

**BRUNO LORENZO SCOLARO**

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO T300A DO GENE *ATG16L1*  
COMO FATOR PREDISPONENTE PARA A OCORRÊNCIA  
DA DOENÇA DE CROHN**

**JOINVILLE**

**2013**

BRUNO LORENZO SCOLARO

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO T300A DO GENE *ATG16L1*  
COMO FATOR PREDISPONENTE PARA A OCORRÊNCIA  
DA DOENÇA DE CROHN**

Dissertação de mestrado apresentada como requisito parcial para aprovação no Exame de Qualificação para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, na Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE. Área de concentração: Saúde. Orientador: Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho. Coorientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França.

**JOINVILLE**

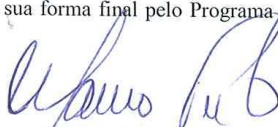
**2013**

**Termo de Aprovação****“Análise do Polimorfismo T300A do gene *ATG16L1* como Fator Predisponente para Ocorrência da Doença de Crohn”**

por

Bruno Lorenzo Scolaro

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente.

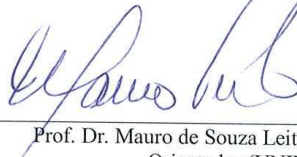


Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho  
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dr. Gilmar Sidnei Erzinger

Coordenador do Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente

**Banca Examinadora:**

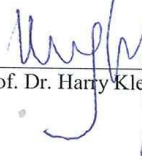
Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho  
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França  
Co-orientador (UNIVILLE)



Prof. Dr. Adérson Omar Mourão Cintra Damião  
(USP)



Prof. Dr. Harry Kleinubing Junior  
(UNIVILLE)

Joinville, 29 de maio de 2013

**À Rossana, minha amada esposa.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pois obstáculo algum é intransponível quando nele confiamos.

À minha família pelo eterno incentivo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Mauro de Souza Leite Pinho e ao coorientador Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França pelo exemplo de competência e por me permitirem fazer parte deste excelente grupo de pesquisa.

À Emily dos Santos e Leslie Ecker Ferreira pela extrema dedicação e prontidão e à equipe do laboratório de Biologia Molecular pelo apoio.

Aos professores do curso de Mestrado em Saúde e Meio ambiente e colegas de classe pelo companheirismo.

Aos colegas médicos colaboradores deste trabalho: Harry Kleinubing Júnior, Paulo Gustavo Kotze, Éverson Fernando Mallutta, Juliano Coelho Ludvig, Antônio Baldin Júnior e Maria Gabriela Lazcano Alves Ferreira a que contribuíram para realização deste projeto com envio de dados e amostras.

Aos professores Dr. Érico Ernesto Pretzel Fillmann, Henrique Fillmann, Lucio Fillmann e Maria Cristina Sartor pelos eternos ensinamentos e incentivo.

Aos colegas de profissão, Gustavo Becker Pereira e Rafael Félix Schilindwein, que compensaram minhas faltas durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos pacientes e doadores do HEMOSC que gentilmente concordaram com a participação no estudo e ao Centro de Hemoterapia e Hematologia do Estado de Santa Catarina – HEMOSC, Regional de Joinville pela parceria.

Em especial à Rossana Ferrari Sclaro, minha esposa, companheira de todos os momentos, pela compreensão e amor.

## RESUMO

**Introdução:** A Doença de Crohn (DC) caracteriza-se por uma desordem inflamatória, crônica e debilitante do trato gastrointestinal. Apesar de sua crescente prevalência, a compreensão dos seus mecanismos etiopatogênicos permanece um grande desafio. Diversos fatores contribuem para seu desenvolvimento como predisposição genética, fatores ambientais, flora microbiana intestinal e respostas imunes aberrantes. A partir da realização de estudos amplos do genoma (*genome-wide*) foi possível identificar um gene denominado *ATG16L1* (*autophagy-related 16-like 1*) cujo polimorfismo T300A está relacionado ao aumento de susceptibilidade ao desenvolvimento desta doença. **Objetivo:** Este trabalho tem como objetivo principal analisar a incidência do polimorfismo T300A do gene *ATG16L1* em pacientes portadores de doença de Crohn. **Materiais e Métodos:** Para alcançar o referido objetivo foram avaliadas 106 amostras de pacientes portadores de Doença de Crohn, procedentes de 5 centros sul brasileiros referências no tratamento de tais doenças e 239 amostras de doadores de sangue do HEMOSC/Joinville. A genotipagem das amostras consistiu em amplificação do segmento gênico via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguidos de RFLP (Polimorfismos de Comprimentos de Fragmentos de Restrição). Os *amplicons* obtidos foram separados via eletroforese em gel de agarose e visualizados sob luz ultravioleta. **Resultados:** Tanto no grupo de pacientes com DC quanto no grupo controle, o genótipo AG mostrou-se mais prevalente (50% vs 44,8%), seguido dos genótipos AA (26,4% vs 35,1%) e GG (23,6% vs 20,1%). A frequência observada do alelo G do polimorfismo T300A foi maior no grupo de portadores de DC (48,6%,) do que nos controles (42,4%), porém não atingindo significância estatística. **Conclusões:** Não foi possível confirmar o aumento de susceptibilidade à DC conferido pelo polimorfismo T300A conforme relatado em outros estudos.

**Palavras chave:** Doença de Crohn, *ATG16L1*, T300A.

## ABSTRACT

**Introduction:** Crohn's Disease (CD) is characterized by an inflammatory disorder, chronic and debilitating of the gastrointestinal tract. Despite its increasing prevalence, the understanding of its pathogenic mechanisms remains a challenge. Several factors contribute to their development such as genetic predisposition, environmental factors, intestinal microbial flora and aberrant immune responses. From extensive studies of the genome (genome-wide) it was possible to identify a gene called *ATG16L1* (autophagy-related 16-like 1) whose T300A polymorphism is related to the increase of this disease. **Aim:** This paper aims at analyzing the impact of gene *ATG16L1* T300A polymorphism in patients with Crohn's disease. **Methods:** In pursuit of this objective we have evaluated 106 samples from patients with Crohn's Disease, coming from five Southern Brazilian reference centers for the treatment of such diseases and 239 samples from HEMOSC's/ Joinville blood donors. The Genotyping of samples consisted of gene segment amplification via polymerase chain reaction (PCR) followed by RFLP (Polymorphic Restriction Fragment Length. The amplicons were separated by electrophoresis on an agarose gel and visualized under ultraviolet light. **Results:** Both in patients with CD and control groups, the AG genotype was more prevalent (50% vs 44,8%), followed by the AA genotype (26,4% vs 35,1%) and GG (23,6% vs 20,1%). The observed frequency of the G allele of the T300A polymorphism was higher in the group of patients with Crohn's Disease (48,6%) than in controls (42,4%), although not reaching statistical significance. **Conclusions:** It was not possible to confirm the increased susceptibility conferred by polymorphisms T300A DC as reported in other studies.

**KEY-words:** crohn's disease, *ATG16L1*, T300A.

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

|          |   |
|----------|---|
| ATG16L1  | <i>Autophagy-related 16-like 1</i>  |
| CEP      | Centro de Ética em Pesquisa   |
| DC       | Doença de crohn   |
| DMSO     | <i>Dimethyl Sulfoxide</i> /Dimetilsulfóxido   |
| DNA      | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> /Ácido Desoxirribonucleico   |
| EUA      | Estados Unidos da América   |
| IBGE     | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística   |
| PCR      | <i>Polymerase Chain Reaction</i> /Reação em Cadeia da Polimerase  |
| RFLP     | <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> /Análise de Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos de Restrição         |
| SNP      | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> /Polimorfismo de Nucleotídeo Único  |
| T300A    | Polimorfismo de nucleotídeo único onde há uma substituição de treonina por alanina na posição 300 de aminoácido da proteína |
| TCLE     | Termo de Consentimento Livre e Esclarecido  |
| TPMT     | <i>Thiopurine Methyltransferase</i> /Tiopurina Metiltransferase   |
| UNIVALI  | Universidade do Vale do Itajaí  |
| UNIVILLE | Universidade da Região de Joinville   |
| PUCPR    | Pontifícia Universidade Católica do Paraná  |



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. MAQUINÁRIA MOLECULAR PARA A FORMAÇÃO DO AUTOFAGOSSOMO.....19
- Figura 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DA AUTOFAGIA.....20
- Figura 3. AMOSTRAS DE SANGUE DOS PORTADORES DE DOENÇA DE CROHN EM FTA Elute Card., Whartan®. ....**Erro! Indicador não definido.**3
- Figura 4. ISOLAMENTO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE SANGUE SECO, DE ACORDO COM WHATMAN. 1. Coleta de amostra de sangue seguido de secagem completa, 2. Remoção de uma amostra (3 mm) circular com um perfurador estéril e transferência para um tubo de microcentrífuga, 3. A lavagem em 500 uL de dH<sub>2</sub>O em vórtice 3X durante 5 segundos 4. A remoção de água seguido por centrifugação e descarte excesso 5. Adição de 50 uL de água estéril, seguido por aquecimento (95 ° C) durante 30 min 6. Adição de 5-10 uL de mistura de reação para PCR..... 255
- Figura 5. – PERFIS ELETROFORÉTICOS T300A (rs2241880)**Erro! Indicador não definido.**7

# SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>11</b> |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>  | <b>12</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL:.....  | 12        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....   | 12        |
| <b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>   | <b>14</b> |
| 3.1 ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS .....                                   | 14        |
| 3.2 ETIOLOGIA E ASPECTOS GENÉTICOS.....   | 15        |
| 3.3 O GENE ATG16L1.....   | 17        |
| <b>4. METODOLOGIA .....</b>   | <b>22</b> |
| 4.1 TIPO E MÉTODO DA PESQUISA .....   | 22        |
| 4.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....   | 22        |
| 4.3 AMOSTRAS ANALISADAS.....  | 22        |
| 4.3.1 PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA DE CROHN.....                              | 22        |
| 4.3.2 INDIVÍDUOS CONTROLES .....  | 23        |
| 4.4 ANÁLISES MOLECULARES.....   | 24        |
| 4.4.1 OBTENÇÃO DO DNA .....   | 24        |
| 4.4.2 GENOTIPAGEM DO SNP T300A (RS 2241880).....                                | 25        |
| 4.4.3 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE .....                                      | 26        |
| 4.4.4 ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE COMPRIMENTOS DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO ..... | 26        |
| 4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 27        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>   | <b>28</b> |
| <b>6. CONCLUSÕES .....</b>  | <b>38</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                                      | <b>1</b>  |

## APÊNDICES

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença de Crohn (DC) caracteriza-se por uma desordem inflamatória, crônica e debilitante do trato gastrointestinal manifestando-se através de distintas apresentações clínicas. Pode ocorrer em qualquer parte do trato digestivo, embora envolva mais comumente o íleo terminal, apresentando-se por meio de ulcerações descontínuas e transmurais, frequentemente associada a estenoses e fístulas (FOWLER *et al.*, 2008).

