



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Renata de Sá Brito Fróes

**Estudo dos polimorfismos C1236T, G2677T e C3435T do gene MDR1 em
pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais**

Rio de Janeiro

2013

Renata de Sá Brito Fróes

Estudo dos polimorfismos C1236T, G2677T e C3435T do gene MDR1 em pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadores: Prof.^a Dra. Ana Teresa Pugas Carvalho
Prof. Dr. Heitor Siffert Pereira de Souza

Rio de Janeiro

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F926 Fróes, Renata de Sá Brito.
Estudo dos polimorfismos C1236T, G2677T e C3435T do gene
MDR1 em pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais
/ Renata de Sá Brito Fróes. – 2013.
60 f.: il.

Orientadora: Ana Teresa Pugas Carvalho.

Orientadora: Heitor Siffert Pereira de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências
Médicas.

1. Intestinos – Doenças inflamatórias – Teses. 2. Intestinos –
Inflamação – Teses. 3. Polimorfismo (Genética). I. Carvalho, Ana
Teresa Pugas. II. Souza, Heitor Siffert Pereira de. III. Universidade do
Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.34

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Renata de Sá Brito Fróes

Estudo dos polimorfismos C1236T, G2677T e C3435T do gene MDR1 em pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de janeiro de 2013.

Orientadores: Prof.^a Dra. Ana Teresa Pugas Carvalho
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ
Prof. Dr. Heitor Siffert Pereira de Souza
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gerson Ricardo de Souza Domingues
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Tatiana de Almeida Simão
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Antonio Jose de Vasconcellos Carneiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Rio de Janeiro

2013

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos que mais dou trabalho. À minha família, pelo apoio incondicional e estímulo em todas as horas. Especialmente mãe, pai, irmão e avós: vocês fazem toda a diferença na minha vida. Meu amor maior e minha gratidão eterna a vocês sempre.

AGRADECIMENTOS

Aos orientadores, Ana Teresa e Heitor, por todo o suporte, incentivo, compreensão e especialmente por terem sido incansáveis. Tenho orgulho de ter sido orientada por vocês.

À Bárbara, por dividir, somar, multiplicar. Não seria igual sem você.

Ao Davy, Tatiana e Ana Braunstein pela fundamental participação. Obrigada pela paciência e parceria.

Ao Antônio José, Luis Felipe, Juliana, Pedro, Ronir e equipes do ambulatório de DII do HUPE, HSE, HUCFF e laboratório de toxicologia e biologia molecular da UERJ, agradeço imensamente a colaboração.

Ao Gerson, meu obrigado por ter aceitado o convite para apreciação.

Aos colegas do GEDIERJ fica a minha contribuição.

Aos meus amigos agradeço muito, pelo carinho sem fim e por SEMPRE acreditarem, em especial a Fabiana e Maria Helena, por irem além da torcida.

