativação de células T efetoras indutoras da inflamação intestinal crônica. Alternativamente, a sinalização defeituosa do *IL-23R* pode afetar profundamente a resposta imune inata; uma vez que a IL-23 é expressa na superfície das células sentinelas como macrófagos e células dendríticas e, desse modo, atua na função imune para manter a homeostasia da barreira da mucosa intestinal. Consistente com esta hipótese, a IL-23 é requerida na inflamação intestinal via mecanismos imunes inatos em animais deficientes de células T. Este achado mostra claramente que a IL-23 pode causar inflamação intestinal na ausência de linfócitos T, o que salienta o proeminente papel da IL-23 no controle da função imune intestinal (NEURATH, 2007).

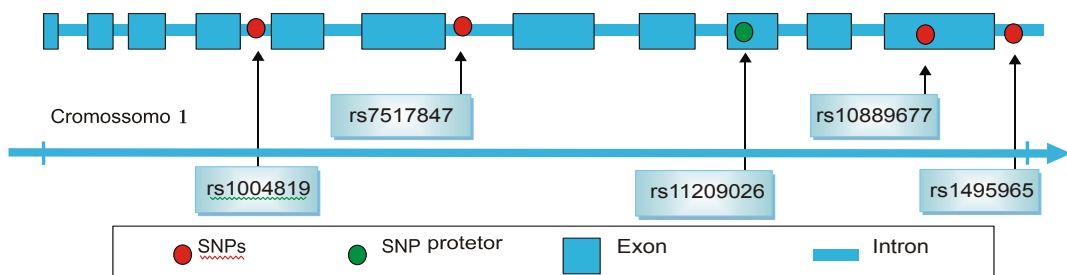


Figura 4. Representação esquemática do gene *IL23R* e localização dos polimorfismos associados à DC pesquisados no presente estudo (Adaptado de XAVIER e PODOLSKY, 2007).

TABELA 2. FREQUÊNCIA DO ALELO RARO DOS POLIMORFISMOS rs1004819, rs7517847, rs11209026, rs1495965 E rs10889677 DO GENE *IL23R* EM DIFERENTES POPULAÇÕES.

Países (Referência)	N	Frequência alélica (%)				
		rs1004819	rs7517847	rs11209026	rs1495965	rs10889677
<b>EUA</b>						
(DUERR <i>et al</i> , 2006)						
Pacientes (origem européia)	547	37,4%	33,1%	1,9%	49,8%	38,5%
Controles (origem européia)	548	28,0%	44,3%	7,0%	41,2%	28,8%
Pacientes (judeus)	401	42,6%	24,0%	3,3%	46,9%	41,9%
Controles (judeus)	433	33,4%	35,2%	7,0%	41,2%	31,6%
<b>Reino Unido</b>						
(TREMELLING <i>et al</i> , 2007)						
Pacientes	1902	38,3%	NA	2,5%	51,7%	39,8%
Controles	1345	30,7%	NA	6,2%	44,7%	31,5%
<b>Reino Unido</b>						
(CUMMINGS <i>et al</i> , 2007)						
Pacientes	604	37,2%	34,5%	2,6%	50,6%	NA
Controles	1134	29,8%	44,8%	5,9%	47,4%	NA
<b>Escócia</b>						
(VAN LIMBERGEN <i>et al</i> , 2007)						
Pacientes	233	NA	NA	3,0%	NA	NA
Controles	342	NA	NA	5,5%	NA	NA
<b>Alemanha</b>						
(GLAS <i>et al</i> , 2007)						
Pacientes	833	36,0%	35,0%	3,0%	49,7%	34,6%
Controles	1381	26,5%	44,8%	6,8%	42,5%	26,4%
<b>Japão</b>						
(YAMAZAKI <i>et al</i> , 2007)						
Pacientes	484	16,8%	15,7%	0	25,4%	6,8%
Controles	439	21,0%	19,9%	0	29,7%	10,5%

NA = não analisado

## 2.7 Perspectivas do Bloqueio da IL-23 para o Tratamento da Doença de Crohn

O melhor entendimento da imunopatologia da DC tem levado ao desenvolvimento de novos agentes biológicos direcionados a alvos específicos na cascata inflamatória, que leva à inflamação crônica e destruição tecidual. O fato da IL-23p19 regular uma resposta localizada da mucosa intestinal ao invés de respostas imunes sistêmicas, sugerindo o papel “mucosa-seletivo”, aponta a IL-23 como um atraente alvo terapêutico no tratamento da DC (HUE *et al.*, 2006). A descoberta que certas doenças auto-imunes podem ser mediadas amplamente por uma resposta L-23/IL-17 desregulada tem implicações importantes no desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de doenças auto-imunes (McKENZIE, KASTELEIN e CUA, 2006).

Estudos atuais sugerem que o bloqueio da via de sinalização da IL-23 pode ser um tratamento racional para DC. Ensaio clínico com o uso do anticorpo monoclonal contra a subunidade p40 deste receptor mostrou efeitos promissores. No entanto, acredita-se que o bloqueio da via IL-23p19//IL-23R possa ser particularmente eficaz em evitar a inflamação com menos efeitos sobre as respostas protetoras. Estudos adicionais são necessários para delinear o subgrupo de pacientes que irá se beneficiar com a supressão seletiva da sinalização da IL-23 (NEURATH *et al.*, 2007).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto de pesquisa desta tese foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Protocolo CEP/HC Nº 963.002/2005-01), cuja resolução também foi aceita pelo Medical College of Wisconsin (Anexo 1). O projeto foi financiado pela FUMBEP e pelo Medical College of Wisconsin.

#### 3.1 Desenho do Estudo

Foi realizado um estudo transversal, caso-controle, para análise da associação dos polimorfismos dos genes *CARD15/IL23R* como fatores de risco para DC, no qual os pacientes foram comparados com um grupo-controle. Foram investigados 130 pacientes do ambulatório de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, 20 pacientes do ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, e 37 pacientes de clínicas particulares de Gastroenterologia.

#### 3.2 População de Estudo

Cento e oitenta e sete pacientes adultos e pediátricos com DC foram recrutados no período de março/2005 a abril/2006, de dois hospitais universitários e clínicas especializadas em tratamento de pacientes com doença inflamatória intestinal. A população de estudo foi constituída por dois grupos:

O grupo-Crohn foi composto por crianças, adolescentes e adultos portadores de DC. A maioria dos pacientes foi entrevistada na ocasião da consulta de seguimento no ambulatório do HC, e/ou atendeu à solicitação de comparecimento ao hospital ou clínica de tratamento. Foram coletadas amostras de sangue na ocasião da entrevista. O critério de inclusão dos pacientes foi o diagnóstico firmado de DC estabelecido por meio de achados clínicos, radiológicos, endoscópicos, e histopatológicos, de acordo com os critérios da classificação de LENNARD-JONES, 1989 (Anexo 2). Pacientes com colite indeterminada foram excluídos da pesquisa.

O grupo-controle foi constituído por 255 pacientes do Laboratório de Análises Clínicas do HC da UFPR, que foram submetidos à entrevista por ocasião da realização de exames de rotina, como hemograma, lipidograma, exames pré-operatórios, quando lhes foi oferecida a opção de doarem uma amostra extra de sangue para pesquisa científica. Foram incluídos pacientes que não apresentavam sintomas gastrointestinais ou doença gastrointestinal prévia, e pareados com o grupo-Crohn quanto ao sexo, idade e grupo-étnico. Pacientes com doença infecciosa ou inflamatória foram excluídos da pesquisa, uma vez que estas doenças poderiam alterar as proteínas CARD15 e IL23R.

Todos os pacientes e controles receberam o Termo de Consentimento Informado Livre e Esclarecido, que foi assinado conjuntamente pelo paciente, pais ou responsável (quando o paciente era menor) e pesquisador.

### 3.3 Características Clínicas dos Pacientes em Estudo

Para avaliação das características fenotípicas dos pacientes foram realizados questionário e análise de prontuários, com registro dos seguintes dados: identificação (nome, idade, sexo, grupo-étnico), idade de início da doença, história familiar positiva, localização da doença (de acordo com a radiologia e endoscopia), comportamento da doença e história de cirurgia prévia (Apêndice 1). A idade de início da doença foi estratificada em 3 subgrupos:  $\leq 20$  anos,  $> 20 \leq 40$  anos e  $> 40$  anos. A história familiar foi definida como a existência de pelo menos um parente de primeiro ou segundo-grau com DC.

A localização da doença foi classificada em cinco subgrupos, de acordo com a extensão da doença, no período mais recente do acompanhamento do paciente: (1) ileal: envolvimento do íleo sem doença colônica, mas poderia incluir o envolvimento do trato gastrointestinal alto; (2) colônica: envolvimento limitado ao cólon ou reto; (3) ileocolônico: envolvimento do íleo e do cólon, mas poderia incluir o envolvimento do trato gastrointestinal alto; (4) doença confinada somente ao trato gastrointestinal alto; (5) envolvimento perianal: foi considerada doença perianal os achados clínicos de fístula perianal, abscesso perianal, mas não fissuras ou plicomas perianal. Este subgrupo foi considerado como uma categoria separada e poderia ocorrer com qualquer outro local da doença. O

comportamento da doença foi categorizado pela história clínica de fístulas, estenoses, ou comportamento inflamatório de acordo com a classificação de Viena (LOUIS *et al.*, 2001). Comportamento fistulizante foi definido como a presença de lesões fistulizantes intra-abdominal (fístulas entero-entéricas) ou lesões fistulizantes perianal (enterocutâneas). Quando estenoses significantes foram demonstradas por radiologia ou foram relatadas na história do paciente (como aquelas que requereram cirurgia), o comportamento foi classificado como estenosante (ou fibrostenosante). Pacientes com doença não estenosante ou não fistulizante foram classificados como tendo comportamento inflamatório.

### 3.4 Características Étnicas da População em Estudo

A população de estudo foi procedente dos estados do Paraná e São Paulo. Os indivíduos que participaram do estudo e negaram qualquer miscigenação racial até a quarta geração, foram classificados como subgrupo *brasileiro* e compreenderam 58,8% pacientes. Pacientes com ancestrais europeus compreenderam 38,0%, e foram classificados como subgrupo *euro-brasileiro*. Estes pacientes do subgrupo *euro-brasileiro*, referiram ancestrais procedentes da Itália, Alemanha, Polônia, Ucrânia e Portugal. Também participaram três pacientes com ancestrais asiáticos (Japão e China), dois afro-brasileiros e um ameríndio.

### 3.5 Extração de DNA em Amostras de Sangue Periférico

Foi realizada coleta de 5 ml de sangue venoso periférico em cada paciente para extração do DNA genômico dos leucócitos. O sangue foi coletado em tubo com EDTA e centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos e, a seguir, foi retirado o creme leucocitário (*buffy-coat*). O creme leucocitário foi transferido para um tubo tipo *ependorf*, identificado e armazenado a – 20°C. Somente após a finalização de toda a coleta foi realizada a extração do DNA, empregando metodologia com base em *salting-out* (MILLER *et al.*, 1998) e processamento no Laboratório de Imunogenética do HC da UFPR.



### 3.5.1 Procedimento Técnico do Método *Salting-out*

Em cada microtubo com o creme leucocitário foram adicionados 2 mL de RCLB (tampão de lise de células vermelhas) 1X (Invitrogen), homogeneizado vigorosamente no Vortex, e depois centrifugado a 1500 rpm por 8 minutos. Desprezou-se cuidadosamente o sobrenadante por inversão e repetiu-se a adição de mais 3 mL de RCLB 1X para a lise de eritrócitos, até a obtenção de um botão de leucócitos claro sem resquícios de eritrócitos. O botão de leucócitos foi ressuspendido em 3 mL de água ultra-pura e centrifugado a 1500 rpm por 8 minutos. A seguir desprezou-se o sobrenadante por inversão deixando 1 mL de água no tubo, e transferiu-se o botão de leucócitos para um tubo de microcentrifuga, e este foi centrifugado a 13.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi desprezado cuidadosamente. Agitou-se no Vórtex e adicionou-se: 80 µl de tampão da proteinase K 5X, 40 µl de proteinase K (Biotechnology) (10mg/ml), 20 µl de SDS 20% e 240 µl de água ultra-pura, nesta ordem. Homogeneizou-se no Vórtex. As amostras foram incubadas no bloco de aquecimento a 65 °C por 20 minutos, agitadas no Vórtex, incubadas por mais 20 minutos, e então retiradas do bloco e deixadas a temperatura ambiente antes de prosseguir. Adicionou-se 100 µl de NaCl 6M, agitou-se no Vórtex por cerca de 20 segundos, e após centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, e foram acrescentados 700 µl a 1000 µl de etanol absoluto, sendo invertido gentilmente várias vezes até precipitar o DNA. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 2 minutos. Após desprezar o sobrenadante foi adicionado 1 mL de etanol 70%, e agitado no Vórtex até que o botão de DNA se desprendesse do fundo do tubo. Centrifugou-se a 13.000 rpm por 2 minutos, e desprezou-se o sobrenadante. Então, os tubos foram incubados no bloco a 65°C, com tampa aberta para secar o DNA (deixado no bloco até que o botão apresentasse um aspecto claro ou transparente). Foi ressuspendido o DNA com 50 µl de água ultra-pura, e colocado as amostras no bloco por 1 hora. As amostras de DNA foram armazenadas em freezer a – 20 °C.

Para verificação da concentração e a pureza das amostras de DNA extraídas, usou-se a espectrofotometria, na qual o DNA foi diluído em água

ultrapura e foi medida a absorvância em um espectrofotômetro de ultravioleta com comprimento de onda de 260 nm e 280 nm. Foram obtidas amostras com solução de concentração final acima de 100ng/μL. O grau de pureza do DNA, na razão 260/280 permaneceu entre 1,8 e 2,0.

### 3.5.2 Genotipagem do *CARD15* e do *IL23R*

As amostras de DNA extraídas foram encaminhadas para a análise genética no Centro de Genética Molecular Humana do *Medical College of Wisconsin*, em Milwaukee, USA. Todos os pacientes e controles foram genotipados para os três principais SNPs do gene *CARD15* (R702W, G908R e 3020insC), e para cinco SNPs do gene *IL23R* (rs1004819, rs7517847, rs11209026, rs1495965 e rs10889677). Em resumo, as amostras de DNA foram distribuídas em placas para PCR de 384-poços, e preparadas com o reagente para PCR Universal Taqman (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA), juntamente com a sonda apropriada para cada SNP (Probes – Taqman SNP Genotyping Assay, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As placas foram colocadas em aparelhos para PCR (termocicladores) por 2 horas, e subsequentemente foi medida a fluorescência, sendo que, todas as reações de genotipagem foram processadas com a tecnologia ABI's Taqman Assays-by-Design usando um sistema de detecção de seqüência automatizado ABI 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, CA, 94404, USA). As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores para os SNPs do gene *CARD15* e do gene *IL23R* não foram divulgadas pela empresa fornecedora ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)).

Os sítios polimórficos e região flanqueadora para os polimorfismos, bem como as características dos polimorfismos em estudo estão descritos nas tabelas 3 e 4.

**TABELA 3. SÍTIOS POLIMÓRFICOS E REGIÃO FLANQUEADORA PARA OS POLIMORFISMOS EM ESTUDO.**

Polimorfismos	Sequência
<b>CARD15</b>	
Arg702Trp	GAGAAGGCCCTGCTC[ <b>C/T</b> ]GGCGCCAGGCCTGTG
Gly908Arg	CTTTTCAGATTCTGG[ <b>G/C</b> ]GCAACAGAGTGGGTG
3020insC	CCCTCCTGCAGGCC[ <b>-/C</b> ]TTGAAAGGAATGACA
<b>IL23R</b>	
rs1004819	AGTCTTATGAGAAATGCAGATAGCA[ <b>C/T</b> ]AGTAAGAATCACAGCATAAAGCAGG
rs7517847	ACTCCTTTCACCTATTCCCAAGGCC[ <b>T/G</b> ]CAGCTACACCTGTATGTAGGCTAGA
rs11209026	ATTGGGATATTTAACAGATCATTCC[ <b>G/A</b> ]AACTGGGTAGGTTTTTGCAGAATTT
rs1495965	TTAATTTTAGCCATTCTTCTGCCT[ <b>A/G</b> ]ATTTCTTAAAATTAGAGAATTAAGG
rs10889677	GAAGCAAATGTTAATCCTCTGTGGA[ <b>C/A</b> ]GAAGAGAACATTTTCCAAAGCCTCA

**TABELA 4. CARACTERÍSTICAS DOS POLIMORFISMOS EM ESTUDO**

Gene	*nº de rs	Localização no gene	Base alterada	Alteração no aminoácido
<b>CARD15</b>	rs17860491	Exon 4	2104 C→T	Arg702Trp
	rs2066845	Exon 8	2722 G→C	Gly908Arg
	rs5743293	Exon 11	3020insC	Leu1007fs
<b>IL23R</b>	rs1004819	Intron 5	C→T	-
	rs7517847	Intron 6	T→G	-
	rs11209026	Exon 8	1142 G→A	Arg381Gln
	rs10889677	Exon-3'UTR	C→A	-
	rs1495965	intergênica	A→G	-

\* SNPs pelo NCBI

### 3.6 Análise Estatística

As frequências genóticas, alélicas e o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* foram calculados em pacientes e controles. As frequências genóticas e alélicas foram obtidas por contagem direta. Associações entre os genótipos e alelos foram analisadas pelo teste do Chi-quadrado ou teste exato de Fischer quando apropriado. A associação entre um dado genótipo e as características fenotípicas da DC foi estimada pela razão de chance (*Odds ratio* - OR) com um intervalo de confiança de 95% (IC). Para avaliar a influência dos polimorfismos dos genes *CARD15* e *IL23R* no curso da DC, pacientes foram classificados como portadores e não-portadores dos alelos variantes em ambos *loci* polimórficos. O teste Chi-quadrado ou teste exato de Fisher foi usado para comparação de portadores e não-portadores. Análise univariada foi realizada para avaliar se variantes dos genes *CARD15* ou *IL23R* foram correlacionadas com um fenótipo clínico particular. Um valor de probabilidade inferior a 0,05 ( $p < 0,05$ ) foi considerado significativo em todas as análises. Os softwares utilizados para a análise estatística foram: RxC, MILLER, 1999; Statistica for windows v.5.5, 2000; JMP Package (SAS) versão 6.0 (Cary, NC, USA).

## 4 RESULTADOS

Cento e oitenta e sete crianças, adolescentes e adultos portadores da DC foram incluídos no presente estudo. A mediana de idade no período do estudo foi de 33 anos (média de 33,94, variou de 8 a 72 anos), e a mediana da idade de início da doença foi de 23 anos (média de 23,97, variou de 1 a 60 anos).

A tabela 5 mostra para melhor observação à distribuição dos pacientes do grupo-Crohn de acordo com as características clínicas e étnicas estudadas.

TABELA 5. DISTRIBUIÇÃO DOS 187 PACIENTES DO GRUPO-CROHN DE ACORDO COM AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E ÉTNICAS.

Características	Total (%)
• Sexo	
Masculino	94 (50,3%)
Feminino	93 (49,7%)
• Idade de Início	
≤ 20 anos	80 (42,8%)
>20 ≤ 40 anos	91 (48,7%)
> 40 anos	16 (8,5%)
• História Familiar Positiva	25 (13,3%)
• Localização da Doença	
Íleo	72 (38,5%)
Cólon	44 (23,5%)
Íleo e Cólon	61 (32,6%)
Trato Gastrointestinal Alto (microscopia incluída)	2 (1,0%)
Envolvimento Perianal	76 (40,6%)
• Comportamento da Doença	
Inflamatório	54 (28,9%)
Estenosante	38 (20,3%)
Fistulizante	95 (50,8%)
• Necessidade de Cirurgia	67 (35,8%)
• Etnicidade	
Brasileiro	110 (58,9%)
Euro-brasileiro	71 (38,0%)
Asiático-brasileiro	3 (1,6%)
Afro-brasileiro	2 (1,0%)
Ameríndio	1 (0,5%)

## 4.1 Polimorfismos do Gene *CARD15*

No presente estudo, os alelos de risco dos polimorfismos R702W e 3020insC mostraram significância estatística para a susceptibilidade da DC ( $p < 0,0001$  e  $< 0,0042$ ), enquanto que, o G908R não mostrou associação significativa. Os três polimorfismos de risco do gene *CARD15* foram mais frequentes em indivíduos com DC do que nos controles ( $p < 0,0001$ ). As frequências alélicas de risco dos polimorfismos observadas nos pacientes com DC foram 9,63% para o R702W, 1,87% para o G908R, e 3,48% para o 3020insC. Enquanto que, para os controles, as frequências alélicas foram 2,75%, 1,57%, e 0,78%, para o R702W, G908R e 3020insC, respectivamente (Tabela 6). Um total de 27,3% dos pacientes com DC foram portadores de uma única cópia de alelo de risco do gene *CARD15*, e 2,6% foram portadores de dois alelos de risco, ou seja, heterozigotos compostos, mostrando frequência alélica de 1,33%. Pelo menos um polimorfismo de risco foi encontrado em 30,0% dos pacientes comparado com 10,0% dos controles ( $p < 0,0001$ , OR = 3,27, IC 95%, 2,01 – 5,33). Nenhum heterozigoto composto ou homozigoto foi encontrado no grupo-controle.

TABELA 6. COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA OS POLIMORFISMOS DO GENE *CARD15* NOS GRUPOS EM ESTUDO.

Polimorfismos	Genótipo	Pacientes DC N= 187	Controles N= 255	$p$	*FAR (%) DC	FAR (%) Controles	$p$	**OR (***IC 95%)
R702W	T/T	0	0	<0,001	9,63	2,75	<0,001	3,77 (2,00 - 7,10)
	C/T	36	14					
	C/C	151	241					
G908R	C/C	0	0	0,791	1,87	1,57	0,730	1,19 (0,43 - 3,33)
	G/C	7	8					
	G/G	180	247					
3020insC	C/C	0	0	0,004	3,48	0,78	0,004	4,56 (1,47 - 14,08)
	-/C	13	4					
	-/-	174	251					

\*FAR= frequência do alelo raro

\*\*OR mostrados são para os alelos raros

\*\*\*IC95%= intervalo de confiança de 95%

## 4.2 Polimorfismos do Gene *IL23R*

Cinco marcadores do gene *IL23R*, rs1004819, rs7517847, rs11209026, rs1495965, e rs10889677, independentemente associados foram investigados em 187 pacientes e 251 controles (Tabela 7). Quatro pacientes do grupo-controle foram excluídos da análise por não apresentarem genotipagem conclusiva para os polimorfismos em estudo.

As frequências alélicas do alelo raro para os marcadores rs1004819, rs7517847, rs11209026, rs1495965 e rs10889677 foram: 32,8%, 41,5%, 2,2%, 48,3% e 31,5% para os pacientes, e 25,1%, 42,6%, 5,8%, 42,7% e 25,0% para os controles, respectivamente. Associações com significância estatística foram encontradas com os marcadores rs1004819, rs11209026 e rs10889677. O polimorfismo Arg381Gln ou R381Q (rs11209026) mostrou a mais forte associação ( $p = 0,009$ , OR= 0,36, IC 95%, 0,16 a 0,81).

TABELA 7. COMPARAÇÕES ENTRE AS FREQUÊNCIAS GENOTÍPICAS E ALÉLICAS PARA OS POLIMORFISMOS DO GENE *IL23R* NOS GRUPOS EM ESTUDO.

Polimorfismos	Genótipo	Pacientes DC	Controles	$p$	*FAR (%)	FAR (%)	$p$	**OR
		N=187	N=251		DC	Controles		(***IC 95%)
rs1004819	T/T	24	13	0,014	32,8	25,1	0,013	1,46 (1,08 – 1,26)
	C/T	72	100					
	C/C	87	138					
rs7517847	G/G	28	43	0,785	41,5	42,6	0,753	0,96 (0,73 – 1,26)
	T/G	95	120					
	T/T	59	79					
rs11209026	A/A	1	1	0,005	2,2	5,8	0,009	0,36 (0,16 – 0,81)
	G/A	6	26					
	G/G	177	216					
rs1495965	G/G	41	38	0,132	48,3	42,7	0,104	1,25 (0,95 – 1,65)
	A/G	91	135					
	A/A	47	74					
rs10889677	A/A	22	17	0,105	31,5	25,0	0,036	1,38 (1,02 – 1,86)
	C/A	70	90					
	C/C	89	141					

\*FAR= frequência do alelo raro

\*\*OR mostrados são para os alelos raros

\*\*\*IC95%= intervalo de confiança de 95%

Um total de 13,5% pacientes com DC foi portador de dois ou três marcadores do *IL23R*, enquanto que, no grupo-controle, foi de 6,0% ( $p = 0,0079$ , OR = 2,42, IC 95%, 1,24 – 4,74). Quando foi analisada a frequência de marcadores combinados associados ao risco da DC, observou-se maior frequência de combinação para os marcadores rs1004819 e rs10889677 ( $p = 0,03$ , OR = 4,84, IC 95%, 0,99 – 23,57), comparados aos controles.

TABELA 8. FREQUÊNCIA DOS POLIMORFISMOS DO GENE *IL23R* NOS PACIENTES E CONTROLES.