Apesar de sua prevalência, a compreensão dos mecanismos etiopatogênicos da Doença de Crohn permanece como um grande desafio. Sabe-se, porém, que diversos fatores contribuem para seu desenvolvimento como predisposição genética, fatores ambientais, flora microbiana intestinal e respostas imunes aberrantes (CHENG *et al.*, 2010).

O grande avanço tecnológico ocorrido ao longo dos últimos anos que permitiu o desenvolvimento de técnicas de análise da biologia molecular dos tecidos trouxe, também, uma renovação de esperanças quanto à possibilidade de obtenção de respostas na área das doenças inflamatórias intestinais. Neste sentido, um grande número de estudos tem buscado identificar proteínas cujas alterações tem sido consistentemente relacionadas à fisiopatologia destas doenças não apenas na sua incidência, mas também influenciando em fatores importantes como suas características e evolução clínica (PINHO, 2008).

A partir da realização de estudos amplos do genoma (*genome-wide*) foi possível identificar um gene de aparente grande relevância denominado como *ATG16L1* (*autophagy-related 16-like 1*) cujo produto é necessário para identificação e destruição das proteínas derivadas de agentes patogênicos na resposta imune inata e resistência mediada para patógenos intracelulares (PLANTINGA *et al.*, 2011).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL:**

Analisar o papel do polimorfismo T300A do gene *ATG16L1* como possível fator predisponente para a ocorrência de Doença de Crohn.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Analisar a prevalência do polimorfismo T300A em uma série multicêntrica de pacientes portadores de Doença de Crohn;
- Analisar a prevalência do polimorfismo T300A em uma série de indivíduos controle;
- Comparar os resultados obtidos em ambas as séries para determinação de possível associação causal;

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. ASPECTOS CLÍNICOS E EPIDEMIOLÓGICOS

A Doença de Crohn (DC) compõe, juntamente com a Retocolite Ulcerativa, um grupo de distúrbios inflamatórios crônicos e debilitantes do trato gastrointestinal denominados genericamente como Doenças Inflamatórias Intestinais (FOWLER *et al*, 2008).

Foi primeiramente descrita no ano de 1932 por Crohn, Ginzburg e Oppenheimer após a observação de 13 pacientes com ileíte terminal dentre um grupo de 52 casos de doenças inflamatórias granulomatosas não específicas do intestino (CROHN *et al*, 1932).

Apresenta-se através de um amplo espectro clínico, podendo acometer qualquer porção do tubo digestório, desde a boca até o ânus, de forma segmentar, assimétrica, transmural e recidivante. É uma doença sistêmica, caracterizada por inflamação descontínua dos segmentos digestivos acometidos, formação de ulcerações, fístulas, estenoses, além de apresentar manifestações extra-intestinais ligadas ou não à atividade da doença. Localiza-se preferencialmente no íleo terminal e evolui caracteristicamente com períodos de agravamento e remissão (KOLTUM, 2007).

Por não possuir etiologia definida, a DC não dispõe de tratamento curativo (ARAÚJO *et al*, 2011). As terapias visam à indução e manutenção da remissão, restabelecimento e manutenção de um bom estado nutricional e melhoria da qualidade de vida, evitando assim a multimorbidade característica como o impacto emocional, capacidade para lidar com a doença, dias de internação, pós-operatórios complicados, sequelas e morte (SAN ROMAN e MUÑOZ, 2011).

A DC pode ocorrer em qualquer idade, porém apresenta uma distribuição bimodal. Possui um pico entre a segunda e terceira década de vida, onde tipicamente ocorrem o maior número de casos e outro entre os 55 e 80 anos. Mulheres, em geral, possuem 20% a 30% mais chance de desenvolver a doença (NIVATVONGS e GORDON, 2007).

Inúmeros trabalhos têm demonstrado que a incidência da DC está em expansão em todo o mundo. Tal aumento iniciou-se após a Segunda Guerra

Mundial, época em que era conhecida principalmente na América do Norte e norte da Europa. Desde então vem sendo diagnosticada em toda a Europa, Japão, Austrália, América do Sul e Ásia (SCHIRBEL & FIOCCHI, 2010). Segundo dados do Ministério da Saúde a incidência e prevalência de pessoas acometidas pela doença nos países desenvolvidos situa-se em torno de 5:100.000 e 50:100.000 habitantes respectivamente. No Brasil não existem estudos específicos, porém a incidência vem aumentando (Brasil, 2012).

Por se tratar de uma doença inflamatória crônica, a DC não possui tratamento clínico ou cirúrgico curativo e exige abordagens terapêuticas para induzir e manter um controle dos sintomas, melhorar a qualidade de vida e minimizar a curto e longo prazo suas complicações. Apesar de sua incidência e prevalência mais baixas em relação a diversos outros distúrbios gastrointestinais, o custo do tratamento clínico e cirúrgico nos EUA é estimado em 2 bilhões de dólares anuais e está aumentando com o advento dos medicamentos biológicos. O total de custos diretos e indiretos foi de aproximadamente 826 milhões de dólares baseados em uma média de oitenta e quatro mil dias de internação e um milhão e trezentas mil consultas médicas por ano (LICHTENSTEIN *et al*, 2009).

### **3.2. ETIOLOGIA E ASPECTOS GENÉTICOS**

Embora amplamente estudada, a etiologia da DC permanece como um grande desafio. Tendo sido, durante muitos anos, incluída entre as doenças autoimunes, existem fortes evidências hoje de que sua etiopatogenia está relacionada a um conjunto de fatores que incluem aspectos genéticos do paciente, sistema imune, microbiota intestinal e elementos externos. Em determinadas circunstâncias, estes fatores podem contribuir para a ocorrência da perda do equilíbrio entre a ampla flora bacteriana e os mecanismos imunológicos existentes na parede intestinal, levando ao desenvolvimento de um processo inflamatório crônico de difícil controle (SCALDAFERRI e FIOCCHI, 2007).

O grande avanço tecnológico ocorrido ao longo dos últimos anos, principalmente na última década, permitiu o desenvolvimento de técnicas de análise da biologia molecular dos tecidos e trouxe, também, uma renovação de esperanças quanto à possibilidade de obtenção de respostas na área das DII. Neste sentido, um grande número de estudos tem buscado identificar proteínas cujas alterações tem

sido consistentemente relacionadas à fisiopatologia desta doença não apenas na sua incidência, mas também influenciando em fatores importantes como suas características e evolução clínica (PINHO, 2008).

Recentes evidências tem demonstrado o papel de fatores genéticos na patogênese da DC. Tais pesquisas demonstram taxas mais elevadas da enfermidade entre indivíduos de etnia caucasiana e judaica, em agregações familiares e, também, maiores taxas de concordância tanto em gêmeos monozigóticos quanto em dizigóticos. A busca por genes de suscetibilidade específicos à DC, no entanto, tem sido difícil devido à genética complexa, incluindo fatores como a falta de simples padrões de hereditariedade, o envolvimento de vários genes e a influência de fatores ambientais e microflora intestinal. Diversos locus genômicos distintos codificam genes envolvidos em um certo número de mecanismos homeostáticos e têm sido relacionados na etiopatogenia e prognóstico da DC (TSIANOS *et al*, 2012).

Embora agregados familiares tenham sido descritos na DC, genes de susceptibilidade não foram detectados antes de 2001, quando 2 grupos independentes relataram uma associação entre mutações no gene CARD15 do cromossoma 16, o qual codifica a proteína NOD-2, com a ocorrência de doenças inflamatórias intestinais, mais especificamente a Doença de Crohn. As principais mutações CARD15/NOD-2 (R702W, G908R e L1007fs) estão presentes em alguns fenótipos, de subgrupos de pacientes, como na doença de início precoce, estenoses, fístulas e maior acometimento do íleo terminal (KUCHERZIK *et al*, 2006).

NOD2 é um receptor de reconhecimento padrão citoplasmático do sistema imunitário inato, responsável pelo reconhecimento intracelular de produtos bacterianos e, também, de várias moléculas protetoras essenciais para uma eficaz eliminação bacteriana, ajudando assim, a prevenir a invasão bacteriana da mucosa intestinal e manter uma homeostase intestinal (SARTOR, 2006).

A descoberta da associação de DC com o polimorfismo funcional do gene CARD15 fornece evidências adicionais de que alguns casos de DC resultam de uma resposta imune anormal à flora bacteriana entérica (DUERR, 2007).

Estima-se que 20-30% dos portadores de Doença de Crohn apresentem alguma mutação no gene NOD-2/CARD15. Riis e *et al.* (2007) encontraram uma incidência de 23.9% de mutações deste gene entre portadores desta doença,

enquanto a incidência observada entre pacientes com RCUI e indivíduos saudáveis foi de 9,6% e 14,4%, respectivamente, sem diferença significativa entre estes dois últimos grupos;

Segundo uma metanálise publicada por Economou e *et al.* (2004) envolvendo 42 estudos, indivíduos com mutação em apenas um alelo do gene NOD-2/CARD15 (heterozigóticos) apresentam um risco 2,3 vezes maior de apresentar a Doença de Crohn, sendo que este risco se amplia para 17.1 vezes em portadores de mutações nos dois alelos (homozigóticos). Outros autores relatam este risco como sendo ainda maior, estimando-o entre 20 e 40%. Radford-Smith e Pandeya (2006) publicaram outra metanálise incluindo 12 estudos que buscaram correlacionar a presença de mutações NOD-2/CARD15 com aspectos relacionados à localização e o comportamento da Doença de Crohn e confirmaram uma associação significativa com a forma ileal ou ileocólica e a presença de lesões estenosantes, além de uma possível precocidade na idade de surgimento da doença.

Além da proteína NOD2/CARD15, outra proteína da família NOD tem sido associada à fisiopatologia das doenças inflamatórias intestinais, embora existindo ainda poucas evidências a respeito. Trata-se da proteína NOD1/CARD4, expressa no intestino delgado e colon, a qual também exerce papel no reconhecimento no epitélio de agentes bacterianos como *Shigella flexeneri* e *E.coli* invasiva. Mc Govern e *et al.* (2005) testaram a associação entre mutações deste gene em uma coorte de portadores de doenças inflamatórias intestinais e controles e comprovaram, de forma semelhante ao NOD2/CARD15, uma relação significativa nos casos de Doença de Crohn, mas não em casos de retocolite ulcerativa.