RESUMO

FRÓES, Renata de Sá Brito. *Estudo dos polimorfismos C1236T, G2677T e C3435T do gene MDR1 em pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais*. 2013. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Estudos recentes têm avaliado a presença de polimorfismos do gene multidroga resistente 1 (MDR1), que codifica o transportador de membrana de efluxo chamado de P-glicoproteína, seu potencial papel na suscetibilidade das doenças inflamatórias intestinais (DII) e suas possíveis correlações com aspectos clínicos das DII. Dados conflitantes podem resultar da análise genética de populações distintas. Investigamos se os polimorfismos do gene MDR1 estão associados com as DII em população do sudeste do Brasil e suas possíveis correlações com fenótipos, atividade de doença, resposta ao tratamento e efeitos colaterais. Como métodos, a presente pesquisa trabalhou com 146 pacientes com Doença de Crohn (DC) e 90 com Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI), que foram recrutados através de critérios diagnósticos estabelecidos. Os polimorfismos do MDR1 mais comumente descritos na literatura, C1236T, G2677T e C3435T, foram avaliados por PCR. As frequências genótípicas de pacientes com RCUI e DC foram analisadas na população de estudo. Associações de genótipo-fenótipo com características clínicas foram estabelecidas e riscos estimados para as mutações foram calculados. Nenhuma diferença significativa foi observada nas frequências genótípicas para os polimorfismos G2677T/A e C3435T do *MDR1* na DC ou na RCUI. O polimorfismo C1236T foi significativamente mais comum na DC do que na RCUI ($p = 0,036$). Na RCUI foram encontrados mais homens nos polimorfismos C1236T e G2677T no grupo de heterozigotos. Foram encontradas associações significativas entre o polimorfismo C3435T do gene *MDR1* em pacientes com fenótipo estenosante na DC (OR: 3,16, $p = 0,036$), em oposição ao comportamento penetrante (OR: 0,31, $p = 0,076$). Na DC, associações positivas também foram encontradas entre o polimorfismo C3435T, à atividade moderada/severa da doença (OR: 3,54, $p = 0,046$), e à resistência / refratariedade ao corticosteróide (OR: 3,29, $p = 0,043$) nos homozigotos polimórficos. Nenhuma associação significativa foi encontrada entre os polimorfismos do *MDR1* e categorias fenotípicas, atividade de doença ou resposta ao tratamento da RCUI. Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem que os polimorfismos do gene *MDR1* poderiam estar implicados na susceptibilidade a DC e no seu fenótipo estenosante, como também estarem associados com uma resposta inadequada ao tratamento em um grupo de pacientes com DC. A forte relação com a DC suporta a existência de papéis adicionais para o *MDR1* em mecanismos específicos subjacentes na patogênese da DC, como o controle da microbiota intestinal, mediação e regulação da fibrose. Além disso, compreender os efeitos de vários fármacos associados a estas variantes do *MDR1* pode contribuir para a prescrição personalizada de regimes terapêuticos.

Palavras-chave: Doença inflamatória intestinal. Gene MDR1. Polimorfismos.

ABSTRACT

FRÓES, Renata de Sá Brito. *Study of C1236T, G2677T, C3435T MDR1 gene polymorphisms in patients with inflammatory bowel disease*. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013.

Recent studies have evaluated the presence of multidrug resistant gene 1 polymorphisms (MDR1) that encodes the efflux membrane transporter called P-glycoprotein, its potential role in susceptibility to inflammatory bowel disease (IBD) and possible correlations with clinical features of IBD. Conflicting data may result from genetic analysis of distinct populations. We investigated whether polymorphisms of MDR1 gene are associated with IBD in the population of southeastern Brazil and its possible correlations with phenotypes, disease activity, response to treatment and side effects. As methods, this research worked with 146 patients with Crohn's Disease (CD) and 90 with Idiopathic Ulcerative Colitis (UC) who were recruited through established diagnostic criteria. The polymorphisms of MDR1 most commonly described in the literature, C1236T, G2677T and C3435T, were evaluated by PCR. The genotypic frequencies of patients with UC and DC were analyzed in the study population. Genotype-phenotype associations with clinical characteristics were established and estimated risks for the mutations were calculated. No significant difference was observed in genotype frequencies for polymorphisms G2677T / A and C3435T of MDR1 in DC or UC. The C1236T polymorphism was significantly more common in CD than in UC ($p = 0.036$). At UC, C1236T and G2677T polymorphisms were found more in men in the group of heterozygotes. Significant associations were found between the C3435T polymorphism of the MDR1 gene in patients with stricturing phenotype in CD (OR: 3.16, $p = 0.036$), as opposed to penetrating behavior (OR: 0.31, $p = 0.076$). In DC, positive associations were also found between the C3435T polymorphism, activity moderate / severe disease (OR: 3.54, $p = 0.046$), and resistance to corticosteroids (OR: 3.29, $p = 0.043$) in the polymorphic homozygote group. No significant association was found between polymorphisms of MDR1 and phenotypic classes of disease activity or response to treatment of UC. In conclusion, the present results suggest that MDR1 gene polymorphisms could be involved in susceptibility to DC and stricturing phenotype, as well as being associated with an inadequate response to treatment in a group of patients with CD. The strong evidence with DC supports the existence of additional roles for MDR1 specific mechanisms underlying the pathogenesis of DC, such as regulating gut-microbiota interactions and mediating fibrosis. Further, understanding the effects of different drugs associated with these variants can contribute to the MDR1 custom prescription regimens.