Grupo-Crohn	Contagem	Probabilidade
rs1004819	4	0,02139
rs1004819 / rs1495965	2	0,01070
rs1004819 / rs1495965 / rs10889677	11	0,05882
rs1004819/rs10889677	7	0,03743
rs10889677	1	0,00535
rs1495965/rs10889677	3	0,01604
rs14995965	24	0,2834
rs7517847	26	0,13904
rs7517847/rs11209026	1	0,00535
rs7517847/rs1495965	1	0,00535
Alelo raro	107	0,57219
Total	187	1,00000
Grupo-controle		
rs1004819	3	0,01195
rs1004819 / rs1495965 / rs10889677	8	0,03187
rs1004819/rs10889677	2	0,00797
rs10889677	4	0,01594
rs1495965/rs10889677	2	0,00797
rs14995965	26	0,10359
rs7517847	40	0,15936
rs7517847/rs11209026	1	0,00398
rs7517847/rs1495965	1	0,00398
rs7517847/rs1495965/rs10889677	1	0,00398
Alelo raro	163	0,64940
Total	251	1,00000

#### 4.3 Aderências ao Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

A Tabela 9 mostra as probabilidades de aderência ao equilíbrio de *Hardy-Weinberg* para cada polimorfismo estudado do grupo-Crohn e controles. Com exceção do polimorfismo R381Q no grupo-Crohn, todos os polimorfismos aderiram ao equilíbrio ( $p > 0,05$ ). A não aderência do R381Q pode ser atribuída ao pequeno número amostral para este polimorfismo.



TABELA 9. ANÁLISE DO EQUILÍBRIO DE *HARDY-WEINBERG* PARA OS POLIMORFISMOS EM ESTUDO

Gene	Polimorfismos	Grupo-Crohn		Grupo-controle	
		* $\chi^2$	<i>p</i>	$\chi^2$	<i>p</i>
<i>CARD15</i>	R702W	2,121	0,143	0,203	0,652
	G908R	0,068	0,794	0,065	0,799
	3020insC	0,243	0,622	0,016	0,892
<i>IL23R</i>	rs1004819	2,108	0,147	0,392	0,345
	rs75177847	1,028	0,311	0,049	0,825
	R381Q	10,18	<b>0,002</b>	0,052	0,819
	rs1495965	0,057	0,811	3,372	0,067
	rs10889677	1,947	0,163	0,258	0,612

\* $\chi^2$ = teste do Chi-quadrado

#### 4.4 Associação Genótipo-Fenótipo para os Polimorfismos dos Genes *CARD15* e *IL23R*

A relação entre genótipos e fenótipos para os polimorfismos dos genes *CARD15* e *IL23R* em estudo não mostrou resultado significativo, quando analisada em portadores de pelo menos um polimorfismo do *CARD15* ou *IL23R* e não-portadores, ou quando cada polimorfismo de risco foi investigado (Tabelas 10 e 11).

No presente estudo, a idade de início não parece ter sido influenciada por nenhum dos polimorfismos do *CARD15*. Não houve diferença significativa nos pacientes dos subgrupos de idade de início precoce ( $\leq 20$ ), idade de início média ( $> 20 \leq 40$ ), e idade de início tardia ( $\geq 40$ ). Observou-se que três de cinco pacientes heterozigotos compostos apresentaram idade de início precoce da DC.

Com respeito à história familiar, localização da doença, comportamento da doença, e intervenções cirúrgicas, não houveram diferenças significantes. Observou-se que quatro de cinco pacientes heterozigotos compostos tiveram apresentação grave do comportamento da doença, com fístulas e estenoses.

TABELA 10. ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E OS GENÓTIPOS DE PACIENTES PORTADORES DOS POLIMORFISMOS DO GENE *CARD15* EM ESTUDO.

Características clínicas	Pelo menos um alelo de risco (%)	Pacientes com R702W (%)	Pacientes com 3020insC (%)	Pacientes com G908R (%)	Heterozigotos compostos (%)
Número	56/187 (30,0)	36/187 (19,2)	13/187 (7,0)	7/187 (3,7)	5/187 (2,7)
Sexo					
Masculino	29/94 (30,8)	21/94 (22,3)	4/94 (4,2)	2/94 (2,1)	3/94 (3,1)
Feminino	27/93 (29,0)	15/93 (16,1)	9/93 (9,7)	5/93 (5,3)	2/93 (2,1)
Idade de início da DC (média ± DP)	22,86 ± 10,40 (**p=0,48)	21,72 ± 9,53 (p=0,27)	24,00 ± 12,00 (p=0,65)	25,57 ± 12,38 (p=0,65)	21,40 ± 11,39 (p=0,58)
Idade de início da DC					
≤ 20	29/80 (36,2) (p=0,18)	20/80 (25) (p=0,23)	6/80 (7,5) (p=1)	3/80 (3,7) (p=1)	3/80 (3,7) (p=0,30)
>20 ≤ 40	25/91 (27,5) (p=0,51)	15/91 (16,5) (p=0,69)	6/91 (6,6) (p=1)	4/91 (4,4) (p=0,68)	2/91 (2,1) (p=0,61)
> 40	2/16 (12,5) (p=0,38)	1/16 (6,2) (p=0,68)	1/16 (6,2) (p=0,76)	0	0
História familiar positiva (%)	4/25 (16,0) (p=0,23)	3/25 (12,0) (p=0,57)	0	1/25 (4,0) (p=0,58)	0
Localização da doença (%)					
Íleo	24/72 (33,3) (p=1)	18/72 (25,0) (p=0,26)	5/72 (7,0) (p=0,18)	2/72 (2,8) (p=1)	0
Cólon	11/44 (25,0) (p=0,16)	6/44 (13,6) (0,31)	3/44 (6,8) (p=1)	2/44 (4,5) (p=1)	1/44 (2,3) (p=0,24)
Íleo e cólon	19/61 (31,1) (p=0,17)	12/61 (19,7) (p=0,64)	4/61 (6,5) (p=0,30)	3/61 (5,0) (p=0,63)	3/61(5,0) (p=0,24)
Trato *GI alto	1/2 (50,0) (p=0,47)	0	1/2 (50,0) (p=1)	0	1/2 (50,0) (0,43)
Envolvimento perianal	19/76 (25,0) (p=0,73)	13/76 (17,1) (p=0,32)	6/76 (7,9) (p=0,77)	4/76 (5,2) (0,68)	3/76 (3,9) (p=0,49)
Comportamento da doença (%)					
Inflamatória	13/54 (24,0) (p=0,36)	8/54 (14,8) (0,39)	3/54 (5,5) (0,75)	2/54 (3,7) (p=1)	1/54 (1,8) (p=0,45)
Estenosante	20/38 (52,6) (p=0,37)	12/38 (31,6) (p=0,53)	4/38 (10,5) (p=1)	4/38 (10,5) (p=0,36)	2/38 (5,2) (p=0,45)
Fistulizante	23/95 (24,2) (p=1)	16/95 (16,8) (p=0,84)	6/95 (6,3) (p=0,77)	1/95 (1,0) (p=0,40)	2/95 (2,1) (p=1)
Cirurgias (%)	24/67 (35,8) (p=0,39)	17/67 (25,3) (p=0,16)	4/67 (6,0) (p=0,77)	3/67 (4,5) (p=1)	3/67 (4,5) (p=0,59)

\*GI = gastrointestinal

\*\*valor de p

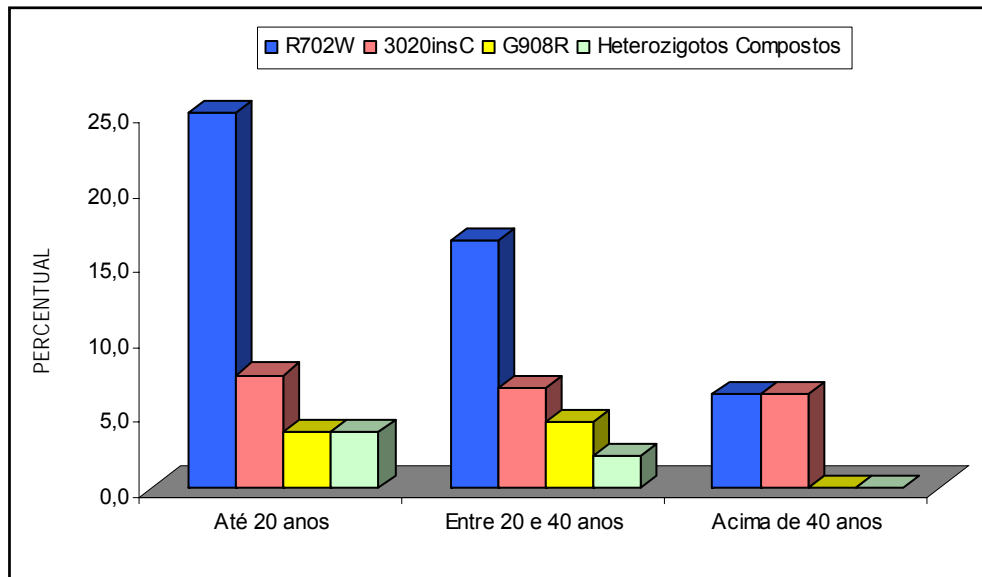


GRÁFICO 1. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO A IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA E GENÓTIPOS DO GENE *CARD15*.

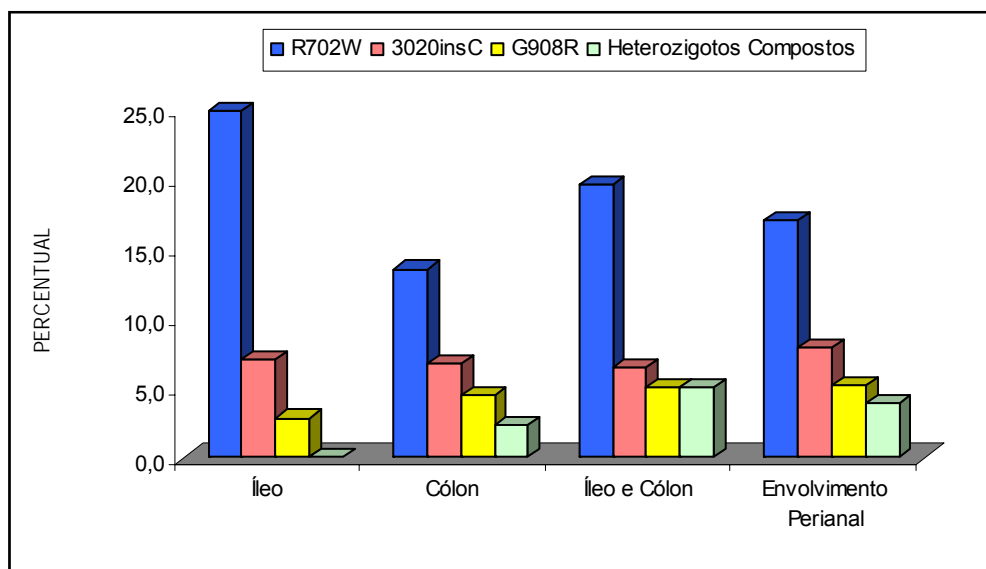


GRÁFICO 2. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO A LOCALIZAÇÃO DA DOENÇA E GENÓTIPOS DO GENE *CARD15*

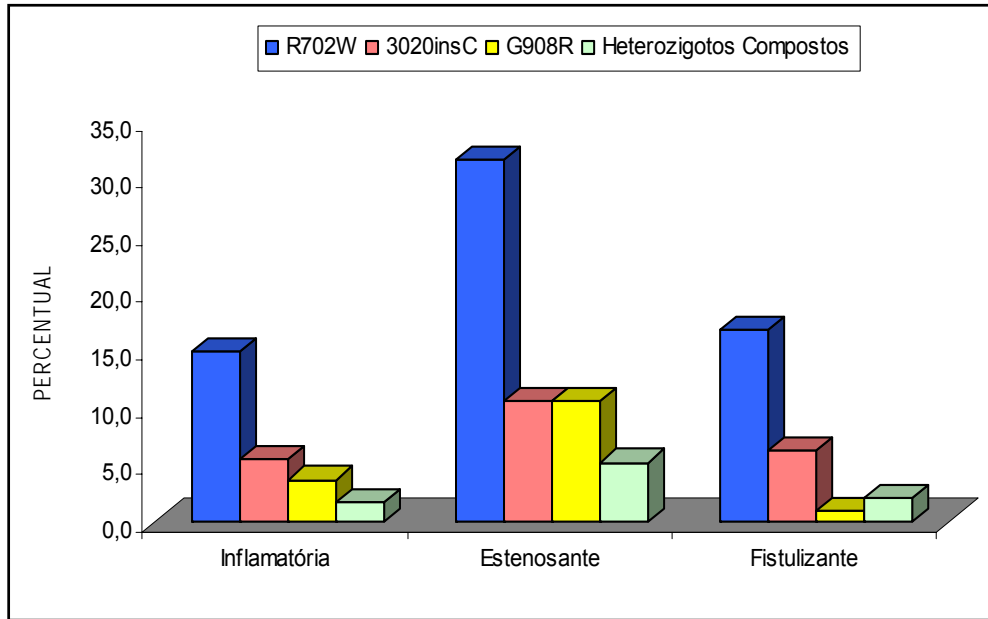


GRÁFICO 3. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO O COMPORTAMENTO DA DOENÇA E GENÓTIPOS DO GENE *CARD15*.

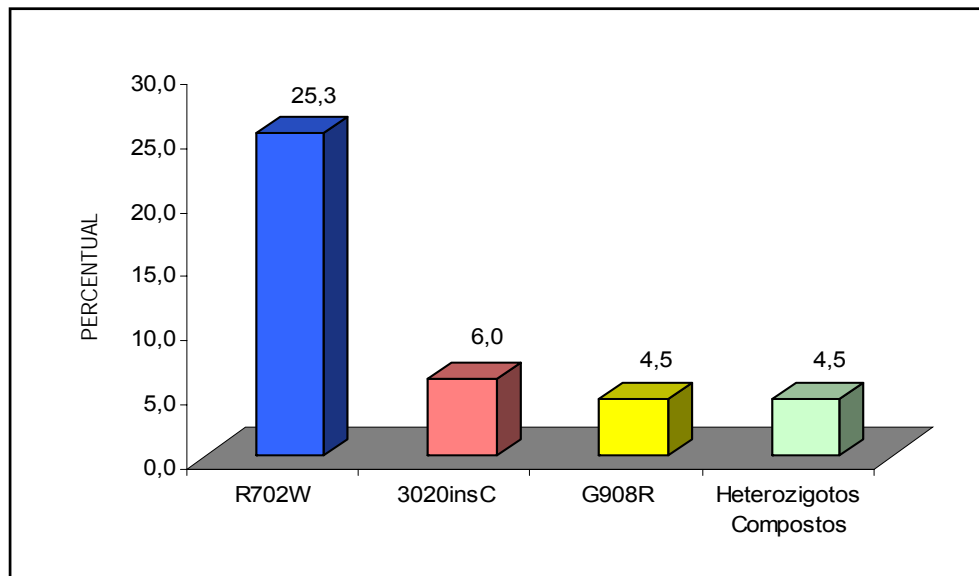


GRÁFICO 4. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM HISTÓRIA PRÉVIA DE CIRURGIA E GENÓTIPOS DO GENE *CARD15*.

ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E OS GENÓTIPOS DE PACIENTES PORTADORES DOS POLIMORFISMOS  
TABELA 11. DO GENE *IL23R* EM ESTUDO.

Características clínicas	Pelo menos um alelo de risco (%)	Pacientes com rs1004819 (%)	Pacientes com rs7517847 (%)	Pacientes com rs11209026 (%)	Pacientes com rs1495965 (%)	Pacientes com rs10889677 (%)
Número/Total	116/187 (62,0)	24/187 (12,8)	28/187 (15,0)	1/187 (0,5)	41/187 (22,0)	22/187 (11,7)
Sexo						
Masculino	42/94 (44,7)	15/94 (16,0)	17/94 (18,0)	0	20/94 (2,1)	11/94 (11,7)
Feminino	38/93 (40,8)	9/93 (9,7)	11/93 (11,8)	1/93 (1,07)	21/93 (22,5)	11/93 (11,8)
Idade de início da DC (anos)						
≤ 20	31/80 (38,7) (**p=0,37)	7/80 (8,75) (p=0,18)	11/80 (13,75) (p=0,83)	0	14/80 (17,5) (p=0,36)	9/80 (11,2) (p=0,58)
> 20 ≤ 40	39/91 (42,8) (p=1)	13/91 (14,3) (p=0,51)	14/91 (15,4) (p=0,83)	1/91 (1,1) (p=0,47)	22/91 (24,1) (p=1)	9/91 (9,9) (p=1)
> 40	10/16 (62,5) (p=0,53)	4/16 (25,0) (p=0,81)	3/16 (18,7) (p=0,52)	0	5/16 (31,2) (p=0,84)	4/16 (25,0) (p=0,29)
História familiar positiva (%)	12/25 (48,0) (p=0,66)	1/25 (4,1) (p=0,20)	3/25 (12,0) (p=0,77)	1/25 (4,0) (p=0,13)	7/25 (28,0) (p=0,42)	1/25 (4,0) (p=0,22)
Localização da doença (%)						
Íleo	31/72 (43,0) (p=1)	7/72 (9,72) (p=0,8)	13/72 (18,0) (p=0,23)	0	15/72 (20,8) (p=0,83)	6/72 (8,3) (p=1)
Cólon	25/44 (56,8) (p=0,13)	8/44 (18,1) (p=0,06)	9/44 (20,5) (p=0,31)	1/44 (2,3) (p=1)	13/44 (29,5) (p=1)	8/44 (18,1) (p=0,16)
Íleo + cólon	21/61 (34,4) (p=0,16)	8/61 (13,1) (p=0,80)	5/61 (8,1) (p=0,23)	0	12/61 (19,8) (p=0,67)	6/61 (9,8) (p=0,52)
Trato *GI alto	1/2 (50,0) (p=1)	0	1/2 (50,0) (p=1)	0	0	0
Envolvimento perianal	31/76 (40,7) (p=1)	7/76 (9,2) (p=0,65)	9/76 (11,8) (p=0,68)	1/76 (1,3) (p=0,39)	18/76 (23,7) (p=0,36)	8/76 (10,5) (p=1)
Comportamento da doença (%)						
Inflamatória	29/54 (53,7) (p=0,07)	7/54 (13,0) (p=1)	11/54 (20,3) (p=0,25)	0	13/54 (24,0) (p=0,55)	7/54 (13,0) (p=0,76)
Estenosante	23/38 (60,5) (p=0,87)	7/38 (18,4) (p=1)	8/38 (21,0) (p=1)	0	14/38 (36,8) (p=1)	6/38 (15,8) (p=1)
Fistulizante	28/95 (29,5) (p=0,17)	10/95 (10,5) (p=1)	9/95 (9,5) (p=0,40)	1/95 (1,05) (p=0,41)	14/95 (14,7) (p=0,47)	9/95 (9,5) (p=1)
Cirurgias (%)	28/67 (41,8) (p=0,87)	10/67 (15,0) (p=0,64)	8/67 (12,0) (p=0,52)	1/67 (1,5) (p=0,35)	17/67 (25,3) (p=0,71)	7/67 (10,4) (p=0,57)

\*GI= gastrointestinal

\*\*valor de p

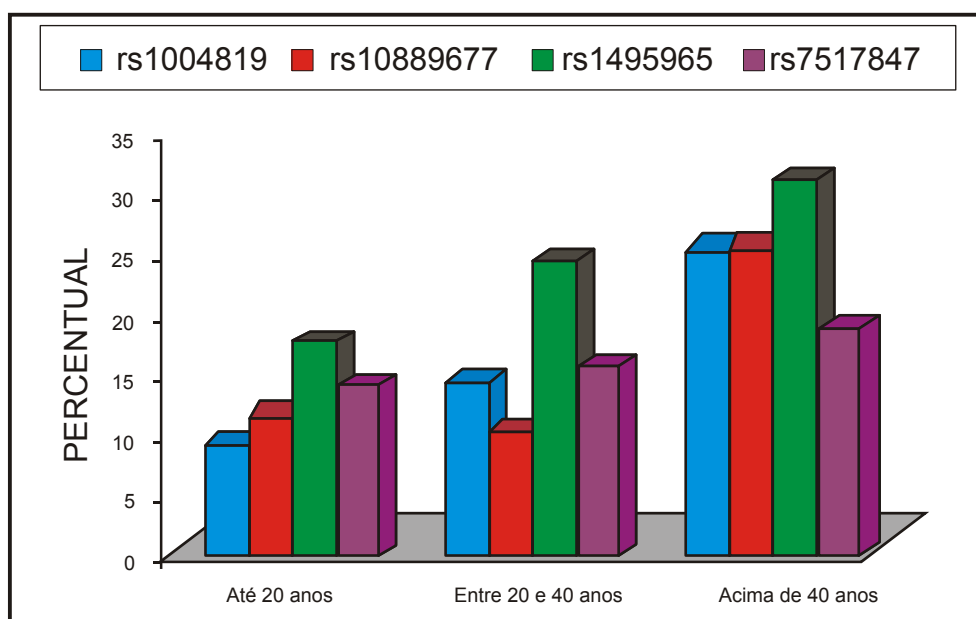


GRÁFICO 5. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO A IDADE DE INÍCIO DA DOENÇA E GENÓTIPOS DO GENE *IL23R*.

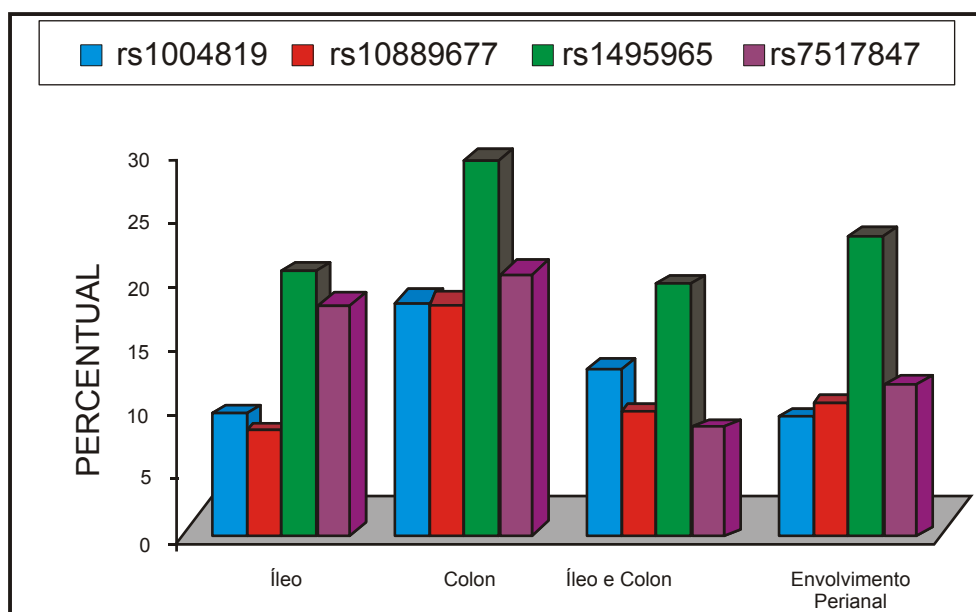


GRÁFICO 6. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO A LOCALIZAÇÃO DA DOENÇA E GENÓTIPOS DO GENE *IL23R*.

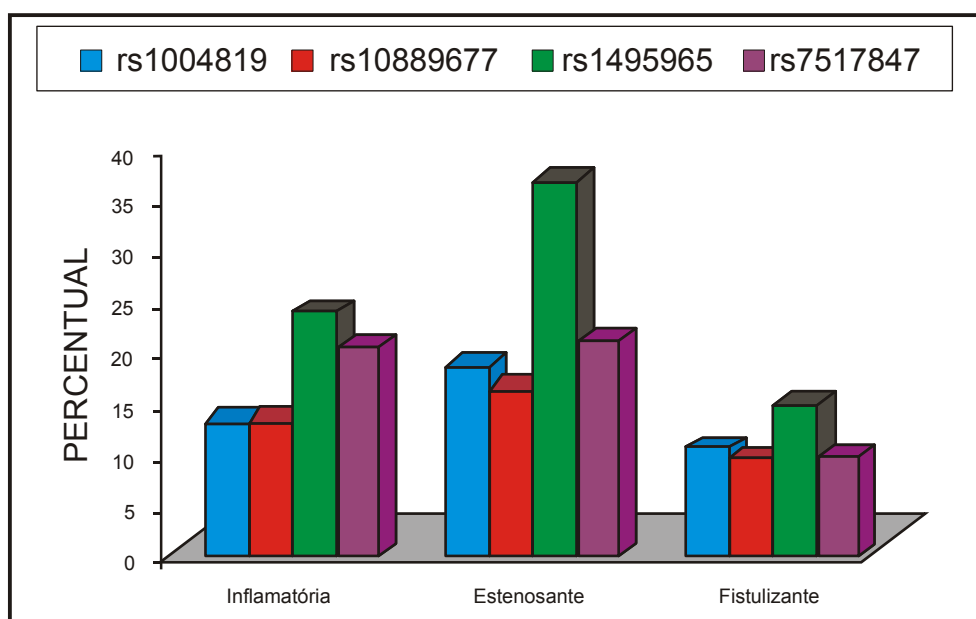


GRÁFICO 7. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES SEGUNDO O COMPORTAMENTO DA DOENÇA E GENÓTIPOS DO GENE *IL23R*.