### **3.3. O GENE ATG16L1**

A continuidade desta linha de estudos visando à identificação de possíveis alterações genéticas capazes de predispor ao aparecimento de doenças inflamatórias intestinais levou à realização de estudos amplos do genoma (*genome-wide*). A partir destes foi possível identificar um gene de aparente grande relevância denominado como *ATG16L1* (*autophagy-related 16-like 1*) cujo produto é necessário para identificação e destruição das proteínas derivadas de agentes patogênicos na resposta imune inata e resistência mediada para patógenos intracelulares. Esta associação foi inicialmente identificada por Hampe e *et al.* (2007) como um gene de



susceptibilidade para Doença de Crohn demonstrado pela análise da presença de polimorfismo em um estudo incluindo 735 pacientes e 368 controles.

Vários polimorfismos e alterações somáticas têm sido identificados no gene *ATG16L1*, destacando-se o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) T300A (rs 2241880), o qual representa uma mutação A-G levando a uma substituição de treonina por alanina na posição 300 de aminoácido da proteína, a qual parece conferir um maior risco ao desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais, conforme relatado por Schmid e *et al.* (2006).

A autofagia é um processo celular fisiológico para degradação e reciclagem de componentes do citosol e organelas celulares danificadas, para manutenção da homeostase celular. O mecanismo é disparado por um sinal indutor de autofagia percebido pela célula, tanto fisiologicamente quanto em contextos patológicos. A autofagia é classicamente descrita como sendo induzida por privação de nutrientes e oxigênio. Porém, outros sinais pró autofágicos estão bem caracterizados: a presença de organelas ou proteínas danificadas, a presença de toxinas extracelulares e compostos citotóxicos. Deste modo, a autofagia esta envolvida em diversos processos fisiológicos ou patológicos, tais desenvolvimento e manutenção da homeostase do organismo, diferenciação celular, neurodegeneração, infecção e câncer (LEVINE e YUAN, 2005).

Existem três tipos de autofagia: a macroautofagia, a microautofagia e a autofagia mediada por chaperonas. A macroautofagia é responsável por mais de 90% da autofagia celular. Neste processo, o qual é induzido por sinais pró autofágicos, há a formação de uma estrutura inicial de membrana lipídica dupla chamada fagóforo, o qual inicia o processo de envolvimento de componentes celulares citoplasmáticos. Nesta etapa inicial da autofagia, chamada de nucleação, tem-se como principais proteínas envolvidas as fosfatidilinositol 3-cinase classe III e membros da família do ATG, 5, 6, 7, 10, 12 e 16, principais controladores da autofagia (BEHRENDTS, 2010). (Figura 1)

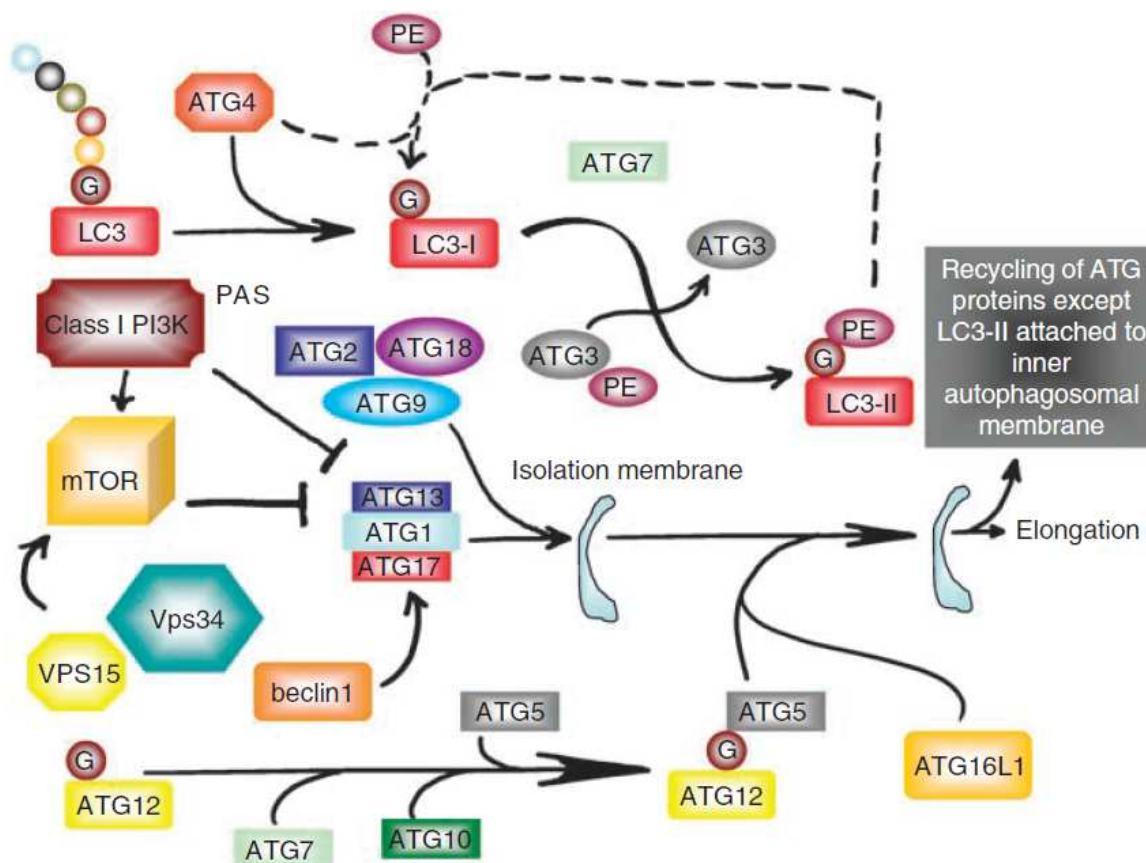


Figura 2. MAQUINÁRIA MOLECULAR PARA A FORMAÇÃO DO AUTOFAGOSSOMO.

Fonte: LIMBERGEN, 2009

A partir do fogóforo, há a formação de uma vesícula de membrana dupla chamada autofagossomo ou vesícula autofágica. Em seguida ocorre a etapa de fusionamento, na qual o autofagossomo une-se com o lisossomo para formar a estrutura funcional da autofagia, o autofagolisossomo. No interior desta estrutura, o ambiente ácido e as estruturas lisossomais dirigem a degradação dos componentes celulares, que gera produtos de degradação utilizados pela célula (WANG, 2003). (Figura 2)

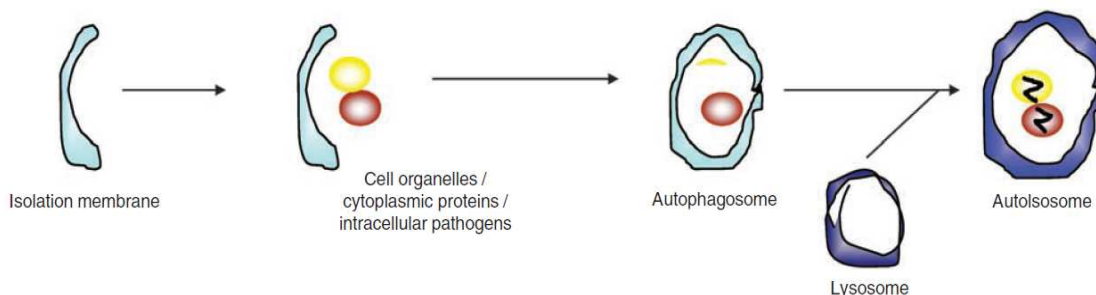


Figura 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DA AUTOFAGIA.

Fonte: LIMBERGEN, 2009.

Zhang e *et. al.* (2009) realizaram uma extensa meta-análise visando identificar o papel do polimorfismo T300A do gene *ATG16L1* como fator de susceptibilidade para Doença de Crohn envolvendo 24 estudos que totalizaram 13.022 casos e 17.532 controles. Nesta meta-análise, os autores foram capazes de detectar uma associação positiva em caucasianos, não sendo possível obter o mesmo resultado em asiáticos, sugerindo uma diferença possivelmente relacionada à variação de origem étnica. Esta hipótese foi reforçada pelo achado que a frequência do alelo G mostrou-se diferente entre estas populações.

Em 2010, Cheng e *et al.* publicaram outra meta-análise destinada a avaliar o mesmo polimorfismo como fator de susceptibilidade não apenas à Doença de Crohn, mas também à retocolite ulcerativa. Neste trabalho, os autores selecionaram 25 estudos dentre um total de 41, demonstrando a grande relevância e interesse despertado por este tema. É importante destacar que estes 25 estudos incluíam três em populações asiáticas, dois da Oceania, sete estudos americanos e 13 europeus. Nesta meta-análise, os autores confirmaram uma associação positiva entre o polimorfismo rs2241880 do gene *ATG16L1* e a susceptibilidade à Doença de Crohn. Em relação à RCUI foi observada, também, uma modesta, mas significativa, relação levando os autores a concluir então pela relevância deste gene, da autofagia e da flora intestinal na patogênese das doenças inflamatórias intestinais.

Dois outros estudos foram publicados ainda em 2010 confirmando a associação entre o polimorfismo rs2241880 e a susceptibilidade à Doença de Crohn (Csongei e *et al.*; Gazouli e *et al.*).

Em relação à incidência deste polimorfismo em populações brasileiras, a única referência encontrada na literatura refere-se a um trabalho envolvendo 187

pacientes portadores de Doença de Crohn e 255 controles estudados pela Universidade Federal do Paraná, cuja genotipagem, realizada no Medical College of Wisconsin, revelou uma tendência à associação, porém, sem atingir resultados estatisticamente significativos (BAPTISTA *et al*, 2008).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. TIPO E MÉTODO DA PESQUISA**

Estudo Caso-Controlle, quantitativo, de caráter multicêntrico.

### **4.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O Projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE sob o ofício 155/2011 do dia 25 de maio de 2011.

### **4.3. AMOSTRAS ANALISADAS**

#### **4.3.1. PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA DE CROHN**

Foram analisadas 145 amostras de sangue coletadas de pacientes com diagnóstico de Doença de Crohn, advindas de 5 centros de referência no tratamento de tais doenças, parceiros do estudo. Destas, 106 foram incluídas no estudo e 39 excluídas devido a dificuldades técnicas como qualidade do DNA e perfis inconclusivos.

- Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital Municipal São José, Joinville/SC.
- Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais da Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, Itajaí/SC.
- Serviço de Coloproctologia do Hospital Universitário Cajuru (SeCoHUC) PUCPR, Curitiba/PR.
- Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR.
- Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital Santa Isabel, Blumenau/SC.

As amostras coletadas foram armazenadas em cartões FTA (

Figura 3), constando de algumas gotas de sangue periférico através de lesão puntiforme em um dos dedos dos pacientes. A coleta se deu independentemente da faixa etária, sexo, cor, estado geral de saúde, classes e grupos sociais dos pacientes.

As amostras somente foram captadas e utilizadas mediante explicitação dos objetivos do trabalho e autorização dos pacientes via assinatura em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico. Posteriormente, foram armazenadas e analisadas no Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE juntamente com dados de identificação e aspectos clínicos dos pacientes.