Keywords: Inflammatory bowel disease. MDR1 gene. Polymorphisms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema A - Formas de tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais	30
Figura 1 - Exemplo de cromatograma do polimorfismo C1236T: À esquerda a sequência selvagem agggCc e à direita o polimorfismo com troca de citosina por timina e sequência agggTc.....	38
Figura 2 – Exemplo de cromatograma do polimorfismo C1236T demonstrando uma sobreposição de curvas de citosina e timina, indicativa de indivíduo heterozigoto.....	39
Gráfico 1 - Localização da Doença de Crohn (n=146).....	43
Gráfico 2 - Formas de apresentação predominantes encontradas nos pacientes com Doença de Crohn(n=146).....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Índice de atividade da doença na Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI).....	22
Tabela 2 - Classificação de Montreal (2005) para Doença de Crohn.....	23
Tabela 3 - Pares de oligonucleotídeos senso e antisenso dos exons 12, 21 e 26 do gene MDR1.....	36
Tabela 4 - Polimorfismos MDR1 C1236T , G2677T/A, e C3435T distribuídos pela frequência dos alelos em equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	41
Tabela 5 - Análise dos polimorfismos do gene MDR1 no diagnóstico diferencial das doenças inflamatórias intestinais.....	42
Tabela 6 - Associações genótipo - fenótipo de C1236T do MDR1 em pacientes com Doença de Crohn.....	44
Tabela 7 - Associações genótipo- fenótipo de G2677T/A do MDR1 em pacientes com Doença de Crohn.....	45
Tabela 8 - Associações genótipo-fenótipo de C3435T do MDR1 em pacientes com Doença de Crohn.....	46
Tabela 9 - Associações genótipo - fenótipo de C1236T do MDR1 em pacientes com Retocolite Ulcerativa Idiopática.....	47
Tabela 10 - Associações genótipo - fenótipo de G2677T/A do MDR1 em pacientes com Retocolite Ulcerativa Idiopática.....	47
Tabela 11 - Associações genótipo - fenótipo de C3435T do MDR1 em pacientes com Retocolite Ulcerativa Idiopática.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-ASA	Mesalazina
AZA	Azatioprina
DC	Doença de Crohn
DII	Doenças inflamatórias intestinais
EP4	Prostaglandina E de receptor 4
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IL	Interleucina
MDR1	Gene multidroga resistente 1
NCI	National Cancer Institute
Pg-P	Glicoproteína P
PTGER4 receptor 4	Polimorfismos nas proximidades do gene que codifica a prostaglandina E de receptor 4
RCUI	Retocolite ulcerativa idiopática
RNM	Ressonância nuclear magnética
SNP	Single nucleotide polymorphisms ou polimorfismo de única base
SSZ	Sulfassalazina
TC	Tomografia computadorizada
TNF	Fator de necrose tumoral
UERJ	Universidade Estadual do Rio de Janeiro