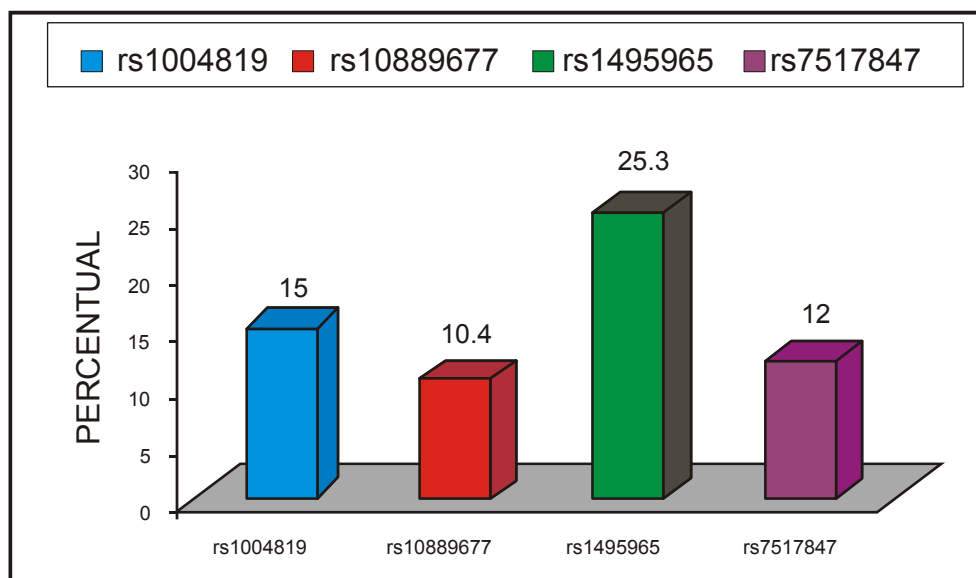


GRÁFICO 8. DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES COM HISTÓRIA PRÉVIA DE CIRURGIA E GENÓTIPOS DO GENE *IL23R*.

#### 4.5 Associação entre Características Étnicas e Genótipos dos Genes *CARD15* e *IL23R*

Quando a contribuição dos polimorfismos dos genes *CARD15* e *IL23R* foi investigada com respeito às características étnicas, não foi observada associação com significância estatística (Tabelas 12 e 13). No entanto, foi próxima à significância a relação entre o polimorfismo de risco 3020insC e o subgrupo de pacientes com etnia euro-brasileira ( $p = 0,056$ , OR = 2,96, IC 95%, 0,92 – 9,45), e também foi próxima à significância entre a relação do polimorfismo de risco R702W com o mesmo subgrupo étnico ( $p = 0,07$ , OR = 1,92, IC 95%, 0,89 – 4,14).

TABELA 12. ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS ÉTNICAS E OS GENÓTIPOS DE PACIENTES PORTADORES DOS POLIMORFISMOS DO GENE *CARD15* EM ESTUDO.

Características Étnicas	Pelo menos um alelo de risco (%)	Pacientes com R702W (%)	Pacientes com 3020insC (%)	Pacientes com G908R (%)	Heterozigotos compostos (%)
Número	56/187 (30,0)	36/187 (19,2)	13/187 (7,0)	7/187 (3,7)	5/187 (2,7)
Etnicidade (%)					
Brasileiro	24/110 (21,8)	16/110 (14,5)	4/110 (3,6)	4/110 (3,6)	1/110 (0,9)
Euro-brasileiro	31/71 (43,6)	19/71 (26,7)	8/71(11,2)	3/71(4,2)	4/71 (5,6)
Ameríndio-brasileiro	1/1 (100,0)	0	1/1 (100,0)	0	0
Asiático-brasileiro	0	0	0	0	0
Afro-brasileiro	0	0	0	0	0

TABELA 13. ASSOCIAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS ÉTNICAS E OS GENÓTIPOS DE PACIENTES PORTADORES DOS POLIMORFISMOS DO GENE *IL23R* EM ESTUDO.

Características Étnicas	Pelo menos um alelo de risco (%)	Pacientes com rs1004819 (%)	Pacientes com rs7517847(%)	Pacientes com rs11209026 (%)	Pacientes com rs1495965(%)	Pacientes com rs10889677(%)
Número	116/187 (62,0)	24/187 (12,8)	28/187 (15,0)	1/187 (0,5)	41/187 (22,0)	22/187 (11,7)
Etnicidade (%)						
Brasileiro	74/110 (67,2)	17/110 (15,4)	16/110 (14,5)	1/110 (0,9)	25/110 (22,7)	15/110 (13,6)
Euro-brasileiro	41/71 (57,7)	7/71 (9,8)	11/71 (15,5)	0	16/71 (22,5)	7/71 (9,8)
Ameríndio-brasileiro	1/1 (100,0)	0	1/1 (100,0)	0	0	0
Asiático-brasileiro	0	0	0	0	0	0
Afro-brasileiro	0	0	0	0	0	0



## 5 DISCUSSÃO

Desde a identificação de polimorfismos no gene *CARD15*, vários estudos foram descritos em diferentes grupos étnicos e raciais, principalmente em populações europeias, europeia norte-americana, europeia australiana e populações judaicas. A maioria destes estudos confirma a associação entre DC e os principais polimorfismos do gene *CARD15*: R702W, G908R e 3020insC (HUGOT *et al.*, 2001; HAMPE *et al.*, 2001; LESAGE *et al.*, 2002; VERMEIRE *et al.*, 2002; AHMAD *et al.*, 2002; CUTHBERT *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 2002; LINSKENS *et al.*, 2003; TOMER *et al.*, 2003; <sup>a</sup>BONEN *et al.*, 2003; CAVANAUGH *et al.*, 2003; HELIO *et al.*, 2003; MENDOZA *et al.*, 2003; VAN DER LINDE *et al.*, 2003; BUNING *et al.*, 2004; ESTERS *et al.*, 2004; KUGATHASAN *et al.*, 2004; NUÑEZ *et al.*, 2004; GIACHINO *et al.*, 2004; ARNOTT *et al.*, 2004; NEWMAN *et al.*, 2004; TUKEL *et al.*, 2004; ANNESE *et al.*, 2005; BUNING *et al.*, 2005; GAZOULI *et al.*, 2005; KARBAN *et al.*, 2003; DIEGO *et al.*, 2006; UYAR *et al.*, 2006).

A prevalência de pacientes com DC portadores de pelo menos um alelo de susceptibilidade do gene *CARD15* varia, em geral, de 27,0% a 51,67%, na maioria das populações caucasianas. O estudo multicêntrico de LESAGE *et al.* (2002), com a participação de vários países europeus, como Bélgica, Dinamarca, França, Alemanha, Irlanda, Itália, Espanha e Suécia mostrou uma frequência de portadores de 50,0%. Outros estudos europeus mostram frequências de portadores de 35,8%, no Reino Unido, Alemanha e Holanda (CUTHBERT *et al.*, 2002); 46,3%, na Bélgica (ESTERS *et al.*, 2004); 35,6%, na Alemanha (BUNING *et al.*, 2004); 51,67%, na Grécia (GAZOULI *et al.*, 2005); 38,2% na Itália (ANNESE *et al.*, 2005); 32,4%, na Hungria (BUNING *et al.*, 2005); e 27,0% a 32,8%, na Espanha (DIEGO *et al.*, 2006; MENDOZA *et al.*, 2003). Frequências alélicas muito baixas em relação ao esperado para populações europeias foram encontradas em países escandinavos, de 15,5% na Finlândia (HELIO *et al.*, 2003) e 8,6% na Suécia (IDESTRON *et al.*, 2005), sendo que a mais elevada foi descrita na Alemanha, de 65% (SUN *et al.*, 2003). Estudos na América do Norte mostram prevalências de 31,0% a 42,0% nos EUA (TOMER *et al.*, 2003; KUGATHASAN *et al.*, 2004), e 32,5% a 45,0% no Canadá (NEWMAN *et al.*, 2004; VERMEIRE *et al.*, 2002), enquanto que, de 36,7% na Austrália (CAVANAUGH *et al.*, 2003) e, 10,7% na Turquia.

Em indivíduos saudáveis também são encontrados os alelos de risco do gene *CARD15*, não obstante, os estudos caso-controles mostram que a prevalência de polimorfismos seja menor nos portadores saudáveis do que nos pacientes. As freqüências alélicas variam de 6,7% a 19,3% nos indivíduos portadores saudáveis em diversos grupos étnicos, enquanto que para os descendentes de judeus, a prevalência varia de 18,9% a 26,3% (ECONOMOU *et al.*, 2004).

Embora existam vários estudos de replicação dos polimorfismos do gene *CARD15* em diversos países, este é, todavia, o primeiro estudo para avaliação da contribuição do gene *CARD15* na susceptibilidade genética da DC em uma população brasileira. E a freqüência de portadores encontrada para pelo menos um polimorfismo de risco do gene *CARD15* foi de 30,0% em pacientes com DC, e 10,0% em controles saudáveis. Estas freqüências alélicas são comparáveis às freqüências descritas nas populações caucasianas em geral (CUTHBERT *et al.*, 2002; MENDOZA *et al.*, 2003; TOMER *et al.*, 2003; CAVANAUGH *et al.*, 2003; BUNING *et al.*, 2004; NEWMAN *et al.*, 2004; ANNESE *et al.*, 2005; BUNING *et al.*, 2005; DIEGO *et al.*, 2006).

Os polimorfismos do gene *CARD15* não foram igualmente envolvidos na susceptibilidade da DC no presente estudo. O alelo de susceptibilidade do polimorfismo R702W apresentou a freqüência alélica mais alta, de 9,63%, mostrando que este polimorfismo apresenta a maior contribuição ao risco da DC em nosso estudo, com uma estimativa de 3,77 vezes maior risco de desenvolvimento da DC em seus portadores. Enquanto que, para os controles saudáveis a freqüência alélica foi de 2,75% ( $p < 0,0001$ ) (Tabela 6).

Diferentes freqüências alélicas foram descritas para o alelo de susceptibilidade do polimorfismo R702W em diferentes grupos étnicos, e na maioria das populações européias mostrou ser o polimorfismo de maior risco para a DC. Os estudos populacionais mostram variação de freqüências alélicas do R702W de 3,3% a 16,4% (HUGOT *et al.*, 2001; LESAGE *et al.*, 2002; VERMEIRE *et al.*, 2002; AHMAD *et al.*, 2002; CUTHBERT *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 2002; TOMER *et al.*, 2003; <sup>a</sup>BONEN *et al.*, 2003; CAVANAUGH *et al.*, 2003; HELIO *et al.*, 2003; MENDOZA *et al.*, 2003; BUNING *et al.*, 2004; ESTERS *et al.*, 2004; KUGATHASAN *et al.*, 2004; NUÑEZ *et al.*, 2004; ARNOTT *et al.*, 2004; NEWMAN *et al.*, 2004; TUKEL *et al.*, 2004; ANNESE *et al.*, 2005; BUNING *et al.*, 2005; GAZOULI *et al.*, 2005; KARBAN *et al.*, 2004; DIEGO *et al.*, 2006; UYAR *et al.*, 2006).

Freqüências alélicas do R702W semelhantes ao nosso estudo foram descritas por DIEGO *et al.* (2006), ANNESE *et al.* (2005), CUTHBERT *et al.* (2002), ARNOTT *et al.* (2004), GAZOULI *et al.*, 2005, NEWMAN *et al.* (2003), <sup>a</sup>BONEN *et al.* (2003), LESAGE *et al.* (2002) e CAVANAUGH *et al.* (2003).

No estudo de DIEGO *et al.* (2006), na Espanha, foram avaliados 183 pacientes com DC, e 172 controles. A idade média de diagnóstico dos pacientes foi de  $33,5 \pm 13,3$  anos. Os pacientes com DC apresentaram freqüência alélica do R702W de 7,6% vs 3,4%, para os controles.

ANNESE *et al.* (2005), em estudo de coorte na Itália, analisaram 724 pacientes com doença inflamatória intestinal, destes 316 pacientes apresentavam DC com idade média  $39 \pm 14$  anos. Foram analisados também 588 parentes não acometidos, e 205 controles saudáveis (doadores de sangue). A freqüência alélica do R702W foi de 8,7% para pacientes com DC vs 4,1% para controles saudáveis.

CUTHBERT *et al.* (2002), em estudo multicêntrico no Reino Unido, Alemanha e Holanda, envolveram 429 pacientes com DC, 290 controles saudáveis, e 594 pacientes com RCU. O estudo mostrou freqüência alélica do R702W de 9,1% para os pacientes com DC, enquanto que de 3,5% para os controles normais e, 3,7%, para os de RCU.

Estudo em população irlandesa, por ARNOTT *et al.* (2004), avaliou 113 pacientes com DC e 59 controles. Foi encontrada freqüência alélica de 9,7% para o R702W nos pacientes, e de 5,1%, para os controles.

GAZOULI *et al.* (2005), na Grécia, estudaram 120 pacientes com DC, 85 com RCU e 100 indivíduos saudáveis. A presença de polimorfismos do gene *CARD15* foi significativamente maior em pacientes com DC do que nos pacientes com RCU ou controles, revelando freqüências alélicas para o alelo de risco do polimorfismo R702W de 10,0% para os pacientes com DC, de 7,1% para os de RCU, e 1,0% para os controles.

NEWMAN *et al.* (2004), no Canadá, avaliaram 131 pacientes judeus e 355 não-judeus, com os respectivos grupos controles de 94 judeus e 100 não-judeus. Os pacientes apresentaram idade média de diagnóstico de 20,7 anos (variou de 3 a 66 anos). O grupo judeu apresentou freqüência alélica do R702W de 4,9% vs 3,2% para os controles, enquanto que, para o grupo não-judeu foi de 10,3% vs 5,0% para os controles.

<sup>a</sup>BONEN *et al.* (2003), nos EUA, estudaram 475 pacientes com DC e 350 controles. Os pacientes e controles também foram estratificados em grupos étnicos de judeus e não-judeus (n= 172/303 e n= 62/288, respectivamente). A frequência alélica de risco do polimorfismo R702W foi de 10,7% para os não-judeus (controles de 4,0%) enquanto que, para judeus de 2,6% (controles de 4,8%).

O estudo de LESAGE *et al.* (2002), realizado com amplo consórcio europeu envolvendo clínicas da Bélgica, Dinamarca, França, Alemanha, Irlanda, Itália, Espanha e Suécia, recrutou 453 pacientes com DC, 159 com RCU e, 103 indivíduos controles normais. A idade média de inclusão foi 31,7 anos (variou de 6 a 85 anos) para o grupo de DC. A frequência alélica encontrada para pacientes de DC foi 10,8% para o R702W, enquanto que, de 4,4% para os controles normais e, 3,1% para os de RCU, respectivamente.

CAVANAUGH *et al.* (2003), na Austrália, estudaram 267 pacientes com DC, 35 com RCU e 409 indivíduos controles; com resultado da frequência alélica de risco do R702W de 11,2% para os pacientes com DC, 5,0% para os controles, e não foi encontrado alelo de risco nos pacientes com RCU.

O polimorfismo G908R também mostrou significativa contribuição como fator genético de risco da DC em populações caucasianas. Apresenta frequências alélicas

do alelo de susceptibilidade geralmente mais baixas quando comparado com o R702W, na maioria dos estudos europeus e norte-americanos, muito embora seja o polimorfismo mais relevante na susceptibilidade da DC na população judaica (ZHOU *et al.*, 2002; <sup>a</sup>BONEN *et al.*, 2003; FIDDER *et al.*, 2003; KARBAN *et al.*, 2003; TUKEL *et al.*, 2004; NEWMAN *et al.*, 2004).

A prevalência do G908R apresenta ampla variação e contrastes nos diversos grupos étnicos. Estudos de diferentes populações caucasianas mostram variações nas frequências alélicas para o alelo de susceptibilidade do G908R entre 0,6% e 14,2% (HUGOT *et al.*, 2001; LESAGE *et al.*, 2002; VERMEIRE *et al.*, 2002; AHMAD *et al.*, 2002; CUTHBERT *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 2002; TOMER *et al.*, 2003; <sup>a</sup>BONEN *et al.*, 2003; CAVANAUGH *et al.*, 2003; HELIO *et al.*, 2003; MENDOZA *et al.*, 2003; BUNING *et al.*, 2004; ESTERS *et al.*, 2004; KUGATHASAN *et al.*, 2004; NUÑEZ *et al.*, 2004; ARNOTT *et al.*, 2004; NEWMAN *et al.*, 2004; TUKEL *et al.*, 2004; ANNESE *et al.*, 2005; BUNING *et al.*, 2005; KARBAN *et al.*, 2003; DIEGO *et al.*, 2006; UYAR *et al.*, 2006).

No presente estudo a frequência alélica do alelo de risco do G908R foi de 1,87%, e representou a frequência mais baixa dos três alelos de risco do gene *CARD15* estudados (Tabela 6). Frequências alélicas baixas do G908R, comparáveis ao nosso estudo, foram descritas nos estudos de ARNOTT *et al.* (2004), CAVANAUGH *et al.* (2003), BUNING *et al.* (2004) e DIEGO *et al.* (2006).

ARNOTT *et al.* (2004), avaliaram populações distintas na Escócia e na Irlanda. O estudo caso-controle escocês foi composto por 246 pacientes com DC e 245 controles saudáveis, enquanto o irlandês por 113 pacientes com DC e 59 controles. A frequência alélica do alelo de risco do G908R obtida no grupo escocês foi de 1,8% (vs 0,2% para os controles), enquanto que, para o grupo irlandês foi de 2,2% (vs 0,9% para os controles).

O estudo de CAVANAUGH *et al.* (2003), na Austrália, também encontrou frequência do G908R semelhante a nossa, de 2,0%, enquanto que, 1,0% nos controles, e não foi observada a presença deste alelo nos pacientes com RCU.

BUNING *et al.* (2004), na Hungria, analisaram 148 pacientes com DC, 128 pacientes com RCU e 208 controles saudáveis. A frequência alélica do alelo de risco do G908R foi de 3,0% para os pacientes com DC, vs 1,6% para os de RCU e, vs 1,2% para os controles. A mesma frequência alélica do G908R, de 3,0% para pacientes e 1,1% para os controles, foi encontrada por DIEGO *et al.*, 2006, na Espanha.

O 3020insC é o polimorfismo de susceptibilidade da DC mais estudado do gene *CARD15*, sendo isoladamente investigado nos estudos de OGURA *et al.* (2001), HAMPE *et al.* (2001), VAVASSORI *et al.* (2002), VAN DER LINDE *et al.* (2003) e GUO *et al.* (2004). Diferentes prevalências do polimorfismo 3020insC foram encontradas nos diversos estudos populacionais, com frequências alélicas para o alelo de risco variando de 3% a 17,6% (HUGOT *et al.*, 2001; HAMPE *et al.*, 2001; LESAGE *et al.*, 2002; VERMEIRE *et al.*, 2002; AHMAD *et al.*, 2002; CUTHBERT *et al.*, 2002; ZHOU *et al.*, 2002; TOMER *et al.*, 2003; <sup>a</sup>BONEN *et al.*, 2003; CAVANAUGH *et al.*, 2003; HELIO *et al.*, 2003; MENDOZA *et al.*, 2003; VAN DER LINDE *et al.*, 2003; BUNING *et al.*, 2004; ESTERS *et al.*, 2004; KUGATHASAN *et al.*, 2004; NUÑEZ *et al.*, 2004; ARNOTT *et al.*, 2004; NEWMAN *et al.*, 2004; TUKEL *et al.*, 2004; ANNESE *et al.*, 2005; BUNING *et al.*, 2005; KARBAN *et al.*, 2004; DIEGO *et al.*, 2006; UYAR *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, a frequência alélica encontrada do 3020insC foi de 3,47% para os pacientes com DC, mostrando significância estatística ( $p < 0,0042$ ), contrastando com 0,78% para os controles. Embora a frequência alélica do 3020insC ser mais baixa comparada com a maioria das populações européias, os portadores do 3020insC apresentam uma estimativa de 4,56 vezes maior risco de desenvolvimento da DC (Tabela 6).

Frequências comparáveis do polimorfismo 3020insC foram descritas nos estudos de HELIO *et al.* (2003), NUNEZ *et al.* (2004), ARNOTT *et al.* (2004), NEWMAN *et al.* (2004) e DIEGO *et al.* (2006).

O estudo de HELIO *et al.* (2003), na Finlândia, estudou 271 pacientes com DC, 99 pacientes com RCU e 300 controles. A idade dos pacientes ao diagnóstico variou de 7 a 69 anos. Observou-se frequência alélica do 3020insC de 4,8%, enquanto que, de 3,0% para os pacientes com RCU, e 1,7% para os controles.

Na Espanha, NUNEZ *et al.* (2004), avaliaram 165 pacientes com DC na região da Galácia, e igual número de controles saudáveis. A idade dos pacientes variou de 17 a 76 anos, a idade média foi de  $36,3 \pm 1,0$  anos. O resultado da frequência alélica do polimorfismo 3020insC encontrado foi de 4,5% para os pacientes com DC vs 1,0% para os controles. O estudo de DIEGO *et al.* (2006), também da Espanha, revelou frequência alélica do 3020insC semelhante, de 4,6%, comparado com 2,0% dos controles.

O estudo de ARNOTT *et al.* (2004), na Escócia e na Irlanda, também mostrou baixa frequência alélica do polimorfismo 3020insC. O resultado da frequência alélica do 3020insC para a população escocesa foi de 4,6% para os pacientes com DC e 1,4% para os controles, enquanto que, para a população irlandesa foi de 3,0% e 0,9%, respectivamente.

No estudo canadense por NEWMAN *et al.* (2004) foi obtida frequência alélica do 3020insC para o grupo não-judeu de 4,9% vs 3,0% para os controles.

As discrepâncias das taxas de frequências alélicas para os alelos de risco dos três principais polimorfismos do gene *CARD15* encontradas nos diversos estudos podem ser atribuídas principalmente a diferenças genéticas nas diferentes populações estudadas. A possibilidade de outros polimorfismos do gene *CARD15* deve ser considerada, como por exemplo, em populações afro-americanas, as frequências dos três principais polimorfismos do gene *CARD15* são baixas e novas variantes foram encontradas, as quais ocorrem somente nestas populações

(<sup>a</sup>BONEN *et al.*, 2002). Nas populações orientais, como a japonesa, chinesa e coreana não foram encontrados os polimorfismos de risco do gene *CARD15* (INOUE *et al.*, 2002; YAMAZAKI *et al.*, 2002; CROUCHER *et al.*, 2003; GUO *et al.*, 2004). Desta forma, é provável que outros genes no mesmo ou diferentes cromossomos estejam envolvidos na susceptibilidade da DC. A interação entre fatores genéticos e ambientais, como os diferentes aspectos culturais dietéticos, também podem ser considerados como fatores de influência na determinação das diferentes prevalências de polimorfismos genéticos em cada população (CHAMAILLARD *et al.*, 2003).

Ao analisarmos as características demográficas da população estudada com o genótipo, torna-se importante ressaltar que embora a população brasileira apresente ampla miscigenação racial entre europeus, africanos e ameríndios, a população caso-controle estudada foi uma população procedente dos estados do Paraná e São Paulo onde há grande concentração de imigrantes europeus (ALVES-SILVA *et al.*, 2000). Segundo os critérios por nós utilizados para classificar a etnicidade da população estudada, não foi observada significância estatística entre os subgrupos étnicos e os genótipos do *CARD15*. Embora, tenha sido próxima à significância entre o subgrupo euro-brasileiro e os SNPs R702W e 3020insC.

Quando comparamos a distribuição das freqüências alélicas dos três polimorfismos estudados, 9,62% para o R702W, 1,87% para o G908R e 3,47% para o 3020insC, com outros estudos populacionais, encontramos distribuições de freqüências semelhantes às obtidas por DIEGO *et al.* (2006) na Espanha, de 7,6%, 3,0% e 4,6%; NEWMAN *et al.* (2004) no Canadá, de 10,3%, 3,7%, e 4,9%; e ARNOTT *et al.* (2004), de 7,2%, 1,8% e 4,6%, na Escócia, e 9,7%, 2,2% e 3,0%, na Irlanda. A explicação para estes resultados semelhantes é difícil de elucidar uma vez que há diferenças étnicas consideráveis nas populações estudadas, e a tentativa de comparar o desenho de estudo destes trabalhos, bem como algumas características clínicas, também é difícil, pois nem sempre são descritos ou usados os mesmos critérios.

Na nossa casuística (n= 187), os pacientes apresentaram a mediana de idade de 33 anos (média de 33,94, variou de 8 a 72 anos) e a mediana de idade de início da doença de 23 anos (média de 23,97, variou de 1 a 60 anos). Um total de 42,8% apresentaram idade de início da DC  $\leq$  20 anos, 48,7%  $>$  20  $\leq$  40 anos, e 8,5%  $>$  40 anos; e 13,3% apresentaram história familiar positiva para doença

inflamatória intestinal (Tabela 5). No estudo de DIEGO *et al.* (2006), observamos casuística semelhante ao nosso estudo, de 183 pacientes. A idade média de diagnóstico dos pacientes foi de  $33,5 \pm 13,3$  anos, e a idade de início da DC foi mais elevada que a nossa casuística (72% apresentaram idade de início < 40 anos, e 28% > 40 anos). O estudo avaliou uma população homogênea na cidade espanhola de Toledo. NEWMAN *et al.* (2004), no Canadá, analisaram casuística maior que a nossa (n= 355), mas semelhantemente, avaliaram crianças e adultos com idade média de diagnóstico de 20,7 anos (variou de 3 a 66 anos). A população canadense estudada também apresenta heterogeneidade étnica, e à nossa semelhança, apresentou significativa representação de descendentes europeus. No estudo de ARNOTT *et al.* (2004) não foram descritas as características clínicas da população estudada, e não identificamos origem étnica comum entre irlandeses ou escoceses e a nossa população.

Pacientes portadores de dois alelos de risco estão associados com idade de diagnóstico mais precoce, bem como, apresentam risco de formas fenotípicas mais agressivas da doença (LESAGE *et al.*, 2002; BRANT *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2003; NEWMAN *et al.*, 2004; DIEGO *et al.*, 2006). Um total de 2,8% (n=5) dos pacientes por nós estudados foram heterozigotos compostos. Não observamos idade de início da doença mais precoce nestes pacientes, todavia, apresentaram formas mais graves da doença, estenosante e fistulizante (4/5). Os controles saudáveis não foram portadores de homozigose ou heterozigose composta. Apesar da homozigose ou heterozigose composta, para qualquer um dos três alelos de risco do *CARD15*, representar um fator genético de elevado risco para o desenvolvimento da DC, não leva necessariamente à manifestação da doença. Interessante relato de VAN DER LINDE *et al.* (2003), demonstra o achado de portadores homozigotos saudáveis em uma família que apresentava dois irmãos com DC, e que permaneceram assintomáticos até idade avançada.