Anexou-se ao material coletado um formulário, preenchido pelo médico responsável do centro colaborador, contendo seu número de identificação, dados pessoais identificados apenas pelas letras iniciais do nome, idade, sexo, além de informações referentes às características clínicas de sua doença.



Figura 3. AMOSTRAS DE SANGUE DOS PORTADORES DE DOENÇA DE CROHN EM FTA Elute Card., Whartan®).

Fonte: Acervo Autor

#### 4.3.2. INDIVÍDUOS CONTROLES

Foram analisadas amostras de sangue obtidas a partir de duzentos e trinta e nove doadores voluntários do Hemocentro Regional de Joinville (HEMOSC).

Cem voluntários foram recrutados de forma consecutiva, sendo aproveitados cerca de 5 mL de sangue periférico utilizados na rotina das investigações hematológicas, não existindo necessidade de coleta específica. Os participantes responderam a um questionário contendo questões quanto à idade, sexo e cor (através de autodeclaração, de acordo com os critérios do IBGE).

As amostras foram incluídas somente após explicitação dos objetivos do trabalho e autorização dos sujeitos via assinatura em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico.

O critério de exclusão foram doadores com parentesco consanguíneo.

Após a coleta do sangue no Hemocentro Regional de Joinville, o material foi encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE.

As demais amostras de DNA foram obtidas de um estudo realizado anteriormente, denominado “Prevalência do polimorfismo do gene da Tiopurina Metiltransferase (TPMT) na população de Joinville”, realizado pela pesquisadora Gabriela Ronconi Gastal, acadêmica do programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, no período de 2009 a 2010. Esse projeto, protocolado sob o número 134/09, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIVILLE em 11/11/2009, tendo recebido o parecer 326/2009/CEP. Nesse estudo, os indivíduos assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) em que se solicitava a autorização para armazenamento de seus dados e amostras de DNA por 5 anos, para investigação futura de outras regiões do seu genoma.

#### **4.4. ANÁLISES MOLECULARES**

Para a análise do polimorfismo T300A (rs2241880), foram cumpridas etapas a seguir. Os procedimentos metodológicos foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE.

##### **4.4.1. OBTENÇÃO DO DNA**

As amostras de DNA dos pacientes portadores de Doença de Crohn foram extraídas de acordo com as orientações de FTA CARDS (FTA Elute Micro Card – Whatman®) (Figura 2).

Os procedimentos de extração e purificação do DNA genômico, aplicada às amostras de sangue dos doadores do HEMOSC coletadas e armazenadas à -20°C, foram realizados empregando-se o kit Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) segundo instruções do fabricante.

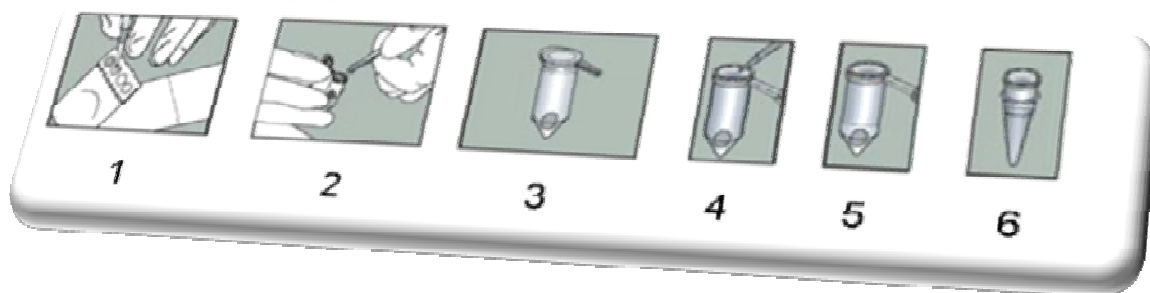


Figura 4. ISOLAMENTO DE DNA A PARTIR DE AMOSTRAS DE SANGUE SECO, DE ACORDO COM WHATMAN.

1. Coleta de amostra de sangue seguido de secagem completa;
2. Remoção de uma amostra com um perfurador estéril para um tubo de microcentrifuga;
3. A lavagem em 500 uL de água em vórtice 3X durante 5 segundos;
4. A remoção de água seguido por centrifugação e descarte do excesso;
5. Adição de 50 uL de água estéril, seguido por aquecimento (95°C) durante 30 min;
6. Adição de 5-10 uL de mistura de reação para PCR.

#### 4.4.2. GENOTIPAGEM DO SNP T300A (rs 2241880)

A metodologia empregada para genotipagem do SNP rs2241880 foi baseada no estudo de Csongei (2010). A partir da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*)-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e utilização das seguintes sequências de primers: F-5'-CTCTGTCACCATATCAAGCGTGG-3' e R-5'-TCTAGAAGGACAGGCTATCAACAGATG-3', foram definidos os alelos referentes ao SNP T300A.



#### 4.4.3. REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE

Padronizou-se uma metodologia de PCR para a amplificação dos segmentos gênicos contendo o polimorfismo em questão. A padronização da técnica foi realizada mediante testes de concentração de oligonucleotídeos e DMSO e temperatura de anelamento. A termociclagem foi conduzida em aparelho XP Thermal Cyclers (BIOER Technology Co, Tóquio, Japão).

Em cada reação utilizou-se 1 µL de dNTP's (10mM), 0,2 µL de Taq DNA Polimerase (5U/ µL), 5 µL de tampão de reação (10x), 1,5 µL de cloreto de magnésio (50 mM), 1 µL de cada *primer* (10 pmol/ reação), 2 µL de DNA (amostra) em um volume final de 50 µL.

As amplificações foram obtidas nas seguintes condições de PCR: a termociclagem foi composta de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento por 40 segundos a 55°C e extensão a 72°C por 40 segundos, finalizando com extensão a 72°C por 7 minutos.

#### 4.4.4. ANÁLISE DE POLIMORFISMO DE COMPRIMENTOS DOS FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO

Após a amplificação pela PCR, realizou-se o ensaio de RFLP para a discriminação alélica. Procedeu-se a digestão dos *amplicons* gerados com a endonuclease *Lwel*, segundo instruções do fabricante (Invitrogen, Califórnia - EUA). Separaram-se os fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídeo, e visualizados através de exposição à luz ultravioleta. Segue-se então a fotodocumentação para visualização dos fragmentos e identificação dos genótipos (homozigoto ou heterozigoto).

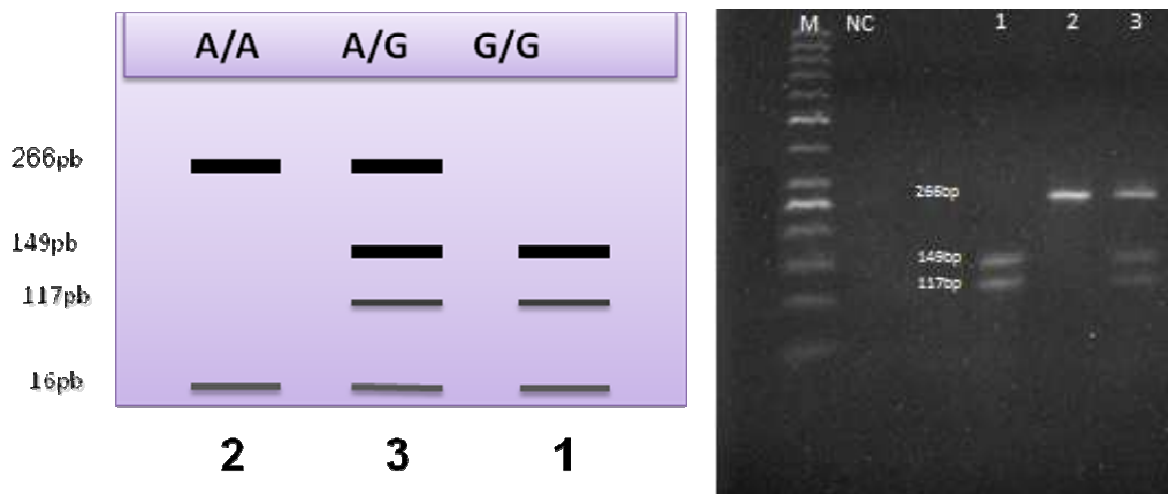


Figura 5. – PERFIS ELETROFORÉTICOS DO T300A (rs 2241880). Correspondentes às homocigotes GG (1) e AA (2) e heterocigose AG (3) do polimorfismo T300A do gene *ATG16L1*. M: padrão de tamanho molecular (100 bp ladder, fermentas, Ontario, Canadá); NC: controle negativo.

#### 4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise descritiva da amostra do estudo foram utilizadas proporções para variáveis categóricas e média e desvios padrão para variáveis contínuas. A associação dos genótipos e alelos com a susceptibilidade à DC foi verificada utilizando-se o software HDS, com base em tabelas de contingência 2x2, através do indicador Odds Ratio, adotando-se um intervalo de Confiança de 95% e considerando-se significantes os valores de  $p$  inferiores a 0,05.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Conforme as normas do Programa de Pós Graduação do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, esse capítulo será apresentado na forma de artigo científico que será encaminhado para publicação em periódicos.

## Polimorfismo genético T300A: fator de susceptibilidade para Doença de Crohn?

Bruno Lorenzo Scolaro<sup>1</sup>

Emily dos Santos<sup>2</sup>

Leslie Ecker Ferreira<sup>3</sup>

Harry Kleinubing Jr.<sup>4</sup>

Paulo Gustavo Kotze<sup>5</sup>

Paulo Henrique Condeixa de França<sup>6</sup>

Mauro de Souza Leite Pinho<sup>7</sup>

<sup>1</sup> Acadêmico do Programa de Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil

<sup>2</sup> Graduanda em Farmácia - Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil

<sup>3</sup> Bióloga Responsável pelo Laboratório de Pesquisa em Biologia Molecular da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil

<sup>4</sup> Docente do Departamento de Medicina da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil

<sup>5</sup> Docente do Departamento de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR - Curitiba (PR), Brasil

<sup>6</sup> Docente dos Departamentos de Farmácia e Medicina da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil

<sup>7</sup> Docente do Departamento de Medicina da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE - Joinville (SC), Brasil

Contato para correspondência:

Bruno Lorenzo Scolaro

Laboratório de Biologia Molecular da Universidade da Região de Joinville.

Rua Paulo Malschitzki, 10, Campus Universitário, Zona Industrial. CEP: 89219-710. Joinville, Santa Catarina, Brasil.

Tel.: +55 47 34619197

Fax: +55 47 34730131

E-mail: brunoscolaro@gmail.com

Fonte de auxílio à pesquisa: Fundo de Apoio a Pesquisa – FAP/Univille

Os autores declaram não existir conflitos de interesse.