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	OBJETIVOS	14
1.1	Principal	14
1.2	Secundários	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	Bases imunológicas e fisiopatológicas	15
2.2	Fatores ambientais	15
2.3	Fatores genéticos	16
2.4	Fatores luminais	19
2.5	Fatores relacionados à barreira intestinal: permeabilidade imunidade intestinal e inata	19
2.6	Fatores relacionados à imunoregulação da mucosa: imunidade adquirida.	20
2.7	Classificação das DII	21
2.8	O gene <i>MDRI</i>	24
2.9	Tratamento Clínico	27
2.9.1	<u>Tratamento de indução e manutenção segundo atividade de doença na RCUI</u>	28
2.9.2	<u>Tratamento de indução e manutenção na DC</u>	29
2.9.2.1	DC com predomínio da forma inflamatória/ulcerativa	29
2.9.2.2	DC com predomínio da forma obstrutiva	31
2.9.2.3	DC com predomínio da forma penetrante	31
3	METODOLOGIA	33
3.1	Tipo de estudo	33
3.2	Seleção de pacientes	33
3.3	Coleção de DNA	34
3.4	Extração de DNA genômico a partir de células de sangue periférico.	34
3.5	Quantificação do DNA	35
3.6	Reação em cadeia da polimerase - (<i>Polymerase Chain Reaction – PCR</i>)	35
3.6	Eletroforese em gel de agarose	37
3.7	Purificação	37
3.8	Sequenciamento automático	38
3.10	Análise Estatística	40

4	RESULTADOS	41
5	DISCUSSÃO	50
	CONCLUSÕES	57
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICE A – Formulário de Admissão no Estudo	61
	APÊNDICE B – Termo de Consentimento Informado	65
	ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética	66
	ANEXO B – Submissão do Artigo em Revista	67

INTRODUÇÃO

A doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) são doenças inflamatórias intestinais (DII) causadas por alterações na imunorregulação intestinal. A principal diferença entre elas é o acometimento apenas da mucosa de cólon e reto na RCUI, enquanto que a DC agride toda a parede intestinal, provocando uma inflamação transmural que pode ocorrer em qualquer parte do tubo digestivo, da boca ao ânus, com predileção pela região ileocecal.

Epidemiologicamente nota-se uma maior incidência da DII em países com alto índice socioeconômico como o norte europeu, os Estados Unidos e o Canadá. Acredita-se que fatores como o tipo de dieta, o uso de antibióticos prévios, a erradicação costumeira de helmintos intestinais e o aumento da higiene pessoal propiciaram uma redução da exposição do sistema imune do intestino à microorganismos durante a infância, resultando em uma resposta imune alterada. Esta menor exposição ocorreria especialmente em países mais desenvolvidos, o que poderia influenciar nesta peculiar distribuição geográfica (KUGATHASAN; AMRE, 2006).

O cigarro atua de maneira distinta, com evidências de que os fumantes tendem a uma maior gravidade na apresentação da DC e os não-fumantes têm maior risco de desenvolver RCUI (ABRAHAM; CHO, 2009).

Tanto a DC quanto a RCUI ocorrem predominantemente em brancos, judeus, moradores de áreas urbanas, com pico de incidência entre 20 e 40 anos e um segundo pico entre 60 e 80 anos, tendo a RCUI uma prevalência estimada maior, com cerca de 35-100 casos por 100.000 habitantes, comparados com 10-100 casos por 100.000 habitantes na DC (QUILICI, 2007).

Como mencionado, um dos picos de maior incidência ocorre em pessoas jovens e, portanto, no ápice de suas atividades profissionais, o que acarreta em grande impacto para a saúde pública além de prejudicar a qualidade de vida dos enfermos e seus familiares, levando a restrições não somente profissionais, como físicas, sociais e emocionais (QUILICI, 2007).

Além disso, os portadores de DII têm maior risco de associação com outras enfermidades, como a psoríase, e apresentar manifestações extra-intestinais – como a colangite esclerosante, espondilite anquilosante –, que podem piorar a qualidade de vida destes pacientes.

A etiopatogenia da DII é complexa e envolve aspectos ambientais, genéticos, luminais, relacionados à barreira intestinal e aos fenômenos de imunorregulação da mucosa intestinal. O entendimento das causas e mecanismos das inflamações na DII tem implicações diretas na futura capacidade de prevenir o aparecimento dessas doenças, de eliminar seus sintomas, de evitar sua recorrência e, quando possível, de estabelecer sua cura (QUILICI, 2007).