Correlações de genótipo-fenótipos foram realizadas em vários estudos para detectar a possibilidade de associação dos polimorfismos do *CARD15* com distintos subgrupos de fenótipos da doença. Entretanto, os resultados são controversos. Uma hipótese atual sugere que os polimorfismos do gene *CARD15* estejam associados com precocidade de idade, como em crianças e jovens com DC, nos quais é provável que haja maior influência de fatores genéticos do que fatores ambientais para o desenvolvimento da doença (KUGATHASAN *et al.*, 2004).



Alguns estudos que analisaram crianças e adultos mostraram correlação positiva entre a idade de início da doença ou idade de diagnóstico com o genótipo. AHMAD *et al.* (2002) observaram que os pacientes com o polimorfismo 3020insC apresentaram idade de diagnóstico mais precoce quando comparado com pacientes sem este polimorfismo (idade média, 23,1 vs 29,0 anos;  $p = 0,009$ ). No estudo de LESAGE *et al.* (2002), também foi encontrada associação entre a idade de início e idade de diagnóstico com a presença de polimorfismos. A casuística deste estudo mostrou a idade média de início da doença de 19,4 anos (variou de 2 a 56 anos) e a idade média de diagnóstico de 20,7 anos (variou de 3 a 61 anos). O estudo de BUNING *et al.* (2004) mostrou associação entre os polimorfismos do *CARD15* e idade de diagnóstico, também em pacientes mais jovens. Segundo este estudo a idade média de diagnóstico foi de  $26 \pm 9,9$  anos para os pacientes com presença de polimorfismo, enquanto que, para os pacientes sem polimorfismo, foi de  $30 \pm 11,7$  ( $p = 0,03$ ). O estudo de SUN *et al.* (2003) analisou 55 crianças, com idade média de início da doença de 11,2 anos (variou de 1 a 17,5 anos). Embora não tenha atingido significância estatística, mostrou tendência de associação, com maior risco de adquirir DC os pacientes com idade de início mais precoce.

Por outro lado, alguns estudos que avaliaram exclusivamente crianças, não mostraram associação entre idade de início precoce da doença com frequências alélicas mais elevadas. KUGATHASAN *et al.* (2004) avaliaram 186 crianças, com idade média de início da doença de 12,4 anos (variou de 3 a 18 anos), encontrando 6,6% de frequência alélica para o R702W, 13,0% para o 3020insC, e 6,0% para o G908R. No entanto, estes resultados não foram diferentes dos observados em frequências alélicas descritas em pacientes com DC com idade de início na vida adulta. Também, TOMER *et al.* (2003) avaliaram 101 crianças com DC, mostrando frequências alélicas de 2,87% para o R702W, 5,74% para o G908R, e 8,6% para o 3020insC, o que não difere de estudos em adultos. Não houve diferença na idade média de apresentação entre os pacientes pediátricos portadores de polimorfismos e pacientes não portadores (idade média de diagnóstico de 11,9 e 11,6 anos, respectivamente).

Apesar da nossa população de estudo não ser constituída exclusivamente por crianças, não encontramos significância estatística entre genótipo e o subgrupo de pacientes com idade de início mais precoce da doença. De 80 pacientes com idade de início  $\leq 20$  anos foi encontrado 36,2% pacientes com presença de

polimorfismo, comparado com 63,7% sem polimorfismo, enquanto que, no subgrupo de 91 pacientes com idade de início  $> 20$  e  $\leq 40$  anos foi obtido 27,5% e 72,5%, respectivamente.

Alguns estudos foram realizados com o objetivo de avaliar se há diferença na frequência dos polimorfismos do *CARD15* entre pacientes com casos familiares e casos esporádicos da DC. ANNESE *et al.* (2004) avaliaram 152 pacientes com história familiar e 180 com casos esporádicos de DC, e não detectaram diferenças nas frequências alélicas entre os dois subgrupos de pacientes. Por outro lado, resultado discrepante foi obtido por ZHOU *et al.* (2002), que observaram maior contribuição dos polimorfismos do gene *CARD15* em casos familiares da DC comparados aos casos esporádicos. No entanto, este estudo foi realizado em judeus, o que pode explicar a diferença de resultados, uma vez que representa um grupo étnico peculiar.

Um interessante estudo, de ESTERS *et al.* (2004), avaliou a transmissão dos polimorfismos do *CARD15* nas famílias de pacientes com doença inflamatória intestinal. Os autores realizaram um estudo tipo coorte com 1670 indivíduos (570 pacientes com DC, 173 com RCU, 165 controles saudáveis, e 762 familiares de primeiro grau), concluindo que a transmissão materna dos alelos do *CARD15* está associada a menor proporção de indivíduos afetados comparados com a transmissão paterna. Especula-se a possibilidade de fatores protetores maternos, como um gene protetor localizado no cromossomo X ou no DNA mitocondrial. Este mesmo estudo mostrou frequência alélica elevada nos familiares de pacientes (37,3%), enquanto que nos pacientes de DC foi de 46,3%, nos de RCU, 22,0%, e nos controles saudáveis de 20,6%. Isto sugere que outros fatores além do *CARD15* contribuem para a eventual expressão da doença.

A localização da doença é a variável que permanece mais estável durante o curso da doença, e parece mostrar a mais expressiva associação com os polimorfismos do gene *CARD15* nos estudos de genótipo-fenótipo usando a classificação de Vienna (LOUIS *et al.*, 2001). Vários estudos mostram significativa associação dos polimorfismos do gene *CARD15* e a localização ileal da doença (VERMEIRE *et al.*, 2002; CUTHBERT *et al.*, 2002; MENDOZA *et al.*, 2003; TOMER *et al.*, 2003; BUNING *et al.*, 2004; ECONOMOU *et al.*, 2004; ANNESE *et al.*, 2005; HELIO *et al.*, 2006). Dentre os três principais polimorfismos do gene *CARD15*, o

3020insC parece mostrar o maior risco para a doença ileal (AHMAD *et al.*, 2002; VAVASSORI *et al.*, 2002; KUGATHASAN *et al.*, 2004).

A associação entre *CARD15* e o comportamento da doença é muito controverso (LOUIS *et al.*, 2003). Alguns estudos mostram associação dos polimorfismos do *CARD15* com o fenótipo estenosante da doença (ABREU *et al.*, 2002; RADLMAYR *et al.*, 2002; MENDOZA *et al.*, 2003; KUGATHASAN *et al.*, 2004; BUNING *et al.*, 2004; BUNING *et al.*, 2005; ANNESE *et al.*, 2005; HELIO *et al.*, 2006).

Alguns autores defendem a avaliação do fenótipo estenosante somente após a estratificação dos anos da doença, uma vez que o comportamento da DC pode variar dramaticamente no decorrer dos anos (LOUIS *et al.*, 2001). NUÑEZ *et al.* (2004), ressalta que para uma análise mais fidedigna da influência genética sobre o comportamento da DC, a estratificação dos anos da doença poderia ser o mais adequado, uma vez que para um dado paciente um fenótipo de estenose pode demorar anos. No entanto, KUGATHASAN *et al.* (2004) avaliaram uma população pediátrica com idade média de 12,4 anos, com pouco tempo de duração da doença (média de 3,2 anos), e mostraram que o subgrupo de crianças com o polimorfismo 3020insC apresentava padrão precoce e agressivo da doença. Estas crianças apresentaram 6,6 vezes maior risco de desenvolvimento do fenótipo estenosante requerendo cirurgia. Os autores consideraram que o desenvolvimento precoce de comportamento estenosante da doença e com necessidade de ressecção cirúrgica foi influenciado pela localização ileal e pelo polimorfismo 3020insC.

Os polimorfismos de risco do *CARD15* podem influenciar primariamente a localização da doença, e então a doença ileal aumentaria o risco de estenose, uma vez que é tendenciosa para este comportamento. No entanto, dados multivariados detalhados seriam requeridos para mostrar convincentemente se efeito no comportamento estenosante é simplesmente secundário à susceptibilidade ileal elevada (NUÑEZ *et al.*, 2004).

BUNING *et al.* (2004) mostraram associação entre os polimorfismos do *CARD15* com cirurgia de ressecção ileocecal, e com um risco elevado de reoperação. No entanto, a análise de dados por regressão logística não explicou esta associação, mesmo com a alta frequência de envolvimento ileal. Este estudo considerou que os polimorfismos do *CARD15* podem servir como parâmetro para seleccionar pacientes para o tratamento de manutenção no pós-operatório.

O papel dos polimorfismos do gene *CARD15* nas manifestações clínicas da DC mostram muitas divergências de resultados. As razões para tais discrepâncias não estão atualmente claras, mas alguns fatores de influência podem ser considerados, como: diferenças de composição étnica das respectivas populações, diferentes classificações fenóticas adotadas pelos autores, e número da amostra de pacientes estudados (ECONOMOU *et al.*, 2004).

A semelhança dos estudos de LESAGE *et al.* (2002), NUÑEZ *et al.* (2004), e IDESTROM *et al.* (2005), o presente estudo não encontrou associação genótipo-fenótipo com significância estatística (Tabela 10). Ao compararmos o estudo de LESAGE *et al.* (2002) com o nosso, observamos uma casuística maior de pacientes (n= 453), no entanto, observamos que foram estudados crianças e adultos com idade média de início da doença menor, 19,4 anos, comparado com a nossa de 23,97 anos. O estudo avaliou várias populações européias, como alemães e italianos, etnias estas que são comuns aos ancestrais da nossa população estudada. O estudo de IDESTROM *et al.* (2005) avaliou população bem homogênea na Suécia, analisou somente crianças (idade média de 10,9 anos), apresentou casuística muito pequena (n= 58) e, ainda, etnia diferente da nossa. O estudo de NUÑEZ *et al.* (2004) também analisou população homogênea da região da Galícia, na Espanha, com idade média maior,  $36,3 \pm 1,0$  anos, comparado com a nossa de  $33,94 \pm 13,25$  anos. A casuística foi semelhante, de 165 pacientes, porém, com etnia diferente.

A tentativa de identificação de marcadores genéticos associados a subgrupos fenotípicos específicos da DC ainda é um grande desafio. Todavia, acredita-se que isto possibilitaria a identificação de pacientes que necessitam de um tratamento mais individualizado, como o uso de terapias mais agressivas incluindo imunomoduladores e terapias biológicas precocemente, na expectativa de prevenir complicações e cirurgias. A estratégia de identificação de genes associada a correlações de genótipo-fenótipo em populações específicas também deverá contribuir como indicadores de prognóstico na DC, direcionando para um manejo clínico mais adequado com melhor qualidade de vida para os pacientes (KUGATHASAN *et al.*, 2004).

Recentemente, esforços colaborativos do Consórcio de Genética em Doença Inflamatória Intestinal Norte-Americano, em estudo de análise sistêmica do

genoma, identificou um novo gene de susceptibilidade à DC, o gene *IL23R* (DUERR *et al.*, 2006).

O estudo original de DUERR *et al.* (2006) mostrou dez polimorfismos no gene *IL23R* que estão associados à DC: rs1004819, rs7517847, rs10489629, rs2201841, rs11465804, rs11209026, rs1343151, rs10889677, rs11209032 e rs1495965. Neste estudo de coorte foram investigados 547 casos e 548 controles não-judeus de descendência europeia. Foram selecionados pacientes com DC ileal, a localização mais comum, para evitar heterogeneidade patogênica. Os mesmos autores realizaram subsequentemente estudo de replicação em 401 pacientes e 433 controles todos de etnia judaica e encontraram associações significativas em muitos dos mesmos marcadores associados na coorte de não-judeus. Em análise combinada dos dados das duas coortes caso-controles, nove marcadores tiveram associação significativamente elevada. No entanto, este estudo mostrou a mais significativa associação ( $p = 5.05 \times 10^{-9}$ ) com uma rara variante codificadora, rs11209026 (1142 G→A; Arg381Gln), que apresentou frequência alélica de 1,9% nos pacientes não-judeus com DC ileal e de 7,0% nos controles não-judeus. Interessante que o alelo da glutamina pareceu ser protetor contra o desenvolvimento da DC em ambas as coortes caso-controles de judeus (OR 0,26, IC 95% 0,15 a 0,43) e não-judeus (OR 0,45, IC 95% 0,27 a 0,73).

Subsequentemente, outros estudos de replicação foram realizados recentemente em independentes populações, e confirmaram a associação dos polimorfismos do gene *IL23R* e a DC (TREMELLING *et al.*, 2007; CUMMINGS *et al.*, 2007; VAN LIMBERGEN *et al.*, 2007; GLAS *et al.*, 2007).

O estudo de TREMELLING *et al.* (2007), no Reino Unido, avaliou oito polimorfismos do gene *IL23R* em uma coorte de 1902 casos de DC, 975 casos de RCU, e 1345 controles. Este estudo confirmou a associação entre polimorfismos do *IL23R* e doença inflamatória intestinal, sugerindo um efeito maior de susceptibilidade para DC e menor efeito para RCU. A associação mais significativa foi observada com a variante rs11209026 (Arg381Gln), onde a frequência do alelo A (alelo menor) foi 2,5% na DC comparado com 6,2% nos controles ( $p = 1,1 \times 10^{-12}$ , OR 0,38, IC 95% 0,29 a 0,50). Alternativamente, o genótipo GG homocigoto do tipo selvagem comum foi considerado como o genótipo de risco com OR de 2,70.

Um outro estudo no Reino Unido, por CUMMINGS *et al.* (2007), também analisou oito polimorfismos do gene *IL23R*, em 604 casos de DC, 647 de RCU, e

1134 controles. Este estudo confirmou a participação dos marcadores do *IL23R* na DC e também da variante protetora rs11209026, apesar do ponto estimado do efeito deste SNP não ter sido tão forte quanto reportado previamente ( $p = 6,65 \times 10^{-6}$ , OR 0,43, IC 95% 0,29 a 0,63). A variante rs7517847 obteve a mais forte associação com a DC e se mostrou independente da variante 11209026. A frequência alélica do menor alelo para a variante rs7517847 foi 44,8% ( $p = 4,9 \times 10^{-9}$ , OR 1,53, IC 95% 1,33 a 1,78), sugerindo que este SNP, ou um outro em desequilíbrio de ligação com ele, pode ter um efeito maior do que a variante rara rs11209026 na patogênese da DC.

VAN LIMBERGEN *et al.* (2007), na Escócia, onde há elevada incidência da DC e baixa associação com o gene *CARD15* em comparação com outros países europeus, confirmaram a contribuição do alelo rs11209026 do gene *IL23R* em pacientes pediátricos (97% caucasianos) com mediana de idade de 11,1 anos. Foram genotipados 233 pacientes com DC, 86 pacientes com RCU e 342 controles. A frequência alélica do rs11209026\*A diferiu significativamente entre os casos de DII/DC e controles, 2,9%/3,0% vs 5,5%, respectivamente ( $p = 0,01$ , OR 0,51, IC 95% 0,30 a 0,88 e  $p = 0,04$ , OR 0,53, IC 95% 0,28 a 0,98). O genótipo GG foi associado a um risco aumentado de DII/DC ( $p = 0,01$ , OR 2,01, IC 95% 1,15 a 3,49 e  $p = 0,03$ , OR 1,96, IC 95% 1,03 a 3,70).

GLAS *et al.* (2007), na Alemanha, confirmaram a associação com os 10 SNPs do gene *IL23R* que mostraram significância estatística com DC no estudo original. Foram investigados 2670 indivíduos caucasianos incluindo 833 pacientes com DC, 456 pacientes com RCU, e 1381 controles. A mais significativa associação com DC encontrada foi com a variante rs1004819, com frequência alélica de 36,0% vs 26,5% com os controles ( $p = 1,92 \times 10^{-11}$ , OR 1,56, IC 95% 1,37 a 1,78). A variante rs11209026\*A foi protetora para DC, com frequência alélica de 3,0% para os pacientes e 6,8 para os controles ( $p = 8,04 \times 10^{-8}$ , OR 0,43, IC 95% 0,31 a 0,59). Associações menos significantes foram encontradas nos pacientes com RCU, e a variante rs11209026\*A pareceu ter efeito protetor menor para RCU comparado com DC.

No presente estudo, foram avaliados cinco polimorfismos do gene *IL23R*, rs1004819, rs7517847, rs11209026, rs1495965 (região intergênica) e rs10889677. Associações com significância estatística foram encontradas com as variantes rs1004819, rs11209026 e rs10889677 (Tabela 7). A maior associação encontrada

foi com a variante rs11209026, confirmando um efeito protetor ( $p = 0,009$ ). A frequência alélica encontrada foi de 2,2% para pacientes e 5,8% para os controles (OR 0,36, IC 95% 0,16 a 0,81), sendo este resultado semelhante ao estudo original de DUERR *et al.* (2006) que encontrou 1,9% e 7,0% (OR 0,26, IC 95%, 0,15 a 0,43); com o de TREMELLING *et al.* (2007), que obteve 2,5% e 6,2% (OR 0,38, IC 95%, 0,29 a 0,50); CUMMINGS *et al.* (2007), 2,6% e 5,9% (OR 0,43, IC95%, 0,29 a 0,64); VAN LIMBERGEN *et al.* (2007), 3,0% vs 5,5% (OR 0,51, IC 95% 0,30 a 0,88) e GLAS *et al.* (2007), 3,0% e 6,8 (OR 0,43, IC 95% 0,31 a 0,59).

Apesar do presente estudo concordar com o estudo de DUERR *et al.* (2007), com relação à variante de maior associação, rs11209026, difere dos resultados encontrados por CUMMINGS *et al.* (2007) e GLAS *et al.* (2007) que encontraram associações mais fortes com as variantes rs7517847 e rs1004819, respectivamente. Estes estudos confirmam o *IL23R* como um gene de susceptibilidade à DC, mas demonstram diferenças para certas variantes do gene *IL23R* em relação à força do efeito de modificação da doença em diferentes populações (GLAS *et al.*, 2007).

Os estudos descritos concordam que o alelo da glutamina (A) da Arg381Gln é muito menos comum do que o alelo da arginina (G), sugerindo que a variante comum seja a de risco, ou contrariamente a variante rara seja protetora. As explicações são provavelmente complexas, mas para condições imuno-mediadas a variação genética em um determinado *locus* pode conferir espectro de risco diferente, sendo protetora contra algumas doenças, como infecções, enquanto aumenta o risco para outras, como condições auto-imunes ou inflamatórias (TREMELLING *et al.*, 2007).

Pacientes portadores de dois ou três polimorfismos do gene *IL23R* apresentaram 2,5 vezes maior risco de desenvolver DC comparado com os controles. Os marcadores rs1004819/rs10889677 apresentaram a associação de maior risco ( $p = 0,03$ , OR = 4,84, IC 95%, 0,99 a 23,57), seguido do rs1495965/rs10889677; sugerindo que seja improvável um marcador conferir risco de doença independente do outro (Tabela 8).

Em concordância com os estudos descritos não se encontrou associação entre as características clínicas da DC e os genótipos do gene *IL23R* estudados (Tabela 11) (DUERR *et al.*, 2006; TREMELLING *et al.*, 2007; CUMMINGS *et al.*, 2007; VAN LIMBERGEN *et al.*, 2007). Somente no estudo de GLAS *et al.* (2007), na

Alemanha, a correlação genótipo-fenótipo foi positiva entre a variante rs1004819 e a localização ileal da DC. A maioria dos estudos sugere que o *IL23R* é um gene de susceptibilidade generalizada para DC, muito além de um gene determinante de fenótipo (TREMELLING *et al.*, 2007; CUMMINGS *et al.*, 2007).

Apesar da confirmação da associação dos polimorfismos do gene *IL23R* e a DC nas populações caucasianas, todavia, não foram associados com a DC na população japonesa. YAMAZAKI *et al.* (2007), no Japão, analisaram os dez polimorfismos do estudo original de DUERR *et al.* (2006), em 484 casos de DC e 439 controles, e não foi observada evidência de associação positiva para nenhum dos *loci* do *IL23R* com DC. A evidência de variações étnicas genéticas que predisõem a DC ou que afetem o fenótipo ressalta a hipótese que outros genes devem exercer um papel na susceptibilidade à DC, além da influência de fatores ambientais (CARIO, 2005).

Todos os polimorfismos estudados dos genes *CARD15* e *IL23R*, mostraram-se dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ ), exceto o polimorfismo rs11209026 para o grupo de DC, que foi significativo. Isto pode ser decorrente do pequeno número amostral para este polimorfismo (Tabela 9).

O presente trabalho representa o primeiro estudo de análise genética dos principais polimorfismos dos genes *CARD15/IL23R* associados à DC na população brasileira, e à semelhança dos estudos em populações européias, foi confirmada a contribuição destes polimorfismos ao risco de susceptibilidade da DC na população estudada. No entanto, estes resultados podem não ser representativos para toda população brasileira, não somente por causa da diversidade étnica do Brasil mas também pelas diferenças de fatores ambientais de cada região. Mais estudos de investigação genética são necessários em ampla e diversas amostras populacionais do país.

Com a descoberta de vários polimorfismos genéticos em diferentes genes, relacionados com a DC, é possível que em um futuro próximo que testes genéticos possam ser utilizados para o prognóstico e tratamento de cada paciente.



## 6 CONCLUSÕES

- 1) Os polimorfismos R702W, 3020insC do gene *CARD15* e rs1004819, Arg381Gln, rs10889677 do gene *IL23R* estão associados com a doença de Crohn na população brasileira estudada.
- 2) As frequências alélicas para os polimorfismos R702W, G908R e 3020insC do gene *CARD15* em pacientes com DC estudados são respectivamente: 9,63%, 1,87% e 3,48%, enquanto que, para os polimorfismos rs1004819, rs7517847, rs11209026, rs1495965 e rs10889677 do gene *IL23R* são: 32,8%, 41,5%, 2,2%, 48,3% e 31,5%. Estas frequências são significativamente maiores quando comparadas com os controles. E são similares às frequências descritas nas populações européias.
- 3) Não há associações dos polimorfismos dos genes *CARD15* e *IL23R* com as características clínicas da DC na população em estudo.
- 4) O polimorfismo R702W do gene *CARD15* e o rs1004819 do gene *IL23R* mostram a mais elevada contribuição de risco ao desenvolvimento da DC na população em estudo. É provável que estes polimorfismos apresentem particular papel na patogênese da DC em pacientes brasileiros.
- 5) O polimorfismo rs11209026 mostra a maior associação com a DC entre os polimorfismos do gene *IL23R*, sugerindo efeito protetor à DC .

## REFERÊNCIAS

- ABREU, M.T.; TAYLOR, K. D.; LIN, Y. C.; HANG, T.; GAIENNIE, J.; *et al.* Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.123, n.3, p.679-688, 2002.
- ABREU, M. T. Nod2 in normal and abnormal intestinal immune function. **Gastroenterology**, v.129, n.4, p.1302-1304, 2005.
- ACOSTA, M. B.; PEÑA, A. S. Clinical applications of NOD2/CARD15 mutations on Crohn's disease. **Acta Gastroenterol Latinoam**, v.37, n.1, p.49-54, 2007.
- AHMAD, T.; ARMUZZI, A.; BUNCE, M.; MULCAHY-HAWES, K.; MARSHALL, S.E.; *et al.* The Molecular Classification of the Clinical Manifestations of Crohn's Disease. **Gastroenterology**, v. 22, p.854-866, 2002.
- AHMAD, T.; TAMBOLI, C. P.; JEWELL, D.; COLOMBEL, J.F. Clinical Relevance of Advances in Genetics and Pharmacogenetics of IBD. **Gastroenterology**, v.126, p.1533-1549, 2004.
- ALVES-SILVA, J.; SANTOS, M. S.; GUIMARÃES, P. E. M.; FERREIRA, A.C.S.; BANDELT, H.J.; *et al.* The Ancestry of Brazilian mtDNA Lineages. **Am J Hum Genet**, v.67, p.444-461, 2000.
- ANNESE, V.; LATIANO, A.; ANDRIULLI, A. Genetics of inflammatory bowel disease: The beginning of the end or the end of the beginning? **Dig Liver Dis**, v. 35, p.442-449, 2003.
- ANNESE, V.; PALMIERI, O.; LATIANO, A.; ARDIZZONE, S.; CASTIGLIONE, F.; *et al.* Frequency of NOD2/CARD15 variants in both sporadic and familial cases of Crohn's disease across Italy. Na Italian Group for Inflammatory Bowel Disease study. **Dig Liver Dis**, v. 36, p.121-124, 2004.
- ANNESE, V.; LOMBARDI, G.; PERRI, F.; D'INCA, R.; ARDIZZONE, S.; *et al.* Variants of CARD15 are associated with an aggressive clinical course of Crohn's disease – an IG-IDB study. **Am J Gastroenterol**, v.100, n.1, p.84-92, 2005.
- ARNOTT, I. D. R.; NIMMO, E. R.; DRUMMOND, H. E.; FENNEL, J.; SMITH, B. R. K.; *et al.* NOD2/CARD15, TLR4 and CD14 mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? **Genes and Immunity**, v.5, p. 417-425, 2004.
- BAMIAS, G.; COMINELLI, F. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease: current concepts. **Curr Opin Gastroenterol**, v.23, p. 365-369, 2007.
- BAYLESS, T. M.; TOKAYER, A. Z.; POLITO II, J. M.; QUASKEY, S.A.; MELLITS, D.; *et al.* Crohn's disease: concordance for site and clinical type in affected family members - potential hereditary influences. **Gastroenterology**, v. 111, p. 573-579, 1996.

BECKER, C.; WIRTZ, S.; BLESSING, M.; PIRHONEN, J.; STRAND, D.; *et al.* Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. **J Clin Invest**, v.112, n.5, p. 693-706, 2003.