## RESUMO

**Introdução:** A Doença de Crohn (DC) caracteriza-se por uma distúrbio inflamatório, crônico e debilitante do trato gastrointestinal. Apesar de sua prevalência, a compreensão dos seus mecanismos etiopatogênicos permanece um grande desafio. Diversos fatores contribuem para seu desenvolvimento como predisposição genética, fatores ambientais, flora microbiana intestinal e respostas imunes aberrantes. A partir da realização de estudos amplos do genoma humano foi possível identificar um gene denominado *ATG16L1* (*autophagy-related 16-like 1*) cujo polimorfismo T300A (rs2241880) foi relacionado ao aumento de susceptibilidade ao desenvolvimento desta doença. **Objetivo:** Analisar o papel do polimorfismo T300A do gene *ATG16L1* como possível fator predisponente para a ocorrência de DC. **Material e Métodos:** Foram avaliadas 106 amostras de pacientes portadores de Doença de Crohn, procedentes de 5 centros sul brasileiros referências no tratamento de tais doenças e 239 amostras de doadores de sangue do HEMOSC/Joinville. A genotipagem das amostras consistiu em amplificação do segmento gênico via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguidos de RFLP (Polimorfismos de Comprimentos de Fragmentos de Restrição). Os *amplicons* obtidos foram separados via eletroforese em gel de agarose e visualizados sob luz ultravioleta. **Resultados:** Tanto no grupo de pacientes com DC quanto no grupo controle, o genótipo AG mostrou-se mais prevalente (50% vs 44,8%), seguido dos genótipos AA (26,4% vs 35,1%) e GG (23,6% vs 20,1%). A frequência observada do alelo G do polimorfismo T300A foi maior no grupo de portadores de DC (48,6%,) do que nos controles (42,4%), não atingindo significância estatística. **Conclusões:** Não foi possível confirmar o aumento de susceptibilidade à DC conferido pelo polimorfismo T300A conforme relatado em outros estudos. **Palavras chave:** Doença de Crohn, *ATG16L1*, T300A, polimorfismo de nucleotídeo único.

## ABSTRACT

**Introduction:** Crohn's disease (CD) is characterized by an inflammatory disorder, chronic and debilitating of the gastrointestinal tract. Despite its prevalence, the understanding of its pathogenic mechanisms remains a challenge. Several factors contribute to their development such as genetic predisposition, environmental factors, intestinal microbial flora and aberrant immune responses. From extensive studies of the genome (genome-wide) it was possible to identify a gene called *ATG16L1* (autophagy-related 16-like 1) whose T300A polymorphism is related to the increase of this disease. **Aim:** This paper aims at analyzing the impact of gene *ATG16L1* T300A polymorphism in patients with Crohn's disease. **Methods:** In pursuit of this objective we have evaluated 106 samples from patients with Crohn's disease, coming from five Southern Brazilian reference centers for the treatment of such diseases and 239 samples from HEMOSC's/ Joinville blood donors. The Genotyping of samples consisted of gene segment amplification via polymerase chain reaction (PCR) followed by RFLP (Polymorphic Restriction Fragment Length. The amplicons were separated by electrophoresis on an agarose gel and visualized under ultraviolet light. **Results:** Both in patients with CD and control groups, the AG genotype was more prevalent (50% vs 44,8%), followed by the AA genotype (26,4% vs 35,1%) and GG (23,6% vs 20,1%). The observed frequency of the G allele of the T300A polymorphism was higher in the group of patients with Crohn's disease (48,6%) than in controls (42,4%), although not reaching statistical significance. **Conclusions:** It was not possible to confirm the increased susceptibility conferred by polymorphisms T300A DC as reported in other studies.

**KEY-words:** Crohn's Disease, *ATG16L1*, T300A.

## INTRODUÇÃO

A Doença de Crohn (DC) caracteriza-se por um distúrbio inflamatório crônico e debilitante do trato gastrointestinal, manifestando-se através de distintas apresentações clínicas. Pode ocorrer em qualquer parte do trato digestivo, embora envolva mais comumente o íleo terminal, apresentando-se por meio de ulcerações descontínuas e transmuralis, frequentemente associada a estenoses e fístulas<sup>(4,7,10)</sup>.

Apesar de sua crescente incidência e prevalência, a compreensão dos mecanismos etiopatogênicos da DC permanece como grande desafio. Sabe-se, porém, que diversos fatores contribuem para o seu desenvolvimento, como fatores ambientais, microbiota intestinal, respostas imunes aberrantes e a predisposição genética individual<sup>(2,3,15,16,18)</sup>.

A partir da realização de estudos amplos do genoma (*Genome-wide Association Studies*; GWAS) foi possível identificar um gene de aparente grande relevância na DC denominado como *ATG16L1* (*autophagy-related 16-like 1*) cujo produto desempenha um importante papel na resposta imune inata e na resistência aos patógenos intracelulares<sup>(9,13,14)</sup>.

Vários polimorfismos têm sido identificados no gene *ATG16L1*, destacando-se o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) T300A (rs2241880), o que parece conferir um aparente maior risco ao desenvolvimento de doenças inflamatórias intestinais (DII)<sup>(3,5,8,17,19)</sup>.

Considerando os poucos dados disponíveis referentes à população brasileira, o objetivo deste estudo foi analisar o papel do polimorfismo T300A do gene *ATG16L1* como possível fator predisponente para a ocorrência de DC.

## MÉTODOS

*Pacientes* - Foram analisadas 145 amostras únicas de sangue de pacientes com diagnóstico confirmado de DC coletadas entre 2011 e 2012, destas 106 foram incluídas e 39 excluídas devido a dificuldades técnicas. Os pacientes foram recrutados em cinco centros de referência para tratamento desta doença, a saber, Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital São José, Joinville/SC (n=40); Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais da Universidade do Vale do Itajaí – Univali, Itajaí/SC (n=21); Serviço de Coloproctologia do Hospital Universitário Cajuru (SeCoHUC) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUCPR, Curitiba/PR (n=32); Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná – HC/UFPR, Curitiba/PR (n=9); e Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais do Hospital Santa Isabel, Blumenau/SC (n=4). A inclusão se deu de forma consecutiva, independentemente da faixa etária, gênero, cor de pele, estado geral de saúde e classe social dos pacientes.

*Controles* – Foram obtidas amostras de sangue de 239 doadores voluntários do Hemocentro Regional de Joinville (HEMOSC), no mesmo período. Foram excluídos doadores com parentesco consanguíneo.

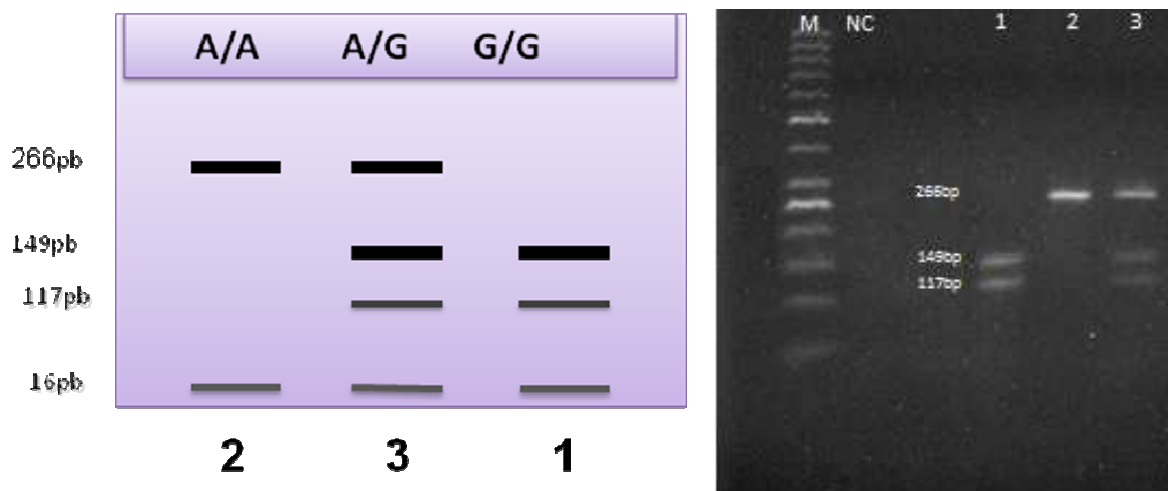
*Obtenção do DNA* - As amostras de sangue periférico dos pacientes portadores de DC foram obtidas através de lesão puntiforme em um dos dedos da mão, seguido de coleta e armazenamento em FTA Elute Micro Card® (Whatman, Kent, UK). A extração do DNA genômico foi realizada conforme especificações do fabricante do cartão. Os procedimentos de extração e purificação do DNA genômico das amostras correspondentes ao grupo controle foram realizados empregando-se o kit Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), segundo as instruções do fabricante.

*Genotipagem do SNP T300A (rs2241880)* - A metodologia empregada para a genotipagem do SNP T300A foi baseada no estudo de Csongei e cols<sup>(5)</sup>, consistindo na amplificação parcial da rs2241880 via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), seguido da discriminação alélica via RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Em cada reação de PCR (50 µL) utilizou-se 1µL dNTP's (10mM), 0,2µL Platinum® Taq DNA Polimerase (5U/ µL; Invitrogen, São Paulo, Brasil), 5 µL tampão de reação (10x), 1,5 µL cloreto de magnésio (50mM), 1 µL de cada *primer* (10pmol/reação; F-CTCTGTCACCATATCAAGCGTGG e R-TCTAGAAGGACAGGCTATCAACAGATG; Eurofins MWG Operon, Huntsville, EUA) e 2µL de DNA (50 a 500ng). As amplificações foram obtidas nas seguintes condições de reação: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento por 40 segundos a 55°C e extensão a 72°C por 40 segundos, finalizando com extensão a 72°C por 7 minutos. A termociclagem foi conduzida em aparelho XP Thermal Cycler (BIOER technology Co, Tóquio, Japão).

Após a PCR, procedeu-se a digestão dos *amplicons* com a endonuclease *LweI* (Fermentas, Burlington, EUA) a 37°C durante 1 hora, segundo instruções do fabricante. Os fragmentos obtidos foram separados via eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo brometo de etídeo (0,5µL/mL), e conferidos através de exposição à luz ultravioleta. A figura 1 exemplifica os padrões eletroforéticos correspondentes a cada genótipo.

*Análise Estatística* - Para a análise descritiva da amostra do estudo foram utilizadas proporções para variáveis categóricas e média e desvios padrão para variáveis contínuas. A associação dos genótipos e alelos com a susceptibilidade à DC foi verificada utilizando-se o software HDS, com base em tabelas de contingência 2x2, através do indicador Odds Ratio, adotando-se um intervalo de Confiança de 95% e considerando-se significantes os valores de *p* inferiores a 0,05.