Estudos apontam a contribuição de alterações genéticas, como os polimorfismos, na patogênese das DII e de suas apresentações clínicas. O gene *MDR1* e seus polimorfismos, que estão relacionados à resistência a diversas drogas, são muito estudados no tratamento do câncer e na resistência a tratamentos quimioterápicos. As suas implicações no diagnóstico, apresentação e no tratamento das DII não está esclarecida.

1. OBJETIVOS

1.1 Principal

Avaliar a presença dos polimorfismos C1236T, G2677T e C3435T do gene *MDRI* em pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais.

1.2 Secundários

Buscar possíveis associações dos polimorfismos C1236T, G2677T e C3435T do gene *MDRI* com características clínicas e demográficas dos dois grupos de pacientes: RCUI e DC;

Correlacionar a presença dos polimorfismos C1236T, G2677T e C3435T do gene *MDRI* com a atividade da doença dos pacientes com DII;

Correlacionar a presença dos polimorfismos C1236T, G2677T e C3435T do gene *MDRI* com os efeitos colaterais de medicamentos e resposta ao tratamento nos pacientes com DII.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bases imunológicas e fisiopatológicas

A RCUI e a DC são doenças distintas, com respostas imunológicas peculiares, embora compartilhem alguns aspectos semelhantes, principalmente do ponto de vista clínico.

A interação dos fatores ambientais com os genéticos, luminais (microbiota

intestinal, seus antígenos, produtos metabólicos e antígenos alimentares), fatores relacionados à barreira intestinal (imunidade inata e permeabilidade intestinal) e os fatores relacionados à imunorregulação (imunidade adaptativa ou adquirida) ajudam a entender a complexa etiopatogenia das DII.

2.2 Fatores ambientais

As DII têm preferência pelos centros urbanos e em profissionais com atividade mais intelectualizada. Os fatores ambientais de maior destaque são o fumo e a “hipótese da higiene” (LAKATOS, FISCHER *et al*, 2006).

Uma extensa revisão foi feita por Loftus, em 2004, a respeito dos fatores ambientais, tais como dieta, fumo, contágio com vírus do sarampo, apendicectomia e uso de anticoncepcional oral. O trabalho ratificou que, excetuando-se o tabagismo, esses fatores não estão relacionados à incidência de DII. Embora não haja conexão entre tabagismo e inflamação intestinal, esse hábito exerce efeito oposto sobre as DII. Por um lado, piora o curso clínico da DC, enquanto leva a um efeito protetor na RCUI (LOFTUS, 2004).

A “hipótese da higiene” tenta explicar o aumento da incidência das DII e o aparecimento progressivo dessas enfermidades em períodos diferentes ao redor do mundo. Logo após a Segunda Guerra Mundial, houve aumento na incidência na América do Norte e norte da Europa, seguido pelo aparecimento na Europa Ocidental, Europa Central, Japão e Austrália. Mais tarde, a América do Sul e a Europa Oriental apresentaram elevação da incidência e, na última década, observamos aumento na incidência no eixo Ásia – Pacífico (LAKATOS, FISCHER *et al*, 2006)..

À medida que houve melhora nas condições de saúde, com menos infecções e doenças parasitárias, melhores condições sanitárias, acesso a vacinas e adoção de novos hábitos alimentares das sociedades ocidentais, os pacientes foram menos expostos a infecções na infância, tornando o sistema imunológico menos preparado para lidar com as exposições antigênicas com o passar da vida (LAKATOS, FISCHER *et al*, 2006).

2.3 Fatores genéticos

Há muito tempo já se sabe que a herança genética é muito importante na DII. Além do aumento da incidência entre membros da mesma família, há grande concordância entre gêmeos monozigóticos, principalmente na DC. Porém a falta de concordância entre todos os gêmeos monozigóticos, fala a favor de que fatores não-genéticos desempenhem papel de gatilho para o desenvolvimento de doença em pacientes geneticamente suscetíveis.