BOEDEKER, E. C. Gut microbes, the innate immune system and inflammatory bowel disease: location, location, location. **Curr Opin Gastroenterol**, v.23, p.1-3, 2007.

<sup>a</sup>BONEN, D. K.; CHO, J. H. The genetics of inflammatory bowel disease. **Gastroenterology**, v.124, p.521-536, 2003.

<sup>b</sup>BONEN D. K.; OGURA, Y.; NICOLAE, D. L.; INOHARA, N.; SAAB, L.; *et al.* Crohn's Disease-Associated NOD2 Variants Share a Signaling Defect in Response to Lipopolysaccharide and Peptidoglycan. **Gastroenterology**, v.124, p.140-146, 2003.

BRANT, S. R.; PICCO, M. F.; ACHKAR, J. P.; BAYLESS, T. M.; KANE, S. V.; *et al.* Defining Complex Contributions of NOD2/CARD15 Gene Mutations, Age at Onset, and Tobacco use on Crohn's Disease Phenotypes. **Inflamm Bowel Dis**, v. 9, n.5, p.281-289, 2003.

BUNING, C.; GENSCHEL, J.; BUHNER, S.; KRUGER, S.; KLING, K.; *et al.* Mutations in the NOD2/CARD15 gene in Crohn's disease are associated with ileocecal resection and are a risk factor for reoperation. **Aliment Pharmacol Ther**, v.19, p.1073-1078, 2004.

BUNING, C.; MOLNAR, T.; NAGY, F.; LONOVICS, J.; WELTRICH, R.; *et al.* NOD2/CARD15 gene polymorphisms in patients with inflammatory bowel disease: is Hungary different? **World J Gastroenterol**, v.11, n.3, p.407-411, 2005.

CARIO, E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and NOD2. **Gut**, v.54, p.1182-1193, 2005.

CAVANAUGH, J. A.; ADAMS, K. E.; QUAK, E. J.; BRYCE, M. E.; O'CALLAGHAN, N. J.; *et al.* CARD15/NOD2 Risk Alleles in the Development of Crohn's Disease in the Australian Population. **Ann Hum Genet**, v. 67, p.35-41, 2003.

CHAMAILLARD, M.; PHILPOTT, D.; GIRARDIN, S. E.; ZOUALI, H.; LESAGE, S.; *et al.* Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory bowel diseases. **Proc Natl Acad Sci**, v.100, p.3455-3460, 2003.

CHAMBERLIN, W. M.; NASER, S. A. Integrating theories of the etiology of Crohn's disease on the etiology of Crohn's disease: questioning the hypotheses. **Med Sci Monit**, v.12,n.2, p.RA27-33, 2006.

COLOMBEL, J. F.; GRANDBASTIEN, B.; GOWER-ROUSSEAU, C.; PLEGAT, S.; EVRARD, J.P.; *et al.* Clinical characteristics of Crohn's disease in 72 families. **Gastroenterology**, v. 111, p. 604-607, 1996.

COLOMBEL J. F. The CARD15 (also known as NOD2) gene in Crohn's disease: are there implications for current clinical practice? **Clin Gastroenterol Hepatol**, v.1, p.5-9, 2003.

- CROUCHER, P. J. P.; MASCHERETTI, S.; HAMPE, J.; HUSE, K.; FRENZEL, H.; *et al.* Haplotype structure and association to Crohn's disease of CARD15 mutations in two ethnically divergent population. **Eur J Hum Genet**, v.11, p.6-16, 2003.
- CUKOVIC-CAVKA, S.; VERMEIRE, S.; HRSTIC, I.; CLAESSENS, G.; KOLACEK, S.; *et al.* NOD2/CARD15 mutations in Croatian patients with Crohn's disease: prevalence and genotype-phenotype relationship. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.18, p.895-909, 2006.
- CUMMINGS, F. J. R.; AHMAD, T.; GEREMIA, A.; BECKLY, J.; COONEY, R.; *et al.* Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype. **Inflamm Bowel Dis**, v.13, n.9, p. 1063-1068, 2007.
- CUTHBERT, A. P.; FISHER, S. A.; MIRZA, M. M.; KING, K.; HAMPE, J.; *et al.* The Contribution of NOD2 Gene Mutations to the Risk and Site of Disease in Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v.122, p. 867-874, 2002.
- DIEGO, C.; ALCANTARA, M.; VALLE, J.; GRUESO, M. J. P.; MUNOZ-ROSAS, C.; *et al.* Frequency of CARD15 polymorphisms in patients with Crohn's disease from Toledo, Spain: genotype-phenotype correlation. **Genetic Testing**, v.10, n.3, p.178-185, 2006.
- DUERR, R. H. Update on the Genetics of Inflammatory Bowel Disease. **J Clin Gastroenterol**, v.37, n.5, p.358-367, 2003.
- DUERR, R. H.; TAYLOR, K. D.; BRANT, S. R.; RIOUX, J. D.; SILVERBERG, M. S.; *et al.* A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. **Science**, v.314, p.1461-1463, 2006.
- ECKMANN, L.; KARIN, M. NOD2 and Crohn's disease: loss or gain of function. **Immunity**, v.22, p.661-667, 2005.
- ECONOMOU, M.; TRIKALINOS, T. A.; LOIZOU, K.; TSIANOS, E. V.; IOANNIDIS, J. P. A. Differential Effects of NOD2 Variants on Crohn's Disease Risk and Phenotype in Diverse Populations: A Metaanalysis. **Am J Gastroenterol**, v.99, p.2393-2404, 2004.
- ESTERS, N.; PIERIK, M.; VAN STEEN, K.; VERMEIRE, S.; CLAESSENS, G.; *et al.* Transmission of CARD15 (NOD2) Variants Within Families of Patients with Inflammatory Bowel Disease. **Am J Gastroenterol**, v.99, n.2, p. 299-305, 2004.
- FIDDER, H. H.; OLSCHWANG, S.; AVIDAN, B.; ZOUALI, H.; LANG, A.; BARDAN, E.; *et al.* Association Between Mutations in the CARD15 (NOD2) Gene and Crohn's Disease in Israeli Jewish Patients. **Am J Med Genet**, v.121A, p. 240-244, 2003.
- FIOCCHI, C. Inflammatory Bowel Disease: Etiology and Pathogenesis. **Gastroenterology**, v.115, p.182-205, 1998.
- FIOCCHI, C. INFLAMMATORY BOWEL DISEASE: NEW INSIGHTS INTO MECHANISMS OF INFLAMMATION AND INCREASINGLY CUSTOMIZED APPROACHES TO DIAGNOSIS AND THERAPY. **Curr Opin Gastroenterol**, v.20, p.309-310, 2004.

- FIOCCHI, C. Falling from grace: paradigm shifting in inflammatory bowel disease. **Curr Opin Gastroenterol**, v.23, p.363-364, 2007.
- FOLWAACZNY, C.; RADLMAYR, M.; MARTIN, K.; TOEROEK, P. The C-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.122, p.A-297, 2002.
- FUJINO, S.; ANDOH, A.; BAMBIA, S.; OGAWA, A.; HATA, K.; *et al.* Increased expresión of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. **Gut**, v.52, p.65-70, 2003.
- GAZOULI, M.; MANTZARIS, G.; KOTSINAS, A.; ZACHARATOS, P.; PAPALAMBROS, E.; *et al.* 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, n.5, p. 681-685, 2005.
- GEARRY, R. B.; LEA, R. A.; ROBERTS, R. L.; CHAMBERS, G. K.; BARCLAY, M. L.; *et al.* *CARD15* allele frequency differences in New Zealand Maori: ancestro specific susceptibility to Crohn's disease in New Zealand? **Gut**, v.55, p.580, 2006.
- GIACHINO, D.; VAN DUIST, M. M.; REGAZZONI, S.; GREGORI, D.; BARDESSONO, M.; *et al.* Analysis of the *CARD15* variants R702W, G908R and L1007fs in Italian IBD patients. **Eur J Hum Genet**, v.12, n.3, p.206-212, 2004.
- <sup>a</sup>GIRARDIN, S. E.; BONECA, I. G.; VIALA, J.; CHAMAILLARD, M.; LABIGNE, A.; *et al.* Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. **J Biol Chem**, v. 278, n.11, p.8869-8872, 2003.
- <sup>b</sup>GIRARDIN, S. E.; HUGOT, J. P.; SANSONETTI, P. J. Lessons from Nod2 studies: toward a link between Crohn's disease and bacterial sensing. **Trends Immunol**, v.24, p.652-658, 2003.
- GLAS, J.; SEIDERER, J.; WETZKE, M.; KONRAD, A.; TOROK, H. P.; *et al.* rs1004819 Is the Main Disease-Associated *IL23R* Variant on German Crohn's Disease Patients: Combined Analysis of *IL23R*, *CARD15*, and *OCTN1/2* Variants. [www.plosone.org](http://www.plosone.org), p.1-8, September 2007.
- GUO, Q. S.; X, B.; JIANG, Y.; QU, Y.; LI, J.; *et al.* NOD2 3020insC frameshift mutation is not associated with inflammatory bowel disease in Chinese patients of Han nationality. **World J Gastroenterol**, v.10,n.7, p.1069-1071, 2004.
- HAMPE, J.; CUTHBERT, A.; CROUCHER, P. J. P.; MIRZA, M. M.; MASCHERETTI, S.; *et al.* Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. **Lancet**, v. 357, p.1925-1927, 2001.
- HAMPE, J.; GREBER, J.; NIKOLAUS, S.; SOLBERG, C.; CROUCHER, P.J. P.; *et al.* Association of NOD2 (*CARD15*) genotype with clinical course of Crohn's disease: a cohort study. **Lancet**, v. 359, p.1661-1665, 2002.

HELIO, T.; HALME, L.; LAPPALAINEN, M.; FODSTAD, H.; PAAVOLA-SAKKI, P.; *et al.* CARD15/NOD2 gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. **Gut**, v. 52, p.558-562, 2003.

HUE, S.; AHERN, P.; BUONOCORE, S.; KULLBERG, C.; CUA, D. J.; *et al.* Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. **J Exp Med**, v.203, n.11, p.2473-2483, 2006.

HUGOT, J. P; LAURENT-PUIG, P.; GOWER-ROUSSEAU, C.; OLSON, J. M.; LEE, J. C.; *et al.* Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. **Nature**, v.379, p.821-823, 1996.

HUGOT, J. P.; CHAMAILLARD, M.; ZOUALI, H.; LESAGE, S.; CEZARD, J. P.; *et al.* Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. **Nature**, v. 411, n.6837, p. 599-603, 2001.

HUGOT, J. P; ZOUALI, H.; LESAGE, S. Lessons to be learned from the NOD2 gene in Crohn's disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 5, p. 593-597, 2003.

HUGOT, J. P.; JUNG, C. IBD Genes: The Old and New Candidates. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.43, Suppl.2, p.S11, 2006.

HUME, G.; SMITH, G. L. R. The pathogenesis of Crohn's disease in the 21<sup>st</sup> century. **Pathology**, v.34, p.561-567, 2002.

IDESTROM, M.; RUBIO, C.; GRANATH, F.; FINKEL, Y.; HUGOT, J. P. CARD15 mutations are rare in Swedish pediatric Crohn disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.40, p.456-460, 2005.

INOHARA, N.; OGURA, Y.; CHEN, F. F.; MUTO, A.; NUNEZ, G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial Lipopolysaccharides. **J Biol Chem**, v.276, n.4, p.2551-2554, 2001.

INOHARA, N.; CHAMAILLARD, M.; McDONALD, C.; NUNEZ, G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. **Annu Rev Biochem**, v.74, p.355-383, 2005.

INOUE, N.; TAMURA, K.; KINOUCI, Y.; FUKUDA, Y.; TAKAHASHI, S.; *et al.* Lack of common NOD2 variants in Japanese patients with Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.123, p.86-91, 2002.

JONG, D. J.; NETEA, M. G.; KULLBERG, B. J.; JANSEN, T.; JACOBS, L.; *et al.* NOD2/CARD15 modulates specific Toll-like receptor pathways for the induction of cytokine release. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v.18, n.1, p. A29, 2006.

KARBAN, A.; ELIAKIM, R. Failure to Replicate the Association of the Novel NOD2/CARD15 Haplotype (S268-JW1) to Crohn's Disease in the Jewish Israeli Population. **Gastroenterology**, v.126, n.2, p.624-625, 2003.

- KRAMER, M.; NETEA, M.G.; De JONG, D. J.; *et al.* Impaired dendritic cell function in Crohn's disease patients with NOD2 3020insC mutation. **J Leukoc Biol**, v.79, p.860-866, 2006.
- KOBAYASHI, K. S.; CHAMAILLARD, M.; OGURA, Y.; HENEGARIU, O.; INOHARA, N.; *et al.* Nod2-Dependent Regulation of Innate and Adaptive Immunity in the Intestinal Tract. **Science**, v.307, p.731-734, 2005.
- KUGATHASAN, S.; COLLINS, N.; MARESSO, K.; HOFFMANN, R. G.; STEPHENS, M.; *et al.* CARD15 Gene Mutations Confers an Increased Risk for Early Surgery in Pediatric-Onset Crohn's Disease. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v.11,n.11, p. 1003-09, 2004.
- KUGATHASAN, S.; LOIZIDES A.; BABUSUKUMAR, U.; McGUIRE, E.; WANG, T.; *et al.* Comparative Phenotypic and CARD15 Mutational Analysis Among African American, Hispanic, and White Children with Crohn's Disease. **Inflamm Bowel Dis**, v.11,n.7, p.631-8, 2005.
- LALA, S.; OGURA, Y.; OSBORNE, C.; HOR, S. Y.; BROMFIELD, A.; *et al.* Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for Paneth cells. **Gastroenterology**, v.125, p.47-57, 2003.
- LANGRISH, C. L.; CHEN, Y.; BLUMENSCHIEIN, W. M.; MATTSON, J.; BASHAM, B.; *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. **J Exp Med**, v.201, n.2, p.233-240, 2005.
- LENNARD-JONES, J. E. Classification of Inflammatory Bowel Disease. **Scand J Gastroenterol**, v. 24, p. 2-6, 1989.
- LESAGE, S.; ZOUALI, H.; CÉZARD, J. P.; EPWG-IBD GROUP; COLOMBEL, J. F.; *et al.* CARD15/NOD2 Mutational Analysis and Genotype-Phenotype Correlation in 612 Patients with Inflammatory Bowel Disease. **Am J Hum Genet**, v. 70, p.845-57, 2002.
- LINSKENS, R. K.; MALLANT-HENT, R. C.; MURILLO, L.S.; VON BLOMBERG, B. M. E.; ALIZADEH, B. Z.; *et al.* Genetic and serological markers to identify phenotypic subgroups in a Dutch Crohn's disease population. **Dig Liver Dis**, v. 36, p. 29-34, 2004.
- LOUIS, E.; COLLARD, A.; OGER, A. F.; DEGROOTE, E.; EL YAFI, F. A. N.; BELAICHE, J. Behavior of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. **Gut**, v. 49, p.777-782, 2001.
- LOUIS, E.; HUGOT, J. P.; COLOMBEL, J. F.; FONTAINE, F.; DELFORGE, M.; *et al.* NOD2/CARD15 Mutations in Crohn's Disease are Associated with Young Age at Diagnosis and Ileal Location. **Gastroenterology**, v.122, p.A-295, 2002.
- LOUIS, E.; MICHEL, V.; HUGOT, J. P.; REENAERS, C.; FONTAINE, F.; *et al.* Early development of stricturing or penetrating in Crohn's disease is influenced by disease location, number of flares, and smoking but not by NOD2/CARD15 genotype. **Gut**, v. 52, p.552-557, 2003.

- MARSH, S. e McLEOD, H. L. Crohn's disease: ethnic variation in CARD15 genotypes. **Gut**, v.52, n.5, p.770, 2003.
- McGOVERN, D. P. B.; HYSI, P.; AHMAD, T.; VAN HEEL, D. A.; MOFFATT, M. F.; *et al.* Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. **Hum Mol Genet**, v.14, n.10, p.1245-1250, 2005.
- McGOVERN, D.; POWRIE, F.; *et al.* The IL23 axis plays a key role in the pathogenesis of IBD. **Gut**, v. 56, p.1333-1336, 2007.
- McKENZIE, B. S.; KASTELEIN, R. A. e CUA, D. J. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. **Trends Immunol**, v.27, p.17-23, 2006.
- MEINZER, U.; HUGOT, J. P. Nod2 and Crohn's disease: many connected highways. **Lancet**, v.365,n.9473, p.1752-1753, 2005.
- MENDOZA, J. L.; MURILLO, L. S.; FERNANDEZ, L.; PENA, A. S.; LANA, R.; *et al.* Prevalence of Mutations of the NOD2/CARD15 Gene and Relation to Phenotype in Spanish Patients with Crohn disease. **Scand J Gastroenterol**, v.38, n.12.1235-1240, 2003.
- MENDOZA, J. L.; TAXONERA, C. Clinical value of gene NOD2/CARD15 mutations in Crohn's disease. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v. 97, n.8, on-line dia, Madrid Aug, 2005.
- MURILLO, L. S.; MORRÉ, S. A.; PEÑA, A. S. Role of the CARD15 gene in the pathogenesis of Crohn disease: phenotypic classification and prognostic implications. **Scand J Gastroenterol**, v.11, p.1107-1114, 2003.
- NEURATH, M. F. IL-23: a master regulator in Crohn disease. **Nat Med**, v.13, n.1, p.26-28, 2007.
- NEWMAN, B.; SILVERBERG, M. S.; GU, X.; ZHANG, Q.; LAZARO, A.; *et al.* CARD15 and HLA DRB1 Alleles Influence Susceptibility and Disease Localization in Crohn's Disease. **Am J Gastroenterol**, v.99, n.2, p. 306-315, 2004.
- NUNEZ, C.; BARREIRO, M.; DOMÍNGUEZ-MUNOZ, J. E.; LORENZO, A.; ZAPATA, C., *et al.* CARD15 mutations in patients with Crohn's disease in a homogeneous Spanish Ppopulation. **Am J Gastroenterol**, v. 99, p.450-456, 2004.
- OGURA, Y.; BONEN, D. K.; INOHARA, N.; NICOLAE, D. L.; CHEN, F. F.; *et al.* A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Cronh's disease. **Nature**, v.411, p. 603-606, 2001.
- OPPMANN, B.; LESLEY, R.; BLOM, B.; TEMANS, J. C.; XU, Y.; *et al.* Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, v.13,n.5, p. 715-725, 2000.



PARHAN, C.; CHIRICA, M.; TIMANS, J.; VAISBERG, E.; TRAVIS, M.; *et al.* A Receptor for the Heterodimeric Cytokine IL-23 Is Composed of IL-12R $\beta$ 1 and a Novel Cytokine Receptor Subunit, IL-23R. **J Immunol**, v.168, p.5699-5708, 2002.

PARKES, M.; BARRETT, J. C.; PRESCOTT, N. J.; TREMELLING, M.; ANDERSON, C. A.; *et al.* Sequence variants in the autophagy gene *IRGM* and multiple other replicating *loci* contribute to Crohn's disease susceptibility. **Nat Genet**, v.39, n.7, p. 830-832, 2007.

PELTEKOVA, V. D.; WINTLE, R. F.; RUBIN, L. A.; AMOS, C.; I.; HUANG, Q.; *et al.* Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. **Nat Genet**, v.36, n.5, p. 471-475, 2004.

RADLMAYR, M.; TOROK, H. P.; MARTIN, K., FOLWACZNY, C. The c-insertion mutation of the NOD2 gene is associated with fistulizing and fibrostenotic phenotypes in Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.122, p.2091-2095, 2002.

RESCIGNO, M.; NIEUWENHUIS, E. E. S. The role of altered microbial signaling via mutant NODs in intestinal inflammation. **Curr Opin Gastroenterol**, v.23, p. 21-26, 2007.

RICHARD, H. D. Update on the Genetics of Inflammatory Bowel Disease. **J Clin Gastroenterol**, v.37, p. 358-367, 2003.

RIOUX, J. D.; SILVERBERG, M. S.; DALY, M. J.; STEINHART, A. H.; McLEOD, R. S. *et al.* Genome-wide search in Canadian families with inflammatory bowel disease reveals two novel susceptibility loci. **Am J Hum Genet**, v.66, p.1863-1870, 2000.

RIOUX, J. D.; XAVIER, R. J.; TAYLOR, K. D.; SILVERBERG, M. S.; GOYETTE, P.; *et al.* Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. **Nat Genet**, v.39, p. 596-504, 2007.

ROGLER, G. Update in inflammatory bowel disease pathogenesis. **Curr Opin Gastroenterol**, v.20, p.311-317, 2004.

SCHIFFRIN, E. J.; DONNET-HUGHES, A. Host-Flora Interactions in Inflammatory Bowel Disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.43, Suppl.2, p.S4, 2006

SCHREIBER, S. Slipping the barrier: how variants in CARD15 could alter permeability of the intestinal wall and population health. **Gut**, v.55, p.308-309, 2006.

STEINMAN, L. A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nat Med**, v.13, n.2, 2007.

STOLL, M.; CORNELIUSSEN, B.; COSTELLO, C. M.; WAETZIG, G. H.; MELLGARD, B.; *et al.* Genetic variation in *DLG5* is associated with inflammatory bowel disease. **Nat Genet**, v. 36, n.5, p.476-480, 2004.

SUGIMURA, K.; TAYLOR, K. D.; LIN, Y. C.; HANG, T.; WANG, D.; *et al.* A Novel NOD2/CARD15 Haplotype Conferring Risk for Crohn Disease in Ashkenazi Jews. **Am J Hum Gen**, v.72, p.509-518, 2003.

SUN, L.; ROESLER, J.; ROSEN-WOLFF, A.; WINKLER, U.; KOCH, R.; *et al.* *CARD15* genotype and phenotype analysis in 55 pediatric patients with Crohn disease from Saxony, Germany. **J Ped Gastroenterol Nutr**, v. 37, p. 492-497, 2003.

THE IBD INTERNATIONAL GENETICS CONSORTIUM. International Collaboration Provides Convincing Linkage Replication in Crohn Disease through Analysis of a Large Pooled Data Set: Crohn Disease and Chromosome 16. **Am J Hum Genet**, v. 68, p.1165-1171, 2001.

TOMER, G.; CEBALLOS, C.; CONCEPTION, E.; BENKOV, K. J. NOD2/CARD15 variants are associated with lower weight at diagnosis in children with Crohn's disease. **Am J Gastroenterol**, v. 98, n.11, p. 2479-2484, 2003.

TREMELLING, M.; CUMMINGS, F.; FISHER, S. A.; MANSFIELD, J.; GWILLIAM, R.; *et al.* IL23R Variation Determines Susceptibility but not Disease Phenotype in Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v.132, p. 1657-1664, 2007.

TUKEL, T.; SHALATA, A.; PRESENT, D.; RACHMILEWITZ, D.; MAYER, L.; *et al.* Crohn Disease: Frequency and Nature of CARD15 Mutations in Ashkenazi and Sephardi/Oriental Jewish Families. **Am J Hum Genet**, v.74, n. 4, p.623-636, 2004.

UYAR, F. A.; HAMZAOGLU, O.; TURE, F.; GUL, A.; TOZUN, N.; *et al.* Distribution of common CARD15 variants in patients with sporadic Crohn's disease: cases from Turkey. **Dig Dis Sci**, v.51, n.4, p.706-710, 2006.

VAN DER LINDE, K.; BOOR, P. P. C.; HOUWING-DUISTERMAAT, J. J.; KUIPERS, E. J.; PAUL WILSON, J. H.; *et al.* *CARD15* and Crohn's Disease: Healthy Homozygous Carriers of the 3020insC Frameshift Mutation. **Am J Gastroenterol**, v.98, p. 613-617, 2003.

VAN HEEL, D. A.; McGOVERN, D. P. B.; JEWELL, D. P. Crohn's disease: genetic susceptibility, bacteria, and innate immunity. **Lancet**, v.357, p. 1902-1903, 2001.

VAN LIEROP, P. P. E.; ESCHER, J. C.; SAMSOM, J. N.; NIEUWENHUIS, E. E. S. Early Immune Responses in IBD. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.43, Suppl.2, p.S4, 2006.

VAN LIMBERGEN, J.; RUSSEL, R. K.; NIMMO, E. R.; DRUMMOND, H. E.; SMITH, L.; *et al.* IL23R Arg381Gln is associated with childhood onset inflammatory bowel disease in Scotland. **Gut**, v. 56, p. 1173-1174, 2007.

VAVASSORI, P.; BORGIANI, P., D'APICE, M. R.; DE NIGRIS, F.; BLANCO, G. D. V.; *et al.* NOD2 gene mutations and clinical pattern of Crohn's disease. **Gastroenterology**, v.122, p. A-296, 2002.

VERMEIRE, S; WILD, G.; KOCHER, K.; COUSINEAU, J.; DUFRESNE, L.; *et al.* *CARD15* Genetic Variation in a Quebec Population: Prevalence, Genotype-Phenotype Relationship, and Haplotype Structure. **Am J Hum Genet**, v.71, p. 74-83, 2002.

VERMEIRE, S. NOD2/CARD15: relevance in clinical practice. **Best Prac Res Clin Gastroenterol**, v.18, n.3, p.569-575, 2004.

WATANABE, T.; KITANI, A.; MURRAY, P. J.; STROBER, W.; *et al.* NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. **Nat Immunol**, <http://www.nature.com/natureimmunology>, published online 27 June 2004, p.1-10.

WEAVER, C. T.; HARRINGTON, P. R. M.; GAVRIELLI, M.; MURPHY, K. M. Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. **Immunity**, v.24, p.677-688, 2006.

WEHKAMP, J.; HARDER, J.; WEICHENTHAL, M.; SCHWAB, M.; SCHAFFELER, E.; *et al.* NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal  $\alpha$ -defensin expression. **Gut**, v.53, p.1658-1664, 2004.