*Considerações Éticas* – Os pacientes foram incluídos no estudo somente após explicitação dos objetivos do trabalho e obtenção autorização via assinatura em Termo de Consentimento Livre e Esclarecido específico. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade da Região de Joinville – Univille (processo nº 042/11), conforme normas brasileiras de ética em pesquisa com seres humanos.



**FIGURA 1.** Perfil eletroforético correspondente às homozigoses GG (1) e AA (2) e heterozigose AG (3) do polimorfismo T300A do gene *ATG16L1*. M: padrão de tamanho molecular (100 bp Ladder, Fermentas, Ontario, Canadá); NC: controle negativo.

## RESULTADOS

Dos 106 pacientes estudados, 56 eram do sexo feminino e 50 do sexo masculino com uma média etária de 41,4 ( $\pm 12,7$ ) anos. As características clínicas estão apresentadas na tabela 1. Na análise das frequências genótípicas relativas ao SNP T300A, observamos uma maior frequência do genótipo heterozigoto (50%) quando comparado aos genótipos homozigotos AA (26,4%) e GG (23,6%). Em relação à frequência alélica, houve discreto predomínio do alelo A (51,4%) (Tabela 2).

O grupo controle totalizou 239 voluntários, com idade média de 32 ( $\pm 10,6$ ) anos e predominância do gênero masculino (67,7%). Segundo os resultados da genotipagem, observou-se uma maior frequência do genótipo heterozigoto (44,8%) quando comparado aos genótipos homozigotos AA (35,1%) e GG (20,1%). Em relação à frequência alélica, também houve um predomínio do alelo A no grupo controle (57,3%), não apresentando diferenças estatisticamente significantes.



**TABELA 1.** Características Clínicas dos Pacientes Portadores de Doença de Crohn.

| <b>Características Clínicas</b>            | <b>Total n (%)</b> |
|--|--------------------|
| <b>Sexo</b>                                |                    |
| Feminino                                   | 56 (52,8%)         |
| Masculino                                  | 50 (47,2%)         |
| <b>Idade</b>                               | 41,4 ( $\pm$ 12,7) |
| <b>História Familiar Positiva</b>          | 12 (11,3%)         |
| <b>Localização da Doença</b>               |                    |
| Intestino Delgado                          | 30 (28,3%)         |
| Colônica                                   | 24 (22,6%)         |
| Ileocólica                                 | 49 (46,2%)         |
| Perianal                                   | 26 (24,5%)         |
| Outras (oral/ofthalmológica)               | 2 (1,9%)           |
| <b>Comportamento Clínico</b>               |                    |
| Não estenosante/não fistulizante           | 39 (36,8%)         |
| Estenosante                                | 33 (31,1%)         |
| Fistulizante                               | 41 (38,6%)         |
| <b>Necessidade de Ressecção Intestinal</b> | 43 (40,5%)         |

**TABELA 2.** Frequências genótípicas, alélicas e análise associativa - rs2241880

|                 | <b>Controles<br/>(n = 238)</b> | <b>DC<br/>(n = 106)</b> | <b>Comparação</b> | <b>OR (CI 95%)</b>    | <b>p</b> |
|-----------------|--------------------------------|-------------------------|-------------------|-----------------------|----------|
| <b>Genótipo</b> |                                |                         |                   |                       |          |
| <b>AA</b>       | 84 (35.3%)                     | 28 (26.4%)              |                   |                       |          |
| <b>AG</b>       | 106 (44.5%)                    | 53 (50.0%)              | GG+AG vs. AA      | 1.519 (0.889 - 2.606) | 0.134    |
| <b>GG</b>       | 48 (20.2%)                     | 25 (23.6%)              | GG vs. AG+AA      | 1.222 (0.68 - 2.188)  | 0.566    |
| <b>Alelo</b>    |                                |                         |                   |                       |          |
| <b>A</b>        | 274 (57.6%)                    | 109 (51.4%)             |                   |                       |          |
| <b>G</b>        | 202 (42.4%)                    | 103 (48.6%)             | G vs. A           | 1.282 (0.914 - 1.797) | 0.157    |

## DISCUSSÃO

O grande avanço tecnológico ocorrido ao longo dos últimos anos, principalmente na última década, permitiu o desenvolvimento de técnicas de análise da biologia molecular dos tecidos e trouxe, também, uma renovação de esperanças quanto à possibilidade de obtenção de respostas na área das doenças inflamatórias intestinais<sup>(13)</sup>.

Embora agregados familiares tenham sido descritos na DC, genes considerados fatores de susceptibilidade não foram apontados antes de 2001, quando identificou-se o *NOD2/CARD15*<sup>(11)</sup>. A genética das DII e, principalmente da DC obteve um grande avanço com a publicação dos resultados do primeiro GWAS direcionado a tais enfermidades<sup>(6)</sup>. A partir deste, diversos novos locus de susceptibilidade foram identificados, dentre estes o gene *ATG16L1*, descrito por Hampe e cols<sup>(9)</sup>. Vários polimorfismos e alterações somáticas têm sido identificados no gene *ATG16L1*, destacando-se o SNP T300A (rs2241880), cujo alelo G a qual parece conferir um maior risco ao desenvolvimento de DII<sup>(3,5,8,17,19)</sup>.

Zhang e cols<sup>(19)</sup> realizaram uma extensa meta-análise visando compreender o papel do polimorfismo T300A do gene *ATG16L1* como fator de susceptibilidade para DC envolvendo 24 estudos que totalizaram 13.022 casos e 17.532 controles. Os autores detectaram uma associação positiva em caucasianos, não sendo possível confirmar o mesmo resultado em asiáticos, sugerindo uma diferença possivelmente relacionada à variação de origem étnica. Esta hipótese foi reforçada pela observação de que a frequência do alelo G mostrou-se diferente entre estas populações.

Em 2010, Cheng e cols publicaram outra meta-análise incluindo populações asiáticas, americanas, europeias e da Oceania. Nesta meta-análise, os autores confirmaram uma associação positiva entre o SNP T300A e a susceptibilidade à DC. Dois outros estudos também publicados em 2010 corroboraram tal resultado<sup>(5,8)</sup>.

São escassos os dados referentes à distribuição das variantes do SNP T300A do gene *ATG16L1* na população brasileira. O único estudo do qual se tem conhecimento, publicado em 2008, a partir da análise de 180 pacientes portadores de DC, encontrou as seguintes frequências genóticas: AA – 22,2%, AG – 54,2% e GG – 25,5%.<sup>(1)</sup> Estes dados são compatíveis com os resultados obtidos no presente trabalho, no qual também não se pode confirmar associação significativa entre o polimorfismo T300A e a DC. Também não se encontrou diferenças estatísticas quando comparados casos e controles.

Comparando o presente estudo com os trabalhos já publicados (Tabela 3), constata-se compatibilidade de resultados quanto ao genótipo de maior frequência: AG<sup>(1,5,7,12)</sup>. Porém, observa-se divergência entre a maior frequência dos genótipos homozigotos em diferentes populações como mencionado por Zhang e cols<sup>(19)</sup>.

Nossos resultados não acompanharam a tendência mundial que demonstra aumento de susceptibilidade para DC em portadores do genótipo GG da rs2241880 em diversas populações<sup>(3,5,8,7,12,19)</sup>. Acreditamos que a variabilidade genética de nossa população, assim como o tamanho limitado da casuística quando comparado a outros estudos populacionais possam ter influenciado nossos resultados.

Ressaltamos, contudo, que investigações adicionais relacionadas ao SNP T300A e aos demais genes de susceptibilidades associados à DC devam ser realizados na população brasileira e, desse modo, contribuir com dados adicionais à literatura para fins de elucidação da fisiopatologia e das correlações clínicas e terapêuticas da doença.

**TABELA 3.** Distribuição Genotípica do Polimorfismo T300A Observada em Diferentes Populações com Doença de Crohn e Controles.

|  | Doença de Crohn |               |             |             | Controles |              |             |             |
|--|-----------------|---------------|-------------|-------------|-----------|--------------|-------------|-------------|
|  | <i>n</i>        | Genótipos/(%) |             |             | <i>n</i>  | Genótipo/(%) |             |             |
|  |                 | AA            | AG          | GG          |           | AA           | AG          | GG          |
| Presente<br>Estudo<br>(2013)<br>Brasil | 106             | 28 (26,4%)    | 53 (50%)    | 25 (23,6%)  | 239       | 84 (35,1%)   | 106 (44,8%) | 49 (20,1%)  |
| Baptista<br>(2008)<br>Brasil           | 180             | 40 (22,2%)    | 94 (52,2%)  | 46 (25,5%)  | 189       | 57 (30,1%)   | 90 (47,6%)  | 42 (22,2%)  |
| Csöngéi<br>(2010)<br>Hungria           | 315             | 56 (16,2%)    | 151 (47,9%) | 108 (34,2%) | 314       | 72 (22,9%)   | 163 (46,2%) | 17 (5,4%)   |
| Márquez<br>(2009)<br>Espanha           | 344             | 63 (18,3%)    | 156 (45,3%) | 125 (36,3%) | 745       | 177 (23,7%)  | 347 (46,5%) | 221 (29,6%) |
| Fowler<br>(2008)<br>Austrália          | 823             | 133 (16,1%)   | 388 (47,1%) | 302 (36,6%) | 1664      | 425 (25,5%)  | 790 (47,4%) | 449 (26,9%) |

## AGRADECIMENTOS

Aos colegas médicos colaboradores deste trabalho: Harry Kleinubing Júnior, Paulo Gustavo kotze, Éverson Fernando Mallutta, Juliano Coelho Ludvig, Antônio Baldin Júnior e Maria Gabriela Lazcano Alves Ferreira a que contribuíram para realização deste projeto com envio de dados e amostras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baptista ML, Amarante H, Picheth G, Sdepanian VL, Peterson N, Babasukumar U. CARD15 and IL23R influences Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population. *Inflamm bowel dis.* 2008;14(5):674–9.
2. BRASIL. Portal da Saúde. Doença de Crohn. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=23529](http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23529)>. Acesso em: 15/07/2012.
3. Cheng JF. T300A polymorphism of ATG16L1 and susceptibility to inflammatory bowel diseases: A meta-analysis. *WJG.* 2010;16(10):1258.
4. Crohn BB, Ginzburg L, Oppenheimer GD. Regional Ileitis: A Pathologic and Clinical Entity. *JAMA.* 1932 Oct 15;99(16):1323–9.
5. Csöngéi V. Interaction of the major inflammatory bowel disease susceptibility alleles in Crohn's disease patients. *WJG.* 2010;16(2):176.
6. Duerr RH. Genome-wide association studies herald a new era of rapid discoveries in inflammatory bowel disease research. *Gastroenterology.* 2007;132(5):2045–9.
7. Fowler EV, Doecke J, Simms LA, Zhao ZZ, Webb PM, Hayward NK, Whiteman C, Florin TH, Montgomery GW, Cavanaugh JA, Radford-Smith GH. ATG16L1 T300A shows strong associations with disease subgroups in a large Australian IBD population: further support for significant disease heterogeneity. *AJG.* 2008;103(10):2519–26.
8. Gazouli M. NOD2 / CARD15 , ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease. *WJG.* 2010;16(14):1753.

9. Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, Till A, Teuber M, Huse K, Albrecht M, Mayr G, De La Vega FM, Briggs J, Gunther S, Prescott NJ, Onnie CM, Hasler R, Sipos B, Folsch U, Lengauer T, Platzer M, Mathew CG, Krawczak M, Schreiber S. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat genet.* 2007;39(2):207–11.
10. Koltum WA. Inflammatory Bowel Disease: Diagnosis and Evaluation. *The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery.* 2007: 544.
11. Kucharzik T, Maaser C, Lügering A, Kagnoff M, Mayer L, Targan S. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. *Inflamm bowel dis.* 2006;12(11):1068–83.
12. Marquez A, Nunes C, Martinez A, Mendonza JL, Taxonera C, Fernandez-Arquero M, Diaz-Rubio M, Concha EG, Urcelay E. Role of ATG16L1 Thr300Ala Polymorphism in Inflammatory Bowel Disease: A Study in the Spanish Population and a Meta-analysis. *Inflamm bowel dis.* 2009; 15(2): 1697-1704.
13. Pinho M. A Biologia molecular das doenças inflamatórias intestinais. *Journal of Coloproctology.* 2008;28(1).
14. Plantinga TS, Crisan TO, Oosting M, van de Veerdonk FL, de Jong DJ, Philpott DJ. Crohn's disease-associated ATG16L1 polymorphism modulates pro-inflammatory cytokine responses selectively upon activation of NOD2. *Gut.* 2011;60(9):1229–35.
15. Scaldaferrri F, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis. *J Dig Dis.* 2007;8(4):171–8.
16. Schirbel A, Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. *J dig dis.* 2010;11(5):266-76.
17. Schmid D, Dengjel J, Schoor O, Stevanovic S, Münz C. Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany).* 2006;84(3):194–202.
18. Tsianos EV, Katsanos KH, Tsianos VE. Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. *WJG.* 2012;18(2):105–18.
19. Zhang H-F, Qiu L-X, Chen Y, Zhu W-L, Mao C, Zhu L-G, Zheng MH, Wang Y, Lei L, Shi J. ATG16L1 T300A polymorphism and Crohn's disease susceptibility: evidence from 13,022 cases and 17,532 controls. *Hum Genet.* 2009;125(5-6):627–31.

## 6. CONCLUSÕES

- Houve predominância do genótipo AG no grupo de pacientes portadores de DC, correspondendo a 50%, seguido do homozigoto AA, com 26,4%. O alelo A mostrou-se mais frequente nesta população, correspondendo a 51,4% das amostras analisadas;
- O genótipo AG e o alelo A mostraram-se mais prevalentes no grupo controle (44,5% e 57,6%, respectivamente).
- O alelo G mostrou-se mais prevalente no grupo de portadores de DC (48,6%) quando comparado aos indivíduos controles (42,4%), porém sem atingir significativa diferença estatística ( $P = 0.157$ , OR = 1.282 [0.914-1.797]).
- Ao contrário do encontrado em diversas publicações, não houve associação estatisticamente significativa entre o polimorfismo T300A (rs2241880) e a susceptibilidade à DC na população estudada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, S.E.A.; OLIVEIRA JR, O.; MOREIRA, J.P.T.; HABR-GAMA, A.; CERSKI C.T.S; CASERTA N.M.G. Doença de Crohn intestinal: manejo .**Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 57, n. 1, p. 10-13, 2011.

BAPTISTA, M. L.; AMARANTE, H.; PICHETH, G. et al. CARD15 and IL23R influences Crohn's disease susceptibility but not disease phenotype in a Brazilian population. **Inflammatory bowel diseases**, v. 14, n. 5, p. 674-9, 2008.

BEHRENDTS, C; SOWA, M. E.; GYGI, S. P.; WADE HARPER, J. Network organization of the human autophagy system. **Nature**, v. 466, p. 68-76, 2010.

BRASIL. **Portal da Saúde**. Doença de Crohn. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=23529](http://portal.saude.gov.br/saude/visualizar_texto.cfm?idtxt=23529)>. Acesso em: 15/07/2012.

CHENG, J.-F. T300A polymorphism of ATG16L1 and susceptibility to inflammatory bowel diseases: A meta-analysis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 10, p. 1258, 2010a.

CROHN, B. B.; GINZBURG, L.; OPPENHEIMER, G. D. REGIONAL ILEITIS: A PATHOLOGIC AND CLINICAL ENTITY. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 99, n. 16, p. 1323-1329, 1932.

CSÖNGEI, V. Interaction of the major inflammatory bowel disease susceptibility alleles in Crohn's disease patients. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 2, p. 176, 2010.

DUERR, R. H. Genome-wide association studies herald a new era of rapid discoveries in inflammatory bowel disease research. **Gastroenterology**, v. 132, n. 5, p. 2045-9, 2007.

ECONOMOU, M.; TRIKALINOS, T. A.; LOIZOU, K. T.; TSIANOS, E. V.; IOANNIDIS, J. P. A. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. **The American journal of gastroenterology**, v. 99, n. 12, p. 2393-404, 2004.

FOWLER, E. V.; DOECKE, J.; SIMMS, L. A. et al. ATG16L1 T300A shows strong associations with disease subgroups in a large Australian IBD population: further support for significant disease heterogeneity. **The American journal of gastroenterology**, v. 103, n. 10, p. 2519-26, 2008.

GAZOULI, M. NOD2 / CARD15 , ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 14, p. 1753, 2010.

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. **Nature genetics**, v. 39, n. 2, p. 207-11, 2007.

KOLTUM, W.A. Inflammatory Bowel Disease: Diagnosis and Evaluation. **The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery**. 2007. P 544

KUCHARZIK, T.; MAASER, C.; LÜGERING, A. et al. Recent understanding of IBD pathogenesis: implications for future therapies. **Inflammatory bowel diseases**, v. 12, n. 11, p. 1068-83, 2006.

LICHTENSTEIN, G. R.; HANAUER, S. B.; SANDBORN, W. J. Management of Crohn's disease in adults. **The American journal of gastroenterology**, v. 104, n. 2, p. 465-83; quiz 464, 484, 2009.

LIMBERGEN, J. V.; STEVENS, C.; NIMMO, E. R.; WILSON, D. C.; SATSANGI, J. Autophagy: from basic science to clinical application. **Nature**, v. 2, n.4, 315-30, 2009.

LIVINE, B; YUAN, J. Autophagy in cell death: an innocent convict? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 9, p. 647-56, 2002.

MARQUEZ, A. et al. Role of ATG16L1 Thr300Ala Polymorphism in Inflammatory Bowel Disease: A Study in the Spanish Population and a Meta-analysis. **Inflammatory bowel diseases**, v.15, n.2, p1697-1704, 2009.

MCGOVERN, D. P. B.; HYSI, P.; AHMAD, T. et al. Association between a complex insertion/deletion polymorphism in NOD1 (CARD4) and susceptibility to inflammatory bowel disease. **Human molecular genetics**, v. 14, n. 10, p. 1245-50, 2005.

PINHO, M. A Biologia molecular das doenças inflamatórias intestinais. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 28, n. 1, 2008.

PLANTINGA, T. S.; CRISAN, T. O.; OOSTING, M. et al. Crohn's disease-associated ATG16L1 polymorphism modulates pro-inflammatory cytokine responses selectively upon activation of NOD2. **Gut**, v. 60, n. 9, p. 1229-35, 2011.

RADFORD-SMITH, G.; PANDEYA, N. Associations between NOD2/CARD15 genotype and phenotype in Crohn's disease. Are we there yet? **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 12, n. 44, p. 7097-103, 2006.

RIIS, L.; VIND, I.; VERMEIRE, S. et al. The prevalence of genetic and serologic markers in an unselected European population-based cohort of IBD patients. **Inflammatory bowel diseases**, v. 13, n. 1, p. 24-32, 2007.

ROMÁN, A. L. S.; MUÑOZ, F. Comorbidity in inflammatory bowel disease. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 17, n. 22, p. 2723-33, 2011.

SANTHAT NIVATVONGS, S. E GORDON.P.H. Crohn's Disease. **Principles and practice of surgery for the colon, rectum, and anus / by Philip H. Gordon, Santhat Nivatvongs.** 3rd ed. 2007. P 820.

SARTOR, R. B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. **Nature clinical practice. Gastroenterology & hepatology**, v. 3, n. 7, p. 390-407, 2006.

SCALDAFERRI, F.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: progress and current concepts of etiopathogenesis. **Journal of digestive diseases**, v. 8, n. 4, p. 171-8, 2007.

SCHIRBEL, A.; FIOCCHI, C. Inflammatory bowel disease: Established and evolving considerations on its etiopathogenesis and therapy. **Journal of digestive diseases**, v. 11, n. 5, p. 266-76, 2010.

SCHMID, D.; DENGJEL, J.; SCHOOR, O.; STEVANOVIC, S.; MÜNZ, C. Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. **Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)**, v. 84, n. 3, p. 194-202, 2006.

TSIANOS, E. V.; KATSANOS, K. H.; TSIANOS, V. E. Role of genetics in the diagnosis and prognosis of Crohn's disease. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 18, n. 2, p. 105-18, 2012.

WANG, C.W. and KLIONSKY, D.J. The molecular mechanism of autophagy. **Molecular Medicine Journal**, v. 9, n 3-4, p 65-76, 2003.

ZHANG, H. F.; QIU, L. X.; CHEN, Y. et al. ATG16L1 T300A polymorphism and Crohn's disease susceptibility: evidence from 13,022 cases and 17,532 controls. **Human genetics**, v. 125, n. 5-6, p. 627-31, 2009.



## APÊNDICES

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor(a),

Por meio deste documento, você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) de uma pesquisa chamada “**Análise da incidência do polimorfismo T300A do gene ATG16L1 em pacientes portadores de Doença de Crohn**”. Esta pesquisa será realizada por uma equipe de pesquisadores da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE). Caso você não tenha condições de decidir livremente sobre si mesmo quanto a este convite (por exemplo, se for menor de idade), a palavra “você” deve ser entendida como “pai/mãe ou responsável legal pelo paciente” ao longo deste documento.