Depois da descoberta da associação de variações do gene *NOD 2*, com a ocorrência de DC em 2001 e de variações do gene receptor da interleucina (IL) 23 na ocorrência de DC e RCUI em 2006, mais de 70 associações genéticas foram relacionadas à DC e 50 à RCUI, demonstrando que as doenças são geneticamente heterogêneas e que compartilham algumas alterações. Esses polimorfismos estão relacionados à cascata inflamatória e à codificação de proteínas que regulam o sistema imunológico (KIMCHI-SARAFATY;OH; KIM, 2007).

Primeiramente identificou-se o *loci* de susceptibilidade para RCUI e DC nos cromossomas 3, 7 e 12, porém, a seguir, houve a identificação de um *locus* de susceptibilidade para DC no cromossomo 16 e essa região pericentromérica passou a ser conhecida como IBD1 ou *locus* 1 da doença inflamatória intestinal (QUILICI, 2007).

Posteriormente foram descobertas mutações no gene *NOD2/CARD15*, localizado na região IBD1 e responsável pela codificação da proteína intracelular *NOD2*, presente em células do sistema imune inato, constituindo a primeira barreira imunológica de defesa do trato gastrointestinal, sendo essas mutações presentes em até 15-30% dos portadores de DC (QUILICI, 2007).

Estudos experimentais revelaram que em condições normais o receptor expresso na superfície das células apresentadoras de antígenos, reconhece o peptidoglicano bacteriano, é hidrolisado por enzimas intracelulares gerando o MDP. O MDP é reconhecido pela proteína do *NOD2* e essa ligação inibe a via de produção de citocina denominada *NF-kB* (fator nuclear kappa B). Porém, sua forma mutante não reconhece o ligante MDP, deixando de exercer seu efeito normal inibitório, o que leva à amplificação do processo inflamatório (QUILICI, 2007).

Dados da literatura demonstraram que os indivíduos que apresentam um dos alelos

do gene *NOD2* polimórfico (heterozigotos) têm risco aumentado de desenvolver DC (1,75 a 4x mais chance), enquanto que indivíduos homozigotos polimórficos apresentam um risco ainda maior (11 a 27x mais chance). Além disso, estes dois grupos de pacientes têm maiores chances de envolvimento ileal, complicações estenosantes e ressecções cirúrgicas.

Porém, a presença isolada de polimorfismos do *NOD2* não é suficiente para levar a DC, o que contribui para a certeza da etiologia multifatorial da doença (ABRAHAM; CHO, 2009). Portadores de DC com defeito no gene *NOD2* têm dificuldade no reconhecimento e eliminação de produtos bacterianos, levando a uma resposta inflamatória longa ou ineficaz.

A prostaglandina E de receptor 4 (EP4) contribui para a reparação da mucosa e para manutenção da barreira intestinal. Estudos em ratos demonstram o desenvolvimento de colite em pacientes deficientes de EP4 em resposta à injúria provocada. Polimorfismos nas proximidades do gene que codifica a EP4 (*PTGER4*) estão recentemente relacionados ao surgimento da DC em humanos (ABRAHAM; CHO, 2009).

Os pacientes com alteração nos genes de autofagia (*ATG16L1* e *IRGM*) não conseguem eliminar os produtos de degradação celular e bacteriana no citoplasma, com recrutamento permanente de linfócitos e ampliação da resposta inflamatória, levando a lesão tecidual, infiltração linfocítica nos tecidos e formação de granulomas na DC. Alguns desses pacientes com polimorfismo para *ATG16L1* também apresentam defeitos nas células de *Paneth*, prejudicando sua capacidade de secretar peptídeos endógenos antibacterianos e controlar a quantidade e qualidade das bactérias da flora intestinal.

Na DC, há evidências da contribuição de genes ligados aos mecanismos de autofagia de organelas intracelulares e microrganismos, especialmente o gene *ATG16L1*, que vem sendo estudado, mas não foram observadas correlações dele com a RCUI (ABRAHAM; CHO, 2009).