WIEKOWSKI, M. T.; LEACH, M. W.; EVANS, E. W.; SULLIVAN, L.; CHEN, S. C.; *et al.* Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. **J Immunol** v.166, p.7563-7570, 2001.

XAVIER, R. J.; PODOLSKY, D. K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Nature**, v.448, p.427-434, 2007.

YAMAZAKI, K.; TAKAZOE, M.; TANAKA, T.; KAZUMORI, T.; NAKAMURA, Y.; *et al.* Absence of mutation in the NOD2/CARD15 gene among 483 Japanese patients with Crohn's disease. **J Hum Genet**, v.47, p.469-472, 2002.

YAMAZAKI, K.; ONOUCHI, Y.; TAKAZOE, M.; KUBO, M.; NAKAMURA, Y.; *et al.* Association analysis of genetic variants in IL23R, ATG16L1 and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients. **J Hum Genet**, v.52, n.7, p.575-583, 2007.

YEN, D.; CHEUNG, J.; SCHEERENS, H.; POULET, F.; McCLANAHAN, T.; *et al.* IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. **J Clin Invest**, v.116, p.1310-1316, 2006.

ZHENG, C. Q.; HU, G. Z.; ZENG, Z. S.; LIN, L. J.; GU, G. G. Progress in searching for susceptibility gene for inflammatory bowel disease by positional cloning. **World J Gastroenterol**, v.9, n.8, p. 1646-1656, 2003.

ZHOU, Z.; LIN, X.; AKOLKAR, P. N.; GULWANI-AKOLKAR, B.; LEVINE, J.; *et al.* Variation at NOD2/CARD15 in Familial and Sporadic Cases of Crohn's Disease in the Ashkenazi Jewish Population. **Am J Gastroenterol**, v. 97, p.3095-3101, 2002.

ZOUITEN-MEKKI, L. Z.; ZAOUALI, H.; BOUBAKER, J.; KAROUI, S.; FEKIH, M.; *et al.* CARD15/NOD2 in a Tunisian population with Crohn's disease. **Dig Dis Sci**, v.50, n.1, p.130-135, 2005.

## APÊNDICES

<b>APÊNDICE 1.</b> QUESTIONÁRIO DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES.....	71
<b>APÊNDICE 2.</b> PLANILHA DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES.....	73
<b>APÊNDICE 3.</b> PLANILHA DE PACIENTES PORTADORES DOS POLIMORFISMOS DOS GENES <i>CARD15</i> E <i>IL23R</i> .....	78
<b>APÊNDICE 4.</b> GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DO GENE <i>IL23R</i> ESTUDADOS.....	83
<b>APÊNDICE 5.</b> APRESENTAÇÃO E PREMIAÇÃO EM CONGRESSO INTERNACIONAL.....	93
<b>APÊNDICE 6.</b> PUBLICAÇÃO INTERNACIONAL.....	96

**APÊNDICE 1**  
**QUESTIONÁRIO DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES**

## QUESTIONÁRIO DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES

### 1- Dados Pessoais:

Nome:.....Idade:..... RG-HC:.....

Data de Nascimento:.....Data de

Avaliação:.....

Sexo: Masculino ( 1 ) Feminino ( 2 )

2- Grupo-étnico: Brasileiro ( 1 ) Asiático-brasileiro ( 4 )  
 Euro-brasileiro ( 2 ) Ameríndio-brasileiro ( 5 )  
 Afro-brasileiro ( 3 ) Outro.....

3- Idade de Início da Doença:.....

4- História de Doença Inflamatória Intestinal na família: Sim ( 1 ) Não ( 2 )

5- Localização da Doença: Radiologia ( 1 ) Endoscopia ( 2 )

- Ileal ( 1 )
- Cólon ( 2 )
- Ileocolônica ( 3 )
- Trato Gastrointestinal Alto ( 4 )

- Envolvimento Perianal: Sim ( 1 ) Não ( 2 )

7- Comportamento da Doença:

- Inflamatória ( 1 )
- Estenosante ( 2 )
- Fistulizante ( 3 )

8- Cirurgia Intestinal.....

**APÊNDICE 2**  
**PLANILHA DE DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES**

Nº paciente	Idade (anos)	Sexo	Grupo Étnico	Idade de início DC	História familiar	Doença perianal	Localização da doença	Apresent. da doença	Cirurgia prévia
1	21	M	Euro-brasileiro	15	N	perianal	-	fistulizante	Sim
2	28	M	Euro-brasileiro	24	N	-	ileocolônica	inflamatória	-
3	25	M	Euro-brasileiro	15	N	perianal	ileal	fistulizante	-
4	31	M	Euro-brasileiro	20	2	-	ileocolônica	fistulizante	-
5	37	M	Euro-brasileiro	36	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	-
6	21	M	Euro-brasileiro	19	N	-	Trato GI alto	inflamatória	-
7	35	M	Euro-brasileiro	21	N	-	ileal	inflamatória	Sim
8	55	F	Euro-brasileiro	51	1	-	ileocolônica	inflamatória	-
9	44	F	Euro-brasileiro	39	N	-	ileocolônica	inflamatória	-
10	41	M	Euro-brasileiro	25	N	-	ileal	estenosante	Sim
11	27	M	Euro-brasileiro	16	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	-
12	35	F	Brasileiro	21	2	perianal	colônica	fistulizante	-
13	32	F	Euro-brasileiro	17	N	-	ileal	fistulizante	-
14	20	M	Asiático-brasileiro	7	N	perianal	ileal	fistulizante	-
15	20	M	Euro-brasileiro	14	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	-
16	39	F	Euro-brasileiro	30	N	-	ileocolônica	fistulizante	-
17	37	F	Brasileiro	32	N	perianal	ileal	fistulizante	-
18	53	F	Euro-brasileiro	46	N	perianal	-	fistulizante	-
19	49	F	Brasileiro	43	N	-	colônica	fistulizante	-
20	46	F	Brasileiro	26	N	-	ileal	fistulizante	Sim
21	39	M	Euro-brasileiro	34	1	-	ileal	fistulizante	Sim
22	44	M	Euro-brasileiro	34	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	-
23	27	M	Brasileiro	19	N	perianal	ileal	fistulizante	-
24	54	M	Euro-brasileiro	49	N	-	colônica	inflamatória	-
25	38	F	Euro-brasileiro	32	N	-	ileal	estenosante	Sim
26	44	F	Euro-brasileiro	22	N	perianal	colônica	estenosante	Sim
27	22	F	Euro-brasileiro	17	N	-	ileocolônica	inflamatória	-
28	27	M	Euro-brasileiro	23	N	perianal	colônica	fistulizante	-
29	33	M	Brasileiro	22	N	-	ileal	inflamatória	-
30	32	M	Brasileiro	22	N	-	ileocolônica	estenosante	Sim
31	33	M	Brasileiro	28	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	-
32	30	F	Brasileiro	26	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	-
33	33	F	Euro-brasileiro	20	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	Sim
34	21	M	Brasileiro	14	N	perianal	colônica	fistulizante	-
35	32	F	Brasileiro	24	N	perianal	colônica	fistulizante	-
36	61	M	Euro-brasileiro	59	N	-	colônica	inflamatória	-
37	35	M	Brasileiro	29	N	-	ileal	estenosante	Sim
38	35	F	Brasileiro	20	1	perianal	colônica	fistulizante	Sim
39	57	M	Brasileiro	54	N	-	ileal	estenosante	Sim
40	30	M	Brasileiro	27	N	perianal	ileocolônica	inflamatória	-
41	12	M	Brasileiro	10	N	-	ileal	estenosante	-
42	35	M	Brasileiro	24	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	Sim
43	72	M	Euro-brasileiro	40	N	-	ileocolônica	estenosante	Sim
44	22	M	Brasileiro	17	1	-	ileal	inflamatória	-
45	49	F	Brasileiro	46	N	-	colônica	inflamatória	-
46	40	M	Brasileiro	23	N	-	ileal	estenosante	Sim
47	43	F	Euro-brasileiro	29	N	perianal	ileal	fistulizante	-
48	31	F	Brasileiro	18	N	perianal	colônica	fistulizante	-
49	46	F	Euro-brasileiro	27	1	-	ileal	estenosante	Sim
50	27	M	Brasileiro	26	N	perianal	ileal	inflamatória	-
51	26	F	Brasileiro	22	N	-	ileal	inflamatória	-
52	47	F	Afro-brasileiro	41	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	-



Nº paciente	Idade (anos)	Sexo	Grupo Étnico	Idade de início DC	História familiar	Doença perianal	Localização da doença	Apresent. da doença	Cirurgia prévia
53	30	F	Brasileiro	22	N	-	ileal	fistulizante	-
54	54	M	Brasileiro	35	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	Sim
55	67	F	Euro-brasileiro	60	N	-	ileocolônica	estenosante	Sim
56	27	M	Brasileiro	15	N	-	ileocolônica	estenosante	-
57	36	F	Euro-brasileiro	27	N	perianal	colônica	fistulizante	-
58	24	M	Euro-brasileiro	21	N	-	ileal	estenosante	Sim
59	53	F	Brasileiro	30	1	-	ileal	inflamatória	-
60	46	F	Euro-brasileiro	37	N	-	ileal	estenosante	-
61	27	F	Euro-brasileiro	16	N	-	ileocolônica	estenosante	Sim
62	17	F	Brasileiro	15	2	-	ileal	inflamatória	-
63	30	F	Brasileiro	15	N	-	ileocolônica	estenosante	Sim
64	43	F	Brasileiro	39	N	perianal	ileal	fistulizante	-
65	25	F	Brasileiro	14	N	perianal	colônica	fistulizante	-
66	70	F	Euro-brasileiro	38	N	-	ileocolônica	estenosante	Sim
67	28	M	Euro-brasileiro	11	N	-	ileal	estenosante	Sim
68	40	F	Brasileiro	3	N	-	ileocolônica	estenosante	Sim
69	26	M	Brasileiro	12	N	perianal	colônica	fistulizante	Sim
70	49	M	Brasileiro	31	N	perianal	colônica	fistulizante	Sim
71	39	F	Brasileiro	29	N	perianal	ileal	fistulizante	Sim
72	38	M	Brasileiro	30	N	perianal	-	fistulizante	Sim
73	14	M	Euro-brasileiro	4	N	-	ileal	inflamatória	-
74	62	F	Brasileiro	57	N	perianal	colônica	inflamatória	-
75	40	M	Euro-brasileiro	37	N	-	ileal	inflamatória	-
76	42	F	Brasileiro	33	2	perianal	ileocolônica	inflamatória	-
77	41	F	Afro-brasileiro	25	N	-	ileal	estenosante	Sim
78	31	M	Euro-brasileiro	28	N	-	ileal	inflamatória	-
79	27	F	Brasileiro	23	N	-	ileal	inflamatória	-
80	62	F	Euro-brasileiro	56	N	-	ileal	estenosante	Sim
81	41	M	Brasileiro	17	N	perianal	colônica	fistulizante	-
82	33	M	Euro-brasileiro	15	N	perianal	colônica	fistulizante	Sim
83	34	F	Brasileiro	26	1	perianal	colônica	fistulizante	Sim
84	23	M	Euro-brasileiro	18	N	-	ileal	estenosante	Sim
85	56	M	Brasileiro	18	N	-	ileal	estenosante	-
86	37	F	Brasileiro	26	N	perianal	colônica	estenosante	Sim
87	51	M	Brasileiro	30	N	-	colônica	estenosante	Sim
88	34	M	Brasileiro	27	N	-	ileal	estenosante	Sim
89	22	F	Brasileiro	13	N	-	ileal	inflamatória	-
90	43	F	Brasileiro	35	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	-
91	18	M	Brasileiro	16	N	perianal	colônica	fistulizante	-
92	37	M	Brasileiro	25	N	perianal	ileal	fistulizante	-
93	28	F	Euro-brasileiro	22	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	Sim
94	27	F	Euro-brasileiro	18	N	-	ileal	inflamatória	-
95	26	M	Brasileiro	20	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	-
96	21	M	Asiático-brasileiro	14	N	-	colônica	inflamatória	-
97	36	M	Brasileiro	34	N	-	ileocolônica	fistulizante	Sim
98	57	F	Euro-brasileiro	30	N	-	ileal	inflamatória	-
99	16	F	Brasileiro	9	N	perianal	colônica	fistulizante	-
100	39	F	Brasileiro	20	N	-	ileocolônica	fistulizante	-
101	25	F	Brasileiro	11	N	perianal	ileal	fistulizante	Sim
102	19	M	Brasileiro	6	N	perianal	colônica	fistulizante	-
103	44	M	Brasileiro	24	N	perianal	ileal	fistulizante	-
104	28	M	Euro-brasileiro	26	N	-	ileocolônica	inflamatória	-

Nº paciente	Idade (anos)	Sexo	Grupo Étnico	Idade de início DC	História familiar	Doença perianal	Localização da doença	Apresent. da doença	Cirurgia prévia
105	31	M	Euro-brasileiro	22	N	-	colônica	estenosante	Sim
106	44	F	Euro-brasileiro	23	N	-	ileocolônica	estenosante	Sim
107	24	M	Brasileiro	16	N	-	ileocolônica	estenosante	Sim
108	37	M	Brasileiro	12	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	-
109	52	F	Brasileiro	48	N	-	ileal	inflamatória	-
110	32	M	Euro-brasileiro	29	1	-	ileal	inflamatória	-
111	40	M	Euro-brasileiro	35	N	-	ileocolônica	estenosante	Sim
112	22	F	Euro-brasileiro	13	N	perianal	ileal	estenosante	-
113	54	F	Euro-brasileiro	35	2	perianal	ileal	estenosante	Sim
114	21	M	Brasileiro	16	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	-
115	49	F	Euro-brasileiro	32	N	-	ileal	estenosante	-
116	39	F	Euro-brasileiro	30	N	perianal	ileal	fistulizante	-
117	32	F	Brasileiro	27	N	-	colônica	estenosante	-
118	19	M	Euro-brasileiro	16	1	perianal	ileal	fistulizante	-
119	42	F	Euro-brasileiro	30	N	-	ileocolônica	inflamatória	-
120	29	M	Euro-brasileiro	19	2	-	ileal	fistulizante	-
121	41	F	Brasileiro	23	N	-	ileal	fistulizante	Sim
122	43	F	Brasileiro	30	N	perianal	colônica	fistulizante	-
123	33	F	Euro-brasileiro	18	N	perianal	colônica	fistulizante	-
124	27	M	Euro-brasileiro	26	N	perianal	ileal	fistulizante	-
125	18	M	Asiático-brasileiro	9	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	-
126	37	M	Brasileiro	32	N	-	ileocolônica	inflamatória	-
127	23	M	Brasileiro	17	N	perianal	ileal	fistulizante	Sim
128	44	F	Brasileiro	8	N	perianal	ileocolônica	estenosante	Sim
129	55	F	Euro-brasileiro	40	N	perianal	colônica	estenosante	Sim
130	32	F	Brasileiro	27	N	-	ileocolônica	inflamatória	-
131	40	F	Brasileiro	23	N	-	ileal	inflamatória	-
132	34	M	Brasileiro	27	N	-	ileal	estenosante	Sim
133	29	M	Brasileiro	13	1	perianal	ileocolônica	estenosante	Sim
134	47	F	Brasileiro	23	1	-	ileal	estenosante	-
135	56	F	Euro-brasileiro	38	1	-	colônica	estenosante	Sim
136	26	M	Brasileiro	21	1	perianal	ileal	fistulizante	-
137	47	F	Brasileiro	46	N	-	colônica	inflamatória	-
138	36	F	Brasileiro	32	N	-	ileal	inflamatória	-
139	30	F	Brasileiro	27	1	-	colônica	inflamatória	-
140	36	F	Brasileiro	32	2	perianal	colônica	fistulizante	Sim
141	52	F	Ameríndio	50	N	-	Trato GI alto	estenosante	-
142	35	M	Brasileiro	25	N	perianal	colônica	estenosante	Sim
143	40	M	Brasileiro	35	N	perianal	colônica	fistulizante	-
144	27	M	Brasileiro	24	N	-	ileal	fistulizante	-
145	30	F	Brasileiro	27	N	perianal	colônica	fistulizante	Sim
146	34	F	Brasileiro	20	N	-	ileocolônica	estenosante	Sim
147	24	F	Euro-brasileiro	20	N	perianal	ileal	fistulizante	-
148	33	F	Euro-brasileiro	23	N	perianal	ileal	estenosante	Sim
149	33	M	Brasileiro	22	N	perianal	colônica	estenosante	-
150	36	F	Brasileiro	30	N	-	ileal	inflamatória	-
151	20	M	Euro-brasileiro	13	N	-	ileocolônica	inflamatória	-
152	39	M	Brasileiro	18	N	perianal	-	fistulizante	-
153	61	F	Brasileiro	59	N	-	ileocolônica	inflamatória	-
154	24	M	Euro-brasileiro	20	2	perianal	ileocolônica	estenosante	-
155	43	M	Euro-brasileiro	29	N	-	ileocolônica	fistulizante	Sim
156	26	M	Euro-brasileiro	15	N	-	ileocolônica	estenosante	Sim

Nº paciente	Idade (anos)	Sexo	Grupo Étnico	Idade de início DC	História familiar	Doença perianal	Localização da doença	Apresent. da doença	Cirurgia prévia
157	48	M	Euro-brasileiro	37	N	-	ileal	estenosante	Sim
158	31	F	Brasileiro	26	N	-	ileal	estenosante	Sim
159	30	F	Brasileiro	18	N	-	ileal	estenosante	Sim
160	65	M	Euro-brasileiro	58	N	-	ileal	inflamatória	-
161	41	F	Euro-brasileiro	20	N	perianal	ileal	fistulizante	-
162	29	F	Brasileiro	15	N	-	ileal	estenosante	Sim
163	40	F	Brasileiro	35	N	perianal	ileal	fistulizante	-
164	38	F	Brasileiro	29	1	-	ileal	estenosante	-
165	34	M	Euro-brasileiro	15	N	-	ileocolônica	estenosante	Sim
166	54	M	Euro-brasileiro	30	N	-	ileal	estenosante	Sim
167	40	M	Euro-brasileiro	15	N	-	ileocolônica	estenosante	Sim
168	18	M	Brasileiro	1	N	-	ileocolônica	fistulizante	Sim
169	17	M	Brasileiro	15	N	-	ileal	inflamatória	-
170	10	F	Brasileiro	5	N	-	colônica	inflamatória	-
171	10	M	Brasileiro	8	N	-	ileocolônica	inflamatória	-
172	16	M	Brasileiro	14	1	-	ileocolônica	inflamatória	-
173	10	F	Brasileiro	5	N	perianal	ileocolônica	fistulizante	-
174	20	M	Brasileiro	9	N	-	colônica	inflamatória	-
175	16	F	Brasileiro	1	N	-	ileocolônica	inflamatória	-
176	10	F	Brasileiro	8	1	-	ileocolônica	inflamatória	-
177	16	F	Brasileiro	9	N	-	ileocolônica	inflamatória	-
178	19	M	Brasileiro	5	N	-	ileocolônica	fistulizante	Sim
179	8	M	Brasileiro	5	N	-	ileocolônica	inflamatória	-
180	13	M	Brasileiro	11	N	-	colônica	inflamatória	-
181	21	F	Brasileiro	14	N	-	ileocolônica	fistulizante	-
182	12	F	Brasileiro	8	N	perianal	colônica	fistulizante	-
183	13	M	Brasileiro	10	N	-	colônica	inflamatória	-
184	12	M	Brasileiro	3	N	-	ileocolônica	inflamatória	-
185	17	F	Brasileiro	13	N	-	ileocolônica	estenosante	-
186	15	F	Brasileiro	11	N	-	ileocolônica	inflamatória	-
187	11	M	Brasileiro	8	N	-	colônica	inflamatória	-

**APÊNDICE 3**  
**PLANILHA DE PACIENTES PORTADORES DOS POLIMORFISMOS DOS**  
**GENES *CARD15* E *IL23R***

Nº Paciente	Polimorfismos/CARD15	Polimorfismos/IL23R
1	-	-
2	R702W	rs7517847
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	R702W	rs1495965
8	-	rs1495965
9	-	rs1495965
10	R702W	-
11	-	-
12	-	-
13	3020insC	rs1004819 / rs10889677
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	rs1495965 / rs10889677
19	-	-
20	R702W	-
21	-	-
22	-	rs1495965
23	-	-
24	-	rs1004819 / rs10889677
25	-	-
26	-	rs1495965
27	R702W	-
28	-	rs7517847
29	-	rs1004819 / rs1495965 / rs10889677
30	-	rs1004819 / rs10889677
31	-	-
32	-	-
33	-	-
34	-	rs7517847
35	-	-
36	-	rs1004819 / rs1495965 / rs10889677
37	R702W	rs7517847 / rs1495965
38	-	rs1004819 / rs10889677
39	-	-
40	-	-
41	G908R	-
42	-	rs7517847
43	-	-
44	R702W	-
45	-	-
46	-	-
47	-	rs1495965
48	-	-
49	-	-
50	G908R	-
51	-	-
52	-	-
53	-	rs7517847
54	-	-

Nº Paciente	Polimorfismos/CARD15	Polimorfismos/IL23R
55	-	-
56	-	-
57	3020insC	-
58	-	-
59	-	rs1495965
60	R702W	rs7517847
61	R702W	-
62	-	-
63	3020insC	-
64	-	-
65	R702W	-
66	3020insC / G908R	-
67	-	rs1495965
68	-	rs1004819 / rs1495965 / rs10889677
69	-	-
70	-	rs1495965
71	-	-
72	R702W	rs1004819 / rs1495965 / rs10889677
73	-	rs7517847
74	-	rs7517847
75	R702W	-
76	-	-
77	-	-
78	R702W	-
79	-	-
80	R702W	rs7517847
81	-	-
82	3020insC / R702W	rs1495965
83	-	rs1495965
84	R702W	-
85	-	rs1495965
86	-	-
87	-	rs1004819 / rs1495965
88	-	-
89	-	rs10889677
90	-	-
91	G908R	-
92	-	rs7517847
93	-	-
94	-	rs7517847
95	-	-
96	-	-
97	-	-
98	-	-
99	R702W	-
100	R702W	-
101	-	rs1495965
102	-	rs7517847
103	R702W	rs1004819
104	3020insC / R702W	-
105	R702W	rs7517847
106	-	-
107	-	-

Nº Paciente	Polimorfismos/CARD15	Polimorfismos/IL23R
108	-	-
109	-	-
110	-	rs7517847
111	G908R	rs1004819 / rs1495965 / rs10889677
112	-	rs1495965 / rs10889677
113	-	-
114	-	-
115	-	rs1004819 / rs1495965 / rs10889677
116	3020insC	rs7517847
117	-	-
118	-	rs7517847
119	-	-
120	R702W	-
121	-	-
122	-	rs1004819 / rs10889677
123	R702W	-
124	3020insC	-
125	-	-
126	-	rs7517847
127	R702W	-
128	3020insC / R702W	rs7517847
129	G908R	rs1495965
130	-	rs1004819
131	-	-
132	-	rs7517847
133	-	rs1495965
134	-	rs1495965
135	-	-
136	R702W	-
137	-	rs1004819 / rs1495965 / rs10889677
138	3020insC	rs1495965
139	-	rs7517847
140	-	rs7517847 / rs11209026
141	3020insC	rs7517847
142	-	rs1495965
143	R702W	rs1004819 / rs1495965 / rs10889677
144	-	rs1004819 / rs1495965 / rs10889677
145	-	rs1004819 / rs1495965 / rs10889677
146	-	rs1004819 / rs10889677
147	R702W	-
148	-	-
149	-	-
150	R702W	-
151	-	rs7517847
152	R702W	rs1004819 / rs1495965 / rs10889677
153	-	rs1495965
154	-	-
155	-	-
156	R702W	-
157	-	-
158	-	-
159	-	rs7517847
160	-	rs1004819

Nº Paciente	Polimorfismos/ <i>CARD15</i>	Polimorfismos/ <i>IL23R</i>
161	3020insC / R702W	rs1495965
162	R702W	-
163	-	-
164	-	-
165	R702W	-
166	-	rs1004819 / rs1495965
167	R702W	-
168	-	-
169	-	rs7517847
170	-	rs1495965
171	-	-
172	G908R	rs1495965
173	-	rs1495965
174	-	rs7517847
175	-	-
176	-	rs1495965
177	-	-
178	R702W	rs1004819
179	-	rs1004819 / rs10889677
180	-	-
181	-	-
182	-	-
183	-	rs7517847
184	-	-
185	-	-
186	-	-
187	3020insC	rs1495965 / rs10889677



**APÊNDICE 4**  
**GENOTIPAGEM DOS POLIMORFISMOS DO GENE *IL23R***

Pacientes	rs1004819	rs7517847	rs11209026	rs1495965	rs10889677
1	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
2	C/C	G/G	G/G	A/G	A/C
3	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
4	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
5	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
6	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
7	C/T	G/T	G/G	G/G	A/C
8	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
9	C/T	G/T	G/G	G/G	A/C
10	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
11	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
12	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
13	T/T	T/T	G/G	A/G	A/A
14	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
15	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
16	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
17	?	G/T	?	?	?
18	C/T	G/T	G/G	G/G	A/A
19	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
20	C/T	T/T	G/G	A/A	A/C
21	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
22	C/C	T/T	G/G	G/G	C/C
23	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
24	T/T	T/T	G/G	A/G	A/A
25	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
26	C/C	G/T	G/G	G/G	A/C
27	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
28	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
29	T/T	G/T	G/G	G/G	A/A
30	T/T	T/T	G/G	A/G	A/A
31	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
32	C/T	G/T	G/G	A/G	C/C
33	C/T	G/T	G/G	?	?
34	C/C	G/G	A/G	A/A	C/C
35	C/C	G/T	G/G	?	?
36	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
37	C/C	G/G	G/G	G/G	C/C
38	T/T	T/T	G/G	A/G	A/A
39	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
40	C/C	G/T	G/G	A/G	A/C
41	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
42	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
43	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
44	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
45	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
46	C/T	G/T	G/G	A/A	A/C
47	C/C	G/T	G/G	G/G	C/C
48	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
49	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
50	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C