Este Termo traz todas as informações necessárias para que você possa decidir sobre sua participação. Por este motivo, é necessário que entenda porque a pesquisa será realizada e as consequências para você. Você pode usar o tempo que achar necessário para a leitura deste documento e para sua decisão, sendo permitido consultar outras pessoas de sua confiança. Caso necessário, sinta-se à vontade para fazer quaisquer perguntas para a pessoa que apresentou este convite a você, pois ele(a) está capacitado(a) a responder suas dúvidas. Se ao final da sua análise você decidir participar da pesquisa, você deverá confirmar sua decisão assinando ao término e na lateral (rubrica) das páginas deste documento. Este Termo será considerado o único documento que estabelece os compromissos entre os pesquisadores e você.

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Esta pesquisa visa estudar a doença chamada “DOENÇA DE CROHN”. Esta doença causa inflamações no intestino das pessoas, e podem causar vários sintomas como diarreia, sangramento, emagrecimento e outros mais. Estes sintomas podem ser leves em alguns casos e bastante graves em outros. Como não existe um remédio definitivo para esta doença, os pacientes precisam ser acompanhados durante toda a vida e alguns precisam ser operados para retirada de segmentos/parte do intestino.

Apesar de muitos estudos, até hoje não se sabe ao certo a causa desta doença. Entretanto, nos últimos anos levantou-se a suspeita de que algumas pessoas possam ter recebido de seus pais, geneticamente, fatores que venham facilitar a ocorrência desta doença ao longo da vida. O objetivo deste trabalho é estudar um destes fatores, que é uma variação em um gene chamado ATG16L1.

Queremos saber duas coisas:

1. Qual a quantidade de pessoas portadoras desta doença, como você, que apresentam este fator genético?
2. Qual a quantidade de pessoas saudáveis (sem a doença) que também apresentam este fator?

Você foi selecionado por seu médico para participar desta pesquisa por ser portador de Doença de Crohn.

### PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Caso concorde em participar da pesquisa, precisamos de sua autorização para coletar algumas gotas de seu sangue através de uma picada mínima na ponta de seu dedo, com uma agulha esterilizada. Isto deve causar um desconforto leve e passageiro no local, e a chance de causar outros sintomas é muito pequena.

Essa amostra será encaminhada ao Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE, em Joinville, onde será arquivada e analisada.

Na pesquisa atual somente serão investigadas as alterações do gene ATG16L1. Adicionalmente, pedimos sua autorização para armazenamento de seus dados e amostra de DNA por 5 anos, para a investigação de outras regiões do seu genoma (conjunto de informações genéticas individuais) no futuro. De qualquer forma, nenhuma outra pesquisa será realizada sem que você seja contatado, informado e dê seu consentimento por escrito. Além disso, este material somente será utilizado se o novo projeto for aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), quando for o caso.

Além desta amostra de sangue, seu médico nos enviará ainda um formulário contendo seu número de identificação e dados pessoais como idade, sexo, além de informações referentes às características clínicas de sua doença. Seu nome não nos será enviado, apenas as suas iniciais, para registro.

Todos os resultados, dados pessoais e demais informações coletadas serão rigorosamente mantidos em sigilo e todos os participantes serão mantidos sob anonimato em quaisquer divulgações desta pesquisa. É garantido seu direito de ser informado quanto ao resultado do exame, se assim desejar. Em caso de quaisquer dúvidas relativas à pesquisa, você poderá contatar os responsáveis (vide nomes e formas de contato ao final deste documento) antes, durante ou após a conclusão da sua participação.

Os Resultados da pesquisa serão publicados em forma de artigo científico, em revista especializada.

Não haverá compensação (pagamento) financeira pela sua participação ou ressarcimento de despesas, mas ao participar da pesquisa você estará colaborando para que possamos entender mais estas doenças e conhecer suas causas.

Nenhum procedimento da pesquisa trará custos a você ou ao sistema de saúde.

**A participação em qualquer pesquisa é voluntária.** Você não será prejudicado(a), de forma alguma, caso decida pela não participação ou desistência a qualquer momento. Você também tem o direito de pedir que seus dados genéticos ou sua amostra sejam destruídos a qualquer momento.

**Atenção:** A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE. Endereço: Endereço – Paulo Malschitzki, 10 - Bairro Zona Industrial - Campus Universitário - CEP 89.219-710 -Joinville/ SC, Fone: 3461-9235.

Eu, \_\_\_\_\_ (nome), após ter lido (ou terem lido para mim) e compreendido este termo, tenho consciência de que não haverá remuneração de qualquer natureza e que poderei retirar meu

*consentimento a qualquer momento. Autorizo o armazenamento de minha amostra de DNA para pesquisas futuras, desde que seja informado sobre os objetivos, riscos e benefícios destas novas pesquisas. Uma cópia deste documento será entregue a mim e outra permanecerá arquivada com os responsáveis pela pesquisa. Uma vez que meus questionamentos foram satisfeitos, autorizo livremente minha participação na pesquisa "Análise da incidência do polimorfismo T300A do gene ATG16L1 em pacientes portadores de Doença de Crohn".*

---

Assinatura do Participante  
Pesquisador

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_\_

---

Assinatura do Responsável

---

Assinatura do

Responsáveis pela pesquisa:

Mauro de Souza Leite Pinho

Bruno Lorenzo Scolaro

Instituição: Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE

Fone: (47) 34619197

## APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor(a),

Por meio deste documento, você está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) de uma pesquisa chamada “**Análise da incidência do polimorfismo T300A do gene ATG16L1 em pacientes portadores de doença de Crohn**”. Esta pesquisa será realizada por uma equipe de pesquisadores da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE). Caso você não tenha condições de decidir livremente sobre si mesmo quanto a este convite (por exemplo, se for menor de idade), a palavra “você” deve ser entendida como “pai/mãe ou responsável legal pelo paciente” ao longo deste documento.

Este Termo traz todas as informações necessárias para que você possa decidir sobre sua participação. Por este motivo, é necessário que entenda porque a pesquisa será realizada e as consequências para você. Você pode usar o tempo que achar necessário para a leitura deste documento e para sua decisão, sendo permitido consultar outras pessoas de sua confiança. Caso necessário, sinta-se à vontade para fazer quaisquer perguntas para a pessoa que apresentou este convite a você, pois ele(a) está capacitado(a) a responder suas dúvidas. Se ao final da sua análise você decidir participar da pesquisa, você deverá confirmar sua decisão assinando ao término e na lateral (rubrica) das páginas deste documento. Este Termo será considerado o único documento que estabelece os compromissos entre os pesquisadores e você.

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Esta pesquisa visa estudar a doença chamada “DOENÇA DE CROHN”. Esta doença causa inflamações no intestino das pessoas e pode causar vários sintomas como diarreia, sangramento, emagrecimento e outros mais. Estes sintomas podem ser leves em alguns casos e bastante graves em outros, podendo até, raramente, levar à morte. Como não existe um remédio definitivo para estas doenças, os pacientes precisam ser tratados durante toda a vida e alguns precisam ser operados para retirada de segmentos do intestino.

Apesar de muitos estudos, até hoje não se sabe ao certo a causa destas doenças. Entretanto, nos últimos anos levantou-se a suspeita de que algumas pessoas possam ter recebido de seus pais, geneticamente, fatores que venham a facilitar para que estas doenças ocorram ao longo da vida. O objetivo deste trabalho é estudar um destes fatores, que é uma variação em um gene chamado ATG16L1.

Queremos saber duas coisas:

1. Qual a quantidade de pessoas portadoras desta doença que apresentam estes fatores genéticos?
2. Qual a quantidade de pessoas saudáveis, como você (sem a doença) que também apresentam estes fatores?

### PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Caso concorde em participar da pesquisa, precisamos de sua autorização para utilizar um pouco da amostra de sangue já coletado pelo HEMOSC. Não será

coletado sangue adicional, ou seja, não será coletada maior quantidade de sangue do que a necessária para sua doação.

Os riscos e a ocorrência de dor, inchaço ou infecção no local da coleta são apenas aqueles inerentes à doação de sangue, sem risco adicional.

Essa amostra será encaminhada ao Laboratório de Biologia Molecular da UNIVILLE onde será arquivada e analisada.

Na pesquisa atual somente serão investigadas as alterações do gene ATG16L1. Adicionalmente, pedimos sua autorização para armazenamento de seus dados e amostra de DNA por 5 anos, para a investigação de outras regiões do seu genoma (conjunto de informações genéticas individuais) no futuro. De qualquer forma, nenhuma outra pesquisa será realizada sem que você seja contatado, informado e dê seu consentimento por escrito. Além disso, este material somente será utilizado se o novo projeto for aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), quando for o caso.

Além desta amostra de sangue, precisaremos também registrar os dados pessoais que você já informou ao HEMOSC, como seu nome, endereço, idade, sexo e cor. Todos os resultados, dados pessoais e demais informações coletadas serão rigorosamente mantidos em sigilo e todos os participantes serão mantidos sob anonimato em quaisquer divulgações desta pesquisa. É garantido seu direito de ser informado quanto ao resultado do exame, se assim desejar. Em caso de quaisquer dúvidas relativas à pesquisa, você poderá contatar os responsáveis (vide nomes e formas de contato ao final deste documento) antes, durante ou após a conclusão da sua participação.

Os Resultados da pesquisa serão publicados em forma de artigo científico, em revista especializada.

Não haverá compensação (pagamento) financeira pela sua participação ou ressarcimento de despesas. Nenhum procedimento da pesquisa trará custos a você ou ao sistema de saúde.

**A participação em qualquer pesquisa é voluntária.** Você não será prejudicado(a), de forma alguma, caso decida pela não participação ou desistência a qualquer momento. Você também tem o direito de pedir que seus dados genéticos ou sua amostra sejam destruídos a qualquer momento.

**Atenção:** A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE. Endereço: Endereço – Paulo Malschitzki, 10 - Bairro Zona Industrial - Campus Universitário - CEP 89.219-710 -Joinville/ SC, Fone: 3461-9235.

*Eu, \_\_\_\_\_ (nome), após ter lido (ou terem lido para mim) e compreendido este termo, tenho consciência de que não haverá remuneração de qualquer natureza e que poderei retirar meu consentimento a qualquer momento. Autorizo o armazenamento de minha amostra de DNA para pesquisas futuras, desde que seja informado sobre os objetivos, riscos e benefícios destas novas pesquisas. Uma cópia deste documento será entregue a mim e outra permanecerá arquivada com os responsáveis pela pesquisa. Uma vez que meus questionamentos foram satisfeitos, autorizo livremente minha participação*

na pesquisa **“Análise da incidência do polimorfismo T300A do gene ATG16L1 em pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais”**.

---

Assinatura do Participante  
Pesquisador

Assinatura do Responsável

Assinatura do

Data: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_

Responsáveis pela pesquisa:

Mauro de Souza Leite Pinho

Bruno Lorenzo Scolaro

Instituição: Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE

Fone: (47) 34619197