Na RCUI, foi reconhecida uma região de susceptibilidade no cromossomo 12 denominada IBD2. Esta região – 12q15 – estaria ligada à interleucina 26 e ao interferon gama dentro da resposta inflamatória. Outro foco atual de pesquisa é a relação do polimorfismo da região 1q32, que contém o gene da interleucina 10 com a RCUI. Porém, são necessários estudos mais detalhados para se demonstrar como essas associações contribuem para uma resposta inflamatória alterada na RCUI (QUILICI, 2007).

Recente pesquisa avaliou uma coorte italiana e estudou diversos polimorfismos

que poderiam se correlacionar com DII naquela população. Observou-se que os polimorfismos TNFSF 15, NKX2-3, ZNF365 e PTPN2 tiveram associação significativa com a DC, enquanto e os polimorfismos PTGER4, NKX3-2, ZNF365, PSMG1 e HLA com a RCUI (LATIANO; PALMIERI *et al*, 2012).

Na verdade, estima-se que apenas 20% da contribuição genética para as DII esteja revelada atualmente. As pesquisas recentes apontam que os genes ligados a via da interleucina 23, como o IL23R, Jak2, STAT3 e p40 estejam associados tanto a DC quanto a RCUI. O p40 produz uma citocina com subunidade também para a interleucina 12, e medicações baseadas no anticorpo monoclonal anti-p40 vêm sendo desenvolvidas, com boa efetividade inicialmente para psoríase e DC.

O gene IL-23R codifica a proteína receptora da interleucina 23, que é pró-inflamatória. A partir de sua interação com seu receptor (IL-23R), proteínas anti-apoptóticas e pró-inflamatórias são transcritas no citoplasma. Tanto na DC quanto na RCUI foram descritos polimorfismos no gene IL-23R. A super-expressão desse receptor facilita a ação da IL-23 na superfície dos linfócitos T, ampliando a ação inflamatória e levando a produção de proteínas anti-apoptóticas, conferindo vida mais longa aos linfócitos T.

A IL-23 atua tanto nos linfócitos Th1 e Th17, mecanismos mais ligadas a DC, quanto em células *natural killer* (NK), mais ligadas na RCUI, evidenciando que as duas enfermidades podem apresentar algumas alterações genéticas em comum (ABRAHAM; CHO, 2009).

O polimorfismo do gene TLR4, que ocorre tanto na DC quanto na RCUI, reforça a ideia de alteração na resposta ao reconhecimento e combate às bactérias por uma imunidade inata anormal (ABRAHAM; CHO, 2009; CHO 2007).

Certamente, ainda há um campo amplo a se pesquisar e a genética ainda trará muitas contribuições para o melhor manejo dos pacientes com DII.

2.4 Fatores luminais

Em condições normais a microbiota intestinal é vital, uma vez que as bactérias atuam sobre alimentos gerando ácidos graxos de cadeias curtas, importantes para o

metabolismo dos colonócitos. Na DII há alterações qualitativas, gerando uma reação exagerada a agentes antigênicos, e alterações quantitativas, como o aumento das bactérias anaeróbicas e a redução de outras, como os *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, que inibem o crescimento de bactérias potencialmente patogênicas (ABRAHAM; CHO, 2009).

Estudo americano investigou a hipótese de polimorfismos genéticos relacionados à imunidade inata estarem ligados a possíveis alterações na microbiota normal do íleo de humanos. O genótipo do *NOD2*, os fenótipos de DII e a infecção por *Clostridium Difficile* tiveram associação significativa com a alteração da composição da microbiota ileal (LI; HAMM; GULATI *et al*, 2012).

2.5 Fatores relacionados à barreira intestinal: permeabilidade intestinal e imunidade inata

A barreira intestinal é composta por um conjunto de componentes não imunológicos: acidez gástrica