51	C/C	?	G/G	?	C/C
52	?	G/T	?	?	?
53	?	G/G	?	?	?
54	C/C	?	G/G	A/G	C/C
55	C/C	G/T	G/G	?	C/C
56	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
57	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
58	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
59	C/C	G/T	G/G	G/G	C/C
60	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
61	C/T	G/T	G/G	A/A	A/C
62	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
63	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
64	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
65	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
66	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
67	C/C	T/T	G/G	G/G	C/C
68	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
69	?	G/T	G/G	?	?
70	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
71	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
72	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
73	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
74	C/C	G/G	A/G	A/G	C/C
75	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
76	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
77	C/T	T/T	G/G	A/G	C/C
78	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
79	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
80	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
81	C/T	G/T	G/G	A/A	A/C
82	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
83	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
84	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
85	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
86	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
87	T/T	T/T	G/G	G/G	A/C
88	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
89	C/T	G/T	G/G	A/G	A/A
90	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
91	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
92	C/C	G/G	G/G	A/G	C/C
93	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
94	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
95	C/C	G/T	G/G	A/A	A/C
96	C/C	?	G/G	A/G	C/C
97	C/T	?	G/G	A/G	C/C
98	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
99	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
100	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
101	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
102	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C

103	T/T	T/T	G/G	A/G	A/C
104	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
105	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
106	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
107	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
108	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
109	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
110	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
111	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
112	C/T	G/T	G/G	G/G	A/A
113	C/T	G/T	G/G	A/A	A/C
114	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
115	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
116	C/C	G/G	G/G	A/G	C/C
117	C/T	T/T	G/G	A/G	C/C
118	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
119	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
120	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
121	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
122	T/T	T/T	G/G	A/G	A/A
123	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
124	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
125	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
126	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
127	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
128	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
129	C/T	T/T	G/G	G/G	C/C
130	T/T	T/T	G/G	A/G	A/C
131	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
132	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
133	C/C	G/T	G/G	G/G	C/C
134	C/T	G/T	G/G	G/G	A/C
135	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
136	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
137	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
138	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
139	C/C	G/G	A/G	A/A	C/C
140	C/C	G/G	A/A	A/A	C/C
141	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
142	C/T	G/T	G/G	G/G	A/C
143	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
144	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
145	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
146	T/T	T/T	G/G	A/G	A/A
147	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
148	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
149	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
150	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
151	C/C	G/G	G/G	A/G	C/C
152	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
153	C/C	T/T	G/G	G/G	C/C
154	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C

155	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
156	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
157	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
158	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
159	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
160	T/T	T/T	G/G	A/G	C/C
161	C/T	G/T	G/G	G/G	C/C
162	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
163	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
164	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
165	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
166	T/T	?	G/G	G/G	A/C
167	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
168	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
169	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
170	C/C	G/T	G/G	G/G	C/C
171	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
172	C/C	G/T	G/G	G/G	C/C
173	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
174	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
175	C/C	G/T	A/G	A/G	C/C
176	C/C	G/T	G/G	G/G	C/C
177	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
178	T/T	T/T	G/G	A/G	A/C
179	T/T	T/T	G/G	A/G	A/A
180	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
181	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
182	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
183	C/C	G/G	A/G	A/A	C/C
184	C/T	G/T	A/G	A/G	A/C
185	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
186	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
187	C/T	G/T	G/G	G/G	A/A

Controles	rs1004819	rs7517847	rs11209026	rs1495965	rs10889677
1	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
2	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
3	C/T	G/T	G/G	G/G	A/C
4	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
5	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
6	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
7	C/T	?	?	?	?
8	C/C	G/G	G/G	A/G	A/C
9	C/T	G/T	G/G	G/G	A/A
10	C/T	T/T	G/G	A/G	C/C
11	C/C	?	G/G	G/G	C/C
12	C/C	?	G/G	A/A	C/C
13	C/T	?	?	?	C/C
14	T/T	T/T	G/G	A/G	A/A
15	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
16	C/T	G/G	G/G	A/A	A/C
17	C/C	G/T	G/G	A/G	A/C
18	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
19	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
20	C/C	G/G	G/G	A/G	C/C
21	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
22	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
23	C/C	G/G	G/G	A/G	C/C
24	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
25	C/C	G/G	G/G	G/G	A/A
26	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
27	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
28	C/C	G/G	G/G	A/G	C/C
29	C/T	G/T	G/G	A/G	C/C
30	C/C	G/G	G/G	A/G	C/C
31	C/C	G/T	A/G	A/G	C/C
32	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
33	C/C	G/G	A/G	A/A	C/C
34	C/C	G/G	A/G	A/A	A/C
35	C/C	G/T	G/G	A/G	A/C
36	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
37	C/C	G/G	A/G	A/G	C/C
38	C/T	G/T	G/G	A/G	C/C
39	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
40	C/C	G/G	G/G	A/G	C/C
41	C/C	G/T	G/G	A/A	A/C
42	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
43	C/T	G/T	G/G	A/A	A/C
44	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
45	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
46	T/T	T/T	G/G	A/G	A/C
47	C/C	?	G/G	A/G	C/C
48	C/C	T/T	A/G	A/A	C/C
50	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
51	C/C	G/T	G/G	A/G	A/C
52	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C

53	C/T	G/T	G/G	A/G	C/C
54	C/C	G/G	A/G	A/G	C/C
55	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
56	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
57	C/C	G/T	A/G	A/A	C/C
58	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
59	C/T	G/T	A/G	A/G	A/C
60	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
61	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
62	C/T	G/T	G/G	A/G	A/A
63	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
64	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
65	C/C	G/G	G/G	A/G	C/C
66	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
67	C/C	T/T	G/G	G/G	C/C
68	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
69	C/C	G/T	G/G	G/G	A/C
70	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
71	C/T	G/T	G/G	A/A	A/C
72	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
73	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
74	C/T	T/T	G/G	A/G	C/C
76	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
77	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
78	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
79	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
80	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
81	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
82	C/T	G/T	G/G	G/G	C/C
83	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
84	C/C	G/T	G/G	A/G	A/C
85	C/C	G/T	A/G	A/A	C/C
86	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
87	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
88	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
89	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
90	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
91	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
92	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
93	C/C	G/G	A/G	A/A	C/C
94	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
95	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
96	C/C	G/G	G/G	A/G	C/C
97	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
98	C/C	T/T	G/G	G/G	C/C
99	C/T	G/T	G/G	A/A	A/C
100	C/T	G/T	A/G	A/G	A/C
101	C/T	G/T	G/G	A/G	C/C
102	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
103	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
104	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
105	C/C	G/G	G/G	A/G	C/C

106	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
107	C/T	?	G/G	G/G	A/C
108	C/T	G/T	G/G	A/A	C/C
109	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
110	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
111	C/T	?	?	?	?
112	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
113	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
114	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
115	C/C	T/T	G/G	G/G	C/C
116	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
117	T/T	T/T	G/G	A/G	A/C
118	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
119	C/T	T/T	G/G	G/G	C/C
120	C/C	G/G	?	A/A	C/C
121	C/C	T/T	G/G	A/G	A/C
122	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
123	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
124	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
125	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
126	C/C	G/G	A/G	A/A	C/C
127	C/C	G/G	A/G	A/A	C/C
128	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
129	C/C	G/T	G/G	A/G	A/C
130	C/T	T/T	G/G	A/G	C/C
131	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
132	C/C	G/T	?	A/A	C/C
133	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
134	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
135	C/C	T/T	G/G	G/G	C/C
136	C/T	G/T	A/G	A/A	A/C
137	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
138	C/T	T/T	A/G	A/G	C/C
139	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
140	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
141	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
142	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
143	C/C	G/T	A/G	A/A	C/C
144	C/C	G/T	?	G/G	C/C
145	C/T	G/T	G/G	A/G	C/C
146	C/C	G/G	G/G	A/G	C/C
147	C/T	G/T	G/G	A/G	A/A
148	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
149	C/T	G/T	G/G	A/A	C/C
150	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
151	C/C	G/T	G/G	G/G	A/C
152	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
153	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
154	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
155	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
156	C/C	G/T	?	A/A	C/C
157	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C



158	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
159	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
160	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
161	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
162	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
163	C/T	G/T	G/G	A/G	C/C
164	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
165	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
166	C/T	G/T	G/G	G/G	A/C
167	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
168	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
169	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
170	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
172	C/T	G/T	G/G	A/G	C/C
173	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
174	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
175	C/C	G/T	A/G	A/G	C/C
176	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
177	C/T	G/T	G/G	A/G	C/C
178	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
179	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
180	C/C	T/T	G/G	A/G	A/C
181	C/T	G/T	A/G	A/G	A/C
182	C/T	T/T	G/G	G/G	A/A
183	C/C	G/T	G/G	A/G	A/C
184	T/T	T/T	G/G	A/G	A/A
185	C/C	G/G	A/G	A/A	A/C
186	C/T	G/T	A/G	G/G	A/C
187	C/C	G/T	G/G	A/G	A/C
188	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
189	C/C	G/G	A/A	A/G	C/C
190	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
191	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
192	C/T	T/T	A/G	A/G	C/C
193	C/T	G/G	G/G	A/A	A/C
194	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
195	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
196	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
197	C/C	G/T	G/G	A/G	A/C
198	C/T	G/T	G/G	A/G	A/A
199	C/T	G/T	G/G	G/G	A/C
200	C/C	G/T	G/G	A/A	C/C
201	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
202	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
203	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
204	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
205	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
206	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
207	C/T	G/T	G/G	A/A	C/C
208	C/T	G/T	G/G	A/G	C/C
209	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
210	C/T	G/T	G/G	A/G	A/A

211	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
212	C/C	G/G	A/G	A/A	C/C
213	C/C	G/T	A/G	A/A	C/C
214	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
215	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
216	C/C	T/T	G/G	A/G	C/C
217	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
218	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
219	C/C	G/G	G/G	A/A	A/C
220	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
221	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
222	C/C	G/G	G/G	A/G	A/C
223	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
224	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
225	T/T	T/T	G/G	G/G	A/A
226	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
227	C/T	G/T	G/G	A/G	A/C
228	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
229	C/C	G/G	G/G	G/G	C/C
230	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
231	C/T	?	G/G	A/G	A/C
232	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
233	T/T	T/T	G/G	A/G	A/C
234	C/T	G/T	A/G	A/A	C/C
235	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
236	C/T	G/T	G/G	A/A	A/C
237	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
238	C/T	T/T	G/G	A/G	A/C
239	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
240	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
241	C/C	G/G	G/G	A/G	C/C
242	C/C	T/T	G/G	A/A	C/C
243	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
244	C/T	T/T	G/G	A/G	C/C
245	C/C	G/G	G/G	A/G	A/C
246	C/C	G/G	A/G	A/A	C/C
247	C/T	T/T	G/G	G/G	A/C
248	C/T	?	?	?	?
249	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
250	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
251	C/C	G/T	G/G	A/G	C/C
252	C/C	G/G	G/G	A/A	C/C
253	C/C	G/T	A/G	A/G	C/C
254	C/T	T/T	G/G	A/G	C/C

**APÊNDICE 5**  
**APRESENTAÇÃO E PREMIAÇÃO EM CONGRESSO INTERNACIONAL**



**CERTIFICATE OF ATTENDANCE**

**This certifies that**

**Marcia Luiza Baptista, MD**

**Attended the 20<sup>th</sup> Annual North American Society  
for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition**

Annual Meeting & Postgraduate Course

Single Topic Symposium

**Salt Lake City, UTAH  
October 24-27, 2007**

Márcia Baptista

Dear Dr. Baptista:

Congratulations! Your abstract entitled "CARD15 AND IL23R INFLUENCE IN SUSCEPTIBILITY OF CROHN'S DISEASE BUT NOT DISEASE PHENOTYPE IN A BRAZILIAN POPULATION" has been selected to receive a NASPGHAN Travel Award to the 20th

Annual Meeting to be held in Salt Lake City, UT, October 25-27, 2007. NASPGHAN will cover your hotel, round trip economy travel and registration expenses for the meeting.

You will be automatically registered for the Annual Meeting and Postgraduate Course. Please complete the attached travel and housing forms so that we can make these arrangements for you. The travel form should be faxed directly to Travel Source. The housing form should be faxed or emailed to the NASPGHAN National Office. These forms should be completed no later than September 1, 2007.

You will also be requested to attend the international committee reception, to be scheduled, for recognition of your abstract.

Congratulations again, and I look forward to seeing you in Salt Lake in October!

Sincerely,

Edward Hoffenberg, MD  
Chair, NASPGHAN International Relations Committee

**APÊNDICE 6**  
**PUBLICAÇÃO INTERNACIONAL**

## CARD15 and IL23R Influences Crohn's Disease Susceptibility But Not Disease Phenotype in a Brazilian Population

Márcia Luiza Baptista, MD,\* Heda Amarante, MD,<sup>†</sup> Geraldo Picheth, BA,<sup>‡</sup> Vera Lucia Sdepanian, MD, PhD,<sup>§</sup> Nicholas Peterson, BS,<sup>¶</sup> Umesh Babasukumar, BA,<sup>¶</sup> Hermênio C. Lima, MD, PhD<sup>||</sup> and Subra Kugathasan, MD<sup>¶</sup>

**Background:** Although many genetic variants are identified in association with Crohn's disease (CD), *CARD15*, *IL23R*, and *ATG16L1* association with CD have been firmly confirmed in Caucasians of European ancestry. The prevalence of CD is rapidly rising in Brazil, where European ancestry is firmly admixed with natives, resulting in a heterogeneous population. We investigated the contribution of *CARD15*, *IL23R*, and *ATG16L1* with CD risk in a heterogeneous Brazilian population.

**Methods:** Genotyping for *CARD15* (*R702W*, *G908R*, *3020insC*), *IL23R* (*rs1004819*, *rs7517847*, *rs11209026*, *rs10889677*), and *ATG16L1* (*rs2241880*) was performed in 187 children and adults with CD and 255 healthy ethnically matched controls. Clinical records were systematically reviewed and detailed phenotypic information was obtained.

**Results:** At least 1 *CARD15* risk allele was present in 30% of the CD patients compared with 10% of controls. Variants of *CARD15* (*3020insC* and *R702W*) and *IL23R* (*rs1004819*, *rs1495965*, *rs11209026*, and *rs1088967*) were associated with CD. However, no genotype–phenotype correlations were found among the Brazilian CD population with *CARD15* or *IL23R* variants. No significant association was achieved with *ATG16L1*.

**Conclusions:** *CARD15* and *IL23R* confer susceptibility to CD in the Brazilian population. However, the presence of these variants did not influence disease phenotype. Further research should be

focused on larger sample sizes with population admixture analysis to better understand the risks and genotype–phenotype correlation in populations like Brazil where the prevalence of CD is rapidly rising.

(*Inflamm Bowel Dis* 2008;00:000–000)

**Key Words:** *CARD15*, *IL23R*, *ATG16L1*, single nucleotide polymorphism (SNP), genotype phenotype

Crohn's disease (CD) is a chronic inflammatory disorder potentially involving any part of the gastrointestinal tract. The current working hypothesis for the etiology of CD emphasizes genetic predispositions to deregulation of the immune response driven by the presence of normal luminal flora.<sup>1</sup> Although replicated associations from independent genomewide linkage studies demonstrate several predisposing genes to CD, the identification of *CARD15* (caspase recruitment domain 15) as the first susceptibility gene for inflammatory bowel disease (IBD) on chromosome 16 (16q12) has been considered a major step in understanding CD pathophysiology.<sup>2–4</sup> More recently, 2 independent groups have newly reported susceptible genes by the whole genome association study (WGA). The first group found a highly significant association between CD and the *IL23R* gene on chromosome 1p31, which encodes a subunit of the receptor for the proinflammatory cytokine interleukin (IL)-23.<sup>5</sup> The second gene identified was the *ATG16L1* (autophagy-related 16-like 1) located on chromosome 2.<sup>6</sup>

The *CARD15* gene has been considered as belonging to a new class of intracellular pattern recognition receptors that belong to the family of nucleotide binding and oligomerization domain (NOD)-like receptors and is expressed in monocytes, macrophages, and Paneth cells. It functions as a sensor for bacterial components including the peptidoglycan muramyl dipeptide through the leucine-rich repeat (LRR) domain located in the C-terminal region of the protein. It has been suggested that sensing bacterial components under normal circumstances results in activating the nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway and apoptosis.<sup>1,4,7</sup> Three single-nucleotide polymorphisms (SNPs) within the *CARD15* gene, including 2 missense variants (*R702W* and *G908R*) and an insertion mutation at nucleotide 3020 (*3020insC*), were shown to be independently associated with CD and may

Received for publication November 19, 2007; Accepted November 21, 2007.

From the \*Department of Internal Medicine, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, <sup>†</sup>Department of Gastroenterology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, <sup>‡</sup>Department of Biochemistry, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, <sup>§</sup>Department of Pediatric Gastroenterology, Federal University of São Paulo, SP, <sup>||</sup>Department of Medical Pathology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, <sup>¶</sup>Department of Pediatrics, Medical College of Wisconsin, Milwaukee, Wisconsin.

The last two are joint senior authors.

Reprints: Subra Kugathasan, Department of Pediatrics, Medical College of Wisconsin and Children's Research Institute, 8701 Watertown Plank Rd., Milwaukee, WI (e-mail: skuga@mcw.edu) or Marcia Luiza Baptista, Department of Internal medicine Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil (e-mail: marciabaptista@hotmail.com).

Copyright © 2008 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1002/ibd.20372

Published online 00 Month 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

result in distinct phenotypic expressions of the disease.<sup>9–19</sup> The accession numbers of these SNPs from the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI) correspond to rs17860491, rs2066845, and rs5743293 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>).

The recent discovery of the association of *IL23R* gene variants with CD has made the role of IL-23 in gut regulating immunity increasingly evident. IL-23 is a new member of the IL-12 heterodimeric cytokine family, and it is expressed on the surface of macrophages and dendritic cells and may thereby control barrier function and immune response against the commensal microflora in the gut. It shares the common p40 subunit and IL-12R $\beta$ -1 receptor with IL-12. But in contrast to IL-12, IL-23 activates a subset of T cells characterized by the production of the cytokine IL-17.<sup>20,21</sup> Several markers in the *IL23R* gene and a single marker in the intergenic region between *IL23R* and the adjacent interleukin 12 receptor, beta-2 gene (*IL-12R $\beta$ -2*), have recently demonstrated a positive association with CD.<sup>5</sup> Emphasizing role of IL-23 in regulating gut immunity has prioritized this molecule and associated the signaling pathways as potential therapeutic targets in IBD.<sup>5,20</sup>

*ATG16L1* is part of a family of genes involved in autophagy, a biological process involved in protein degradation, antigen processing, regulation of cell signaling, and many other pathways essential to the initiation and regulation of the inflammatory response. The association of the *ATG16L1* gene with CD suggests that autophagy is likely to have an important role in disease pathogenesis.<sup>22</sup>

The prevalence of CD in Brazil is not well documented but some studies suggested that CD has been increasing in the Brazilian population, following the trend observed in many Western populations.<sup>23,24</sup> To investigate a possible role of these candidate genes, *CARD15*, *IL23R*, and *ATG16L1* loci, in the pathogenesis of CD development of Brazilian patients we assessed the distribution of 9 selected markers and examined the genotype–phenotype analysis.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Design

We determined the genotype and allele frequencies of 9 selected markers of the *CARD15*, *IL23R*, and *ATG16L1* genes and tested for CD association in patients attending the IBD Clinics at 2 university hospitals (130 from Federal University of Paraná, Curitiba, PR, and 20 from Federal University of São Paulo, São Paulo, SP), and 1 private clinic specializing in the treatment of CD (37 patients). A case-control design was used for the association studies with *CARD15*, *IL23R*, and *ATG16L1* gene polymorphisms.

### Patients

In all, 187 patients, including pediatric and adult patients (94 male and 93 female), with a definite diagnosis of

CD were enrolled to participate in this study. The diagnosis of CD was confirmed by clinical, radiologic, endoscopic, and histologic analysis according to the criteria of Lennard-Jones.<sup>25</sup> Patients with indeterminate colitis were excluded from the study. Controls ( $n = 255$ ) were nonfamilial blood donors matched by age, gender, and ethnicity at Federal University of Paraná.

Due to the existence of strong regional ethnic heterogeneity among the Brazilian population, it must be noted that our study population originated from the Paraná and São Paulo states. These states are located in the southern and southeast regions of Brazil, where an overwhelming majority of Europeans immigrated from Italy, Germany, Poland, and Ukraine in the past.

A written informed consent was obtained from all participants involved in the study. The Committee for Ethics in Human Research of the Federal University of Paraná approved this study.

### Phenotyping

Each participant's demographic and clinical data were obtained through a questionnaire and review of medical records. Extracted clinical information included date of birth, gender, age at disease onset, ethnicity, family history of IBD, disease location, disease behavior, and surgical interventions if any. Ethnicity was defined based on a detailed questionnaire of each patient and control. Subjects that denied any genetic admixture background in their families until the fourth generation were denominated as the Brazilian subgroup, despite the ethnical diversity recognition that has been known in Brazil. Family history was defined as having at least 1 first- or second-degree relative with CD. Disease location was classified into 5 subgroups based on extent of disease at the time of most recent follow-up: 1) ileal: gross involvement of the ileum without colonic disease but could include upper-tract involvement; 2) colonic: gross involvement limited to the colon or rectum; 3) ileocolonic: gross involvement of the ileum and colon but could include any upper-tract involvement; 4) disease confined to upper gastrointestinal tract involvement only; and 5) perianal involvement: perianal disease was considered with the clinical findings of perianal fistulas, perianal abscesses, but not perianal fissures or perianal tags (this was considered a separate category and could occur with any other site). Disease behavior was categorized by clinical history of fistulizing, stricturing, or inflammatory disease behavior according to Vienna classification guidelines. Fistulizing or penetrating disease was defined as the presence of intraabdominal fistulizing lesions (the presence of enteroenteric fistulas) or perianal fistulizing lesions (enterocutaneous). When significant strictures were concurrently present demonstrated by radiology or was present in the past (such as those required surgery), behavior was classified as the stricturing (fibrostenosing) phenotype.



Patients with nonstricturing and nonfistulizing disease were classified as having inflammatory disease behavior.

### Genotype Analysis

Blood was collected in EDTA tubes by venipuncture from all participants. DNA from whole blood was extracted from peripheral blood samples using the standard salting-out protocol at the Federal University of Paraná Immunogenetics Laboratory. Deidentified DNA samples were sent to the Medical College of Wisconsin for *CARD15*, *IL23R*, and *ATG16L1* polymorphisms genotyping. Both patients and controls were genotyped for the 3 main variants of the *CARD15* gene, R702W (exon 4, SNP8), G908R (exon 8, SNP12), and 3020insC (exon 11, SNP13); for 5 SNPs of the *IL23R* gene, rs1004819 (intron 5), rs7517847 (intron 6), rs11209026 (exon 8), rs1495965 (intergenic), and rs10889677 (exon 11-3'UTR); and for 1 SNP of the *ATG16L1* gene, rs2241880 (exon 9). All sequencing reactions were run on ABI Taqman Assays-by-Design technology using the ABI 7900HT automated sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### Statistical Analysis

The frequencies for the *CARD15*, *IL23R*, and *ATG16L1* genes polymorphisms were estimated by calculating gene and sample proportions. Allele frequencies were compared between cases and controls using Fisher's exact test or chi-square test as appropriate. The association between a given genotype and phenotypic characteristics of CD was estimated by the odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI). To assess the influence of *CARD15*, *IL23R*, or *ATG16L1* gene polymorphisms on the course of CD, subjects were classified as carriers or noncarriers of the variant alleles at both polymorphic loci. A chi-square test or Fisher's exact test was used for the comparison of carriers and noncarriers. Logistic regression analysis was performed to assess whether *CARD15*, *IL23R*, and *ATG16L1* gene variants were correlated with a particular clinical phenotype. The multiple logistic regression analyses and stepwise regression were adjusted for demographic and clinical data. A 1-tailed *P*-value  $\leq 0.05$  was considered significant. Statistical analysis was performed using the JMP Package (SAS) v. 6.0 (Cary, NC).

## RESULTS

In all, 187 CD patients were included. Their median age at the time of the study was 33 years (mean 33.94, range 8–72 years), and the median age of the disease onset was 23 years (mean 23.97, range 1–60 years). According to the ethnic classification used in this study we had 58.8% patients in the Brazilian subgroup, 36.9% patients that shared a family history of common European ancestry, the European-Brazilian subgroup, and we also had 3 Asian-Brazilian, 3 Amerindian-

TABLE 1. Clinical Features of CD Patients

Clinical Features	Total n (%)
Sex	
Male	94 (50%)
Female	93 (49.7%)
Age at disease onset	
$\leq 20$ years	80 (42.8%)
$>20 \leq 40$ years	91 (48.7%)
$>40$ years	16 (8.5%)
Positive family history	25 (13.4%)
Location of the disease	
Ileum only	72 (38.5%)
Colon only	44 (23.5%)
Ileum and colon	61 (32.6%)
Upper gastrointestinal tract (including microscopic)	2 (1.1%)
Perianal affect	76 (40.6%)
Disease behavior	
Inflammatory	54 (28.9%)
Stricturing	38 (20.3%)
Fistulizing	95 (50.8%)
Need for surgery	67 (35.8%)

Brazilian, and 2 Afro-Brazilian CD patients. Table 1 shows patient clinical features.

The genotype frequencies met Hardy-Weinberg equilibrium expectations in all groups except for the polymorphism Arg381Gln (rs11209026) in the *IL23R* gene. This polymorphism for the Crohn's group had a significant deviation ( $P = 0.0016$ ). This result reflected the sample size and the presence of only 1 individual homozygous for the rare allele in this group.

### CARD15 Genotypes

The risk alleles R702W and 3020insC showed statistical significance for CD susceptibility ( $P < 0.0001$ ,  $P < 0.0042$ , respectively), whereas the G908R failed to reach significant association (Table 2). A total of 27.3% patients with CD carried a single copy of a *CARD15* risk allele and 2.6% carried 2 risk alleles. At least 1 variant of risk was present in 30% of patients compared to 10% in controls (OR = 3.27, 95% CI 2.01–5.33,  $P < 0.0001$ ). Five patients with CD were compound heterozygous, with an allele frequency of 1.33%. No compound heterozygous or homozygous for risk alleles were seen in the controls.

### IL23R Genotypes

Five independently associated markers for the *IL23R* gene, rs1004819, rs7517847, rs11209026, rs1495965, and rs10889677 were investigated in 187 patients and 251 con-

**TABLE 2.** Genotypes and Allele Frequencies (AF) for CARD15, IL23R and ATG16L1 Polymorphisms for Patients with Crohn's Disease (CD) and Controls

Gene	Polymorphisms	Genotypes		Minor Allele FA (%)		P-value <sup>a</sup>	Odds Ratio (95% CI) <sup>b</sup>	
		CD	Controls	CD	Controls			
<i>CARD15</i>	R702W			9.63	2.75	<0.0001	3.77 (2.00–(7.10))	
	T/T	0	0					
	C/T	36	14					
		C/C	151	241			0.730	1.20 (0.43–(3.33))
	G908R			1.93	1.64			
	C/C	0	0					
		G/C	7	8			0.004	4.56 (1.47–(14.08))
		G/G	180	247				
	3020insC			3.48	0.78			
	C/C	0	0			0.009	0.36 (0.16–(0.81))	
	–/C	13	4					
	–/–	174	251					
<i>IL23R</i>	rs1004819			32.8	25.1	0.013	1.46 (1.08–(1.96))	
	T/T	24	13					
	C/T	72	100					
		C/C	87	138			0.753	0.96 (0.73–(1.26))
	rs75177847			41.5	42.6			
	G/G	28	43					
		T/G	95	120			0.009	0.36 (0.16–(0.81))
		T/T	59	79				
	rs11209026			2.2	5.8			
		A/A	1	1			0.104	1.25 (0.95–(1.65))
		G/A	6	26				
		G/G	177	216				
		rs1495965			48.3	42.7	0.036	1.38 (1.02–(1.86))
		G/G	41	38				
		A/G	91	135				
	A/A	47	74			0.036	1.38 (1.02–(1.86))	
rs10889677			31.5	25.0				
A/A	22	17						
	C/A	70	90			0.200	0.80 (0.59–(1.34))	
	C/C	89	141					
<i>ATG16L1</i>	rs2241880			48.3	54.0	0.200	0.80 (0.59–(1.34))	
	A/A	40	57					
	G/A	94	90					
	G/G	46	42					

<sup>a</sup>P-value (chi-square test) for allele frequencies.<sup>b</sup>Odds ratio for the minor allele.

trols and the findings are given in Table 2. The strongest association was observed at the nonsynonymous SNP rs11209026 encoding amino acid change Arg381Gln, where

the frequency of the A allele was 2.2% in CD compared with 5.8% in controls ( $P = 0.009$ ), and the OR for this protective allele was 0.36 (95% CI, 0.16–0.81). Significant associations

were also found with the SNPs *rs1004819* ( $P = 0.013$ ) and *rs10889677* ( $P = 0.036$ ).

A total of 13.5% of CD patients showed 2 or 3 associated *IL23R* markers, while only 6% of controls showed an association (OR = 2.42, 95% CI 1.24–4.74,  $P = 0.0079$ ). Several association tests were performed to identify combined risk variants. These tests show the association between *rs1004819* and *rs10889677* as the most significant combined risk alleles (OR = 4.84, 95% CI 0.99–23.57,  $P = 0.03$ ).

#### ATG16L1 Genotypes

The association between CD and nonsynonymous SNP in *ATG16L1* (*rs2241880*, the T300A variant) was also performed (Table 2). While the allele frequencies are consistent with published reports with a  $P$  value trend ( $P = 0.2$ ), no significant differences were obtained when comparing cases with controls.

#### CARD1 and IL23R Genotype-Phenotype Correlations

Correlation between genotype (for both *CARD15*, *IL23R*) and clinical features (disease location, surgery rate, or behavior) did not show any significant associations (data not shown). Similarly, the age of onset also did not have any effect. No significant differences were found between patient subgroups with early age of onset ( $\leq 20$ ), compared with medium age of onset ( $>20$ ,  $\leq 40$ ), and older age of onset ( $>40$ ). Three of the 5 compound heterozygous of the *CARD15* gene patients had an early age of onset. When the contribution of the *CARD15* and *IL23R* variants were investigated with respect to the ethnic subgroups, we did not find any significant association, only a trend of association with the 3020insC risk allele (OR = 2.96, 95% CI 0.92–9.45,  $P = 0.0559$ ) with the subgroup of European/Brazilian CD patients.

### DISCUSSION

Genomewide linkage studies and genomewide association studies have revealed a number of putative IBD-susceptibility loci, suggesting that several genes are involved in CD predisposition.<sup>5,6,22</sup> The 2 most significant loci with multiple SNPs significantly associated with CD also confirmed without any doubt correspond to *CARD15* and *IL23R* genes.<sup>3,5,22</sup> A recent study revealed another contributing influence of the *ATG16L1* gene associated with susceptibility to CD.<sup>6,22</sup> To our knowledge, no genetic studies have been reported assessing the *CARD15*, *IL23R*, and *ATG16L1* risk among CD in Brazil or even in South America. This study is the first analysis of genetic susceptibility to CD in a Brazilian CD population, and shows the contribution of the *CARD15*, *IL23R*, and *ATG16L1* variants in pediatric and adult CD patients.

The R702W frequency observed in our Brazilian CD patients (9.62%) is consistent with those generally reported in

European populations. In the present study the frameshift mutation 3020insC showed a decreased allele frequency (3.47%), compared with the range of 6%–16% in the majority of study populations in Europe and North America.<sup>8–19</sup> Nevertheless, studies from Finland, Spain, and Scotland populations have also reported similar low allele frequencies for 3020insC.<sup>13,14,18</sup> We found the *CARD15* carriage frequency of these 3 polymorphisms (30.0%) to be comparable with the overall allele frequency described in Caucasian populations ranging from 25%–45%.<sup>8–11,13–19</sup> Compound heterozygotes were found in only a small fraction of CD patients (2.8%), and a substantiating trend of greater severity of disease was found in these patients.

Recently, replication studies in independent cohorts of CD patients of European American and Jewish ancestry have confirmed the role of the *IL23R* gene in CD susceptibility.<sup>5</sup> The *IL23R* gene is contained within 2 large blocks of linkage disequilibrium, and markers in the centromeric block containing exons 5–11, and part of the intergenic region between *IL23R* and the adjacent *IL-12R $\beta$ -2* gene have the strongest association with CD. Three of the 5 *IL23R* markers we studied, *rs1004819*, *rs11209026*, and *rs10889677*, have shown significant associations. The strongest association was found for the SNP *rs11209026* ( $P = 0.009$ , OR 0.36, 95% CI 0.16–0.81). In agreement with others authors, this study confirm the uncommon coding variant *rs11209026* (c.1142G>A, p.Arg381Gln) as a protective allele against CD.<sup>5,26</sup> The functional consequences of noncoding variants of the *IL23R* gene remain to be determined. IL-23 is important in driving an early immune response to pathogens by directly inducing IL-17 production, and the discovery that certain autoimmune disorders might be largely mediated by a deregulated IL23-IL17 response poses promising implications for the development of novel therapies to treat autoimmune diseases. By specifically targeting IL-23p19 instead of IL-12-IL-23p40, it has been possible to develop drugs that block organ-specific autoimmune pathologies, resulting in less compromise of protective responses.<sup>5,20</sup>

No genotype-phenotype association was found between *CARD15/IL23R* variants and CD in the Brazilian population studied. The allele frequencies of *CARD15/IL23R* variants were not higher in pediatric-onset than adult-onset CD patients, and these results are consistent with the findings from North American and European studies.<sup>17,27</sup> Interestingly, a recent study by Tremelling et al<sup>26</sup> did not found an association of *IL23R* variants with CD phenotype, and did not show evidence of interaction with *IL23R* variants and *CARD15*, similar to our study.

Replication studies by independent groups are necessary to elucidate the contribution of these CD susceptibility loci in different ethnic populations. Intriguingly, no evidence of a positive association for any of these polymorphisms was found in the Japanese population.<sup>27</sup>

In conclusion, the present study confirms that *CARD15* and *IL23R* variants confer susceptibility to CD in the Brazilian population. Our study did not find a correlation between genotype and phenotype. Nevertheless, these results may not fully reflect the whole Brazilian population, not only because of the ethnic diversity of Brazil, but also due to the differences of the environmental factors of each region. Further study of CD genes in larger and more diverse populations with robust admixture analysis is required in Brazil. Understanding ethnic/racial-specific risk in CD genes may be helpful for developing therapeutic measures specific to different ethnic populations.

## REFERENCES

1. Cario E. Bacterial interactions with cells of the intestinal mucosa: Toll-like receptors and *NOD2*. *Gut*. 2005;54:1182–1193.
2. Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, et al. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology*. 2004;126:1533–1549.
3. The IBD International Genetics Consortium. International collaboration provides convincing linkage replication in Crohn disease through analysis of a large pooled data set: Crohn disease and chromosome 16. *Am J Hum Genet*. 2001;68:1163–1171.
4. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, et al. Association of *CARD15* leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001;411:599–603.
5. Duerr RH, Taylor KD, Brant SR, et al. A genome-wide association study identifies *IL23R* as an inflammatory bowel disease gene. *Science*. 2006;314:1461–1463.
6. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, et al. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in *ATG16L1*. *Nat Genet*. 2007;39:207–211.
7. Chamaillard M, Philpott D, Girardin SE, et al. Gene-environment interaction modulated by allelic heterogeneity in inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:3455–3460.
8. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, et al. The contribution of *NOD2* gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002;122:867–874.
9. Vermeire S, Wild G, Kocher K, et al. *CARD15* genetic variation in a Quebec population: prevalence, genotype-phenotype relationship, and haplotype structure. *Am J Hum Genet*. 2002;71:74–83.
10. Cavanaugh JA, Adams KE, Quak EJ, et al. *CARD15/NOD2* risk alleles in the development of Crohn's disease in the Australian population. *Ann Hum Genet*. 2003;67:35–41.
11. Abreu MT, Taylor KD, Lin YC, et al. Mutations in *NOD2* are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2002;123:679–688.
12. Zhou Z, Lin X, Akolkar PN, et al. Variation at *NOD2/CARD15* in familial and sporadic cases of Crohn's disease in the Ashkenazi Jewish population. *Am J Gastroenterol*. 2002;97:3095–3101.
13. Helio T, Halm L, Lappalainen M, Fodstad H, et al. *CARD15/NOD2* gene variants are associated with familiarly occurring and complicated forms of Crohn's disease. *Gut*. 2003;52:558–562.
14. Nunez C, Barreiro M, Domínguez-Munoz JE, et al. *CARD15* mutations in patients with Crohn's disease in a homogeneous Spanish population. *Am J Gastroenterol*. 2004;99:450–456.
15. Croucher PJP, Mascheretti S, Hampe J, et al. Haplotype structure and association to Crohn's disease of *CARD15* mutations in two ethnically divergent population. *Eur J Hum Genet*. 2003;11:6–16.
16. Giachino D, Van Duist MM, Regazzoni S, et al. Analysis of the *CARD15* variants R702W, G908R and L1007fs in Italian IBD patients. *Eur J Hum Genet*. 2004;12:206–212.
17. Kugathasan S, Collins N, Maresso K, et al. *CARD15* gene mutations confers an increased risk for early surgery in pediatric-onset Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;11:1003–1009.
18. Arnott IDR, Nimmo ER, Drummond HE, et al. *NOD2/CARD15*, *TLR4* and *CD14* mutations in Scottish and Irish Crohn's disease patients: evidence for genetic heterogeneity within Europe? *Genes Immun*. 2004;5:417–425.
19. Annese V, Latiano A, Andriulli A. Genetics of inflammatory bowel disease: the beginning of the end or the end of the beginning? *Dig Liver Dis*. 2003;35:442–449.
20. Neurath MF. IL-23: a master regulator in Crohn disease. *Nat Med*. 2007;13:26–28.
21. Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*. 2000;13:715–725.
22. Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates auto-phagy in disease pathogenesis. *Nat Genet*. 2007;39:596–604.
23. Gaburri PD, Castro LEV, Ferreira JOD, et al. Epidemiology, clinical features and evolution of Crohn's disease: a study of 60 cases. *Arq Gastroenterol*. 1998;35:240–246.
24. Souza MHL, Troncon LEA, Rodrigues CM, et al. Trends in the occurrence (1980-1999) and clinical features of Crohn's disease and ulcerative colitis in a university hospital in southeastern Brazil. *Arq Gastroenterol*. 2002;39:98–105.
25. Lennard-Jones JE. Classification of inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*. 1989;24:2–6.
26. Tremelling M, Cummings F, Fisher AS, et al. *IL23R* variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2007;132:1657–1664.
27. Tomer G, Ceballos C, Concepcion E, et al. *NOD15/CARD15* variants are associated with lower weight at diagnosis in children IBD Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*. 2003;112:2479–2484.
28. Yamazaki K, Onouchi Y, Takazoe M, et al. Association analysis of genetic variants in *IL23R*, *ATG16L1* and 5p13.1 loci with Crohn's disease in Japanese patients. *J Hum Genet*. 2007;52:575–583.

**ANEXOS**

<b>ANEXO 1.</b> APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ.....	104
<b>ANEXO 2.</b> CRITÉRIOS DE LENNARD-JONES PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CROHN.....	108

**ANEXO 1**

**APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA  
E PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HOSPITAL DE CLÍNICAS DA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**



Curitiba, 27 de janeiro de 2005.

Ilmo (a) Sr. (a)

Márcia Luiza Baptista

Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **“Frequência de mutações do gene CARD15/NOD2 e correlação fenotípica em pacientes com doença de Crohn em uma população brasileira”**, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 25 de janeiro de 2005. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

Protocolo CEP/HC 963.002/2005-01

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

**Data para entrega do primeiro relatório: 27 de julho de 2005.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Renato Tambara Filho  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR



Hospital de Clínicas  
UFPR



Curitiba, 5 of June

2006

Dear Sir:

Subra Kugathasan

Department of Pediatrics

Medical College of Wisconsin

We communicate that the research project entitled **“Frequency of mutations on CARD15/NOD2 gene and phenotype correlation in a Brazilian population of Crohn’s Disease patients”** conducted by Dr. Marcia Luiza Baptista, was analysed and approved by the Human Being Ethics Committee (Institutional Review Board), on a meeting occurred on 25th of January 2005. The referred project attends to the aspects of the 196/96 National Board of Healthy, as well as to the Regulatory Rules and Guidance of Human Being Research. Protocol CEP/HC: 963.002/2005-01.

Sincerely yours,

Prof. Dr. Renato Tambara Filho

Coordinator of Human Being Research Ethics Committee  
of Hospital de Clínicas of Universidade Federal do Paraná/Brazil



**ANEXO 2**  
**CRITÉRIOS DE LENNARD-JONES PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CROHN**

## CRITÉRIO PARA O DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CROHN SEGUNDO LENNARD-JONES

**Exclusão:**

- Infecções (microbiologia, incluindo anticorpos contra *Yersinia* quando apropriado)
- Isquemia (fatores predisponentes, distribuição da doença, histologia)
- Irradiação (história)
- Linfoma/carcinoma (doença celíaca prévia, características radiológicas sugestivas, prognóstico)

**Inclusão:**

- a) Boca a ânus
  - Lesão granulomatosa crônica do lábio ou mucosa bucal (inspeção, biópsia)
  - Doença piloro-duodenal (radiologia, endoscopia, biópsia)
  - Doença do intestino delgado (radiologia, endoscopia, espécime)
  - Lesão crônica anal (exame clínico, biópsia)
- b) Descontínua
  - Lesões separadas por mucosa normal, as quais podem estar amplamente separadas, esparsas ao longo da extensão ou ao redor da circunferência, ou discretas úlceras (endoscopia, radiologia, espécime)
- c) Transmural
  - Úlceras fissurantes (radiologia, espécime)
  - Abscessos (clínica, imagem)
  - Fístula (clínica, radiologia, espécime)
- d) Fibrose
  - Estenose (para ser diferenciada do carcinoma ou espessamento muscular concêntrico na RCU), a qual pode ser assimétrica e múltipla (endoscopia, radiologia, espécime)
- e) Linfóide
  - Biópsia de úlcera aftóide pequena ou mostrando agregados linfóides
- f) Mucina
  - Retenção de mucina colônica na biópsia na presença de inflamação ativa (biópsia, espécime)
- g) Granuloma
  - Não presente em todos os casos de doença de Crohn, distinguir de granuloma caseoso da tuberculose, granuloma de corpo estranho, ou outras causas (biópsia, espécime).

TABELA 14. Critério anatômico para o diagnóstico da DC reconhecido pelo exame Clínico, Endoscópico, Radiológico e Patológico

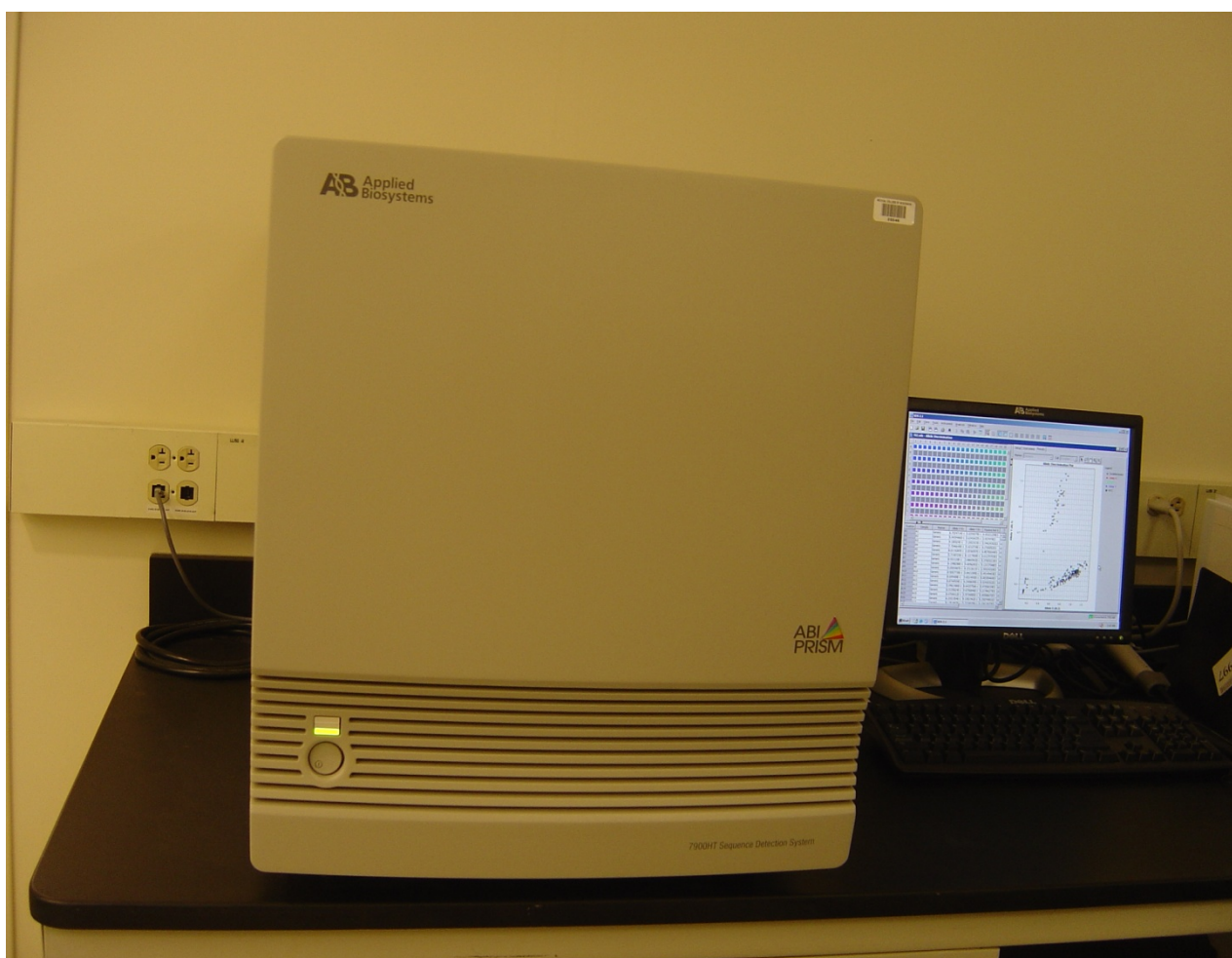
	<b>Clínica/ Endoscopia</b>	<b>RX</b>	<b>Biópsia</b>	<b>Espécime</b>
<b>Boca a ânus</b>				
Píloro-duodeno	+	+	+	+
Intestino delgado	+	+	+	+
Lesão anal	+		+	+
<b>Descontínua</b>	+	+	+	+
<b>Transmural</b>				
Fissura		+		+
Abscesso	+	+		+
Fístula	+	+		+
<b>Fibrose</b>				
Estenose	+	+		+
<b>Linfóide</b>				
Úlceras			+	+
Agregados			+	+
<b>Mucina</b>				
Retenção			+	
<b>Granuloma</b>			<b>±</b>	<b>±</b>
Excluir infecção ou isquemia: doença de Crohn = +++ ou <b>±±</b>				

**FIGURAS DOS APARELHOS UTILIZADOS PARA TÉCNICA DE GENOTIPAGEM  
AUTOMATIZADA**

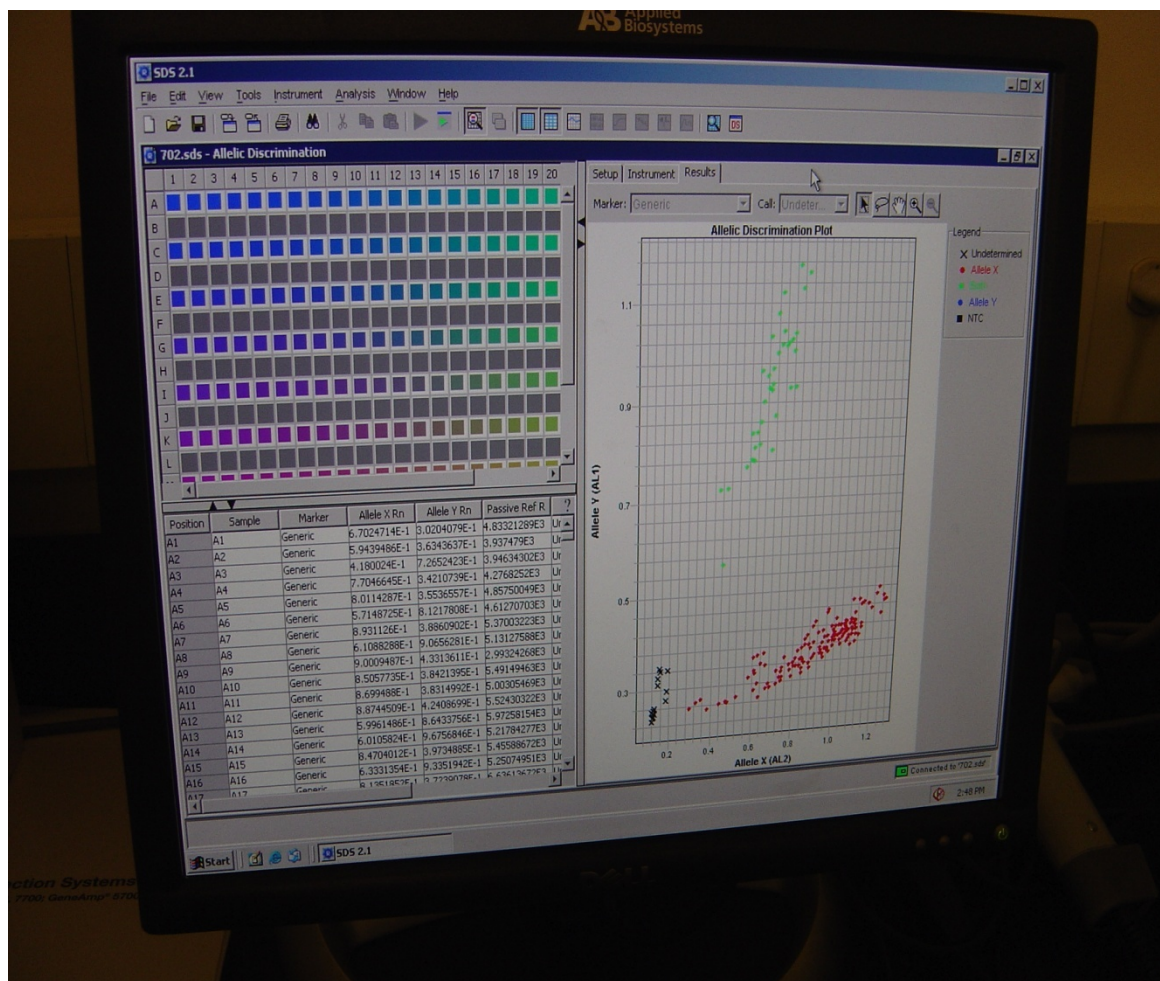












# Livros Grátis

( <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](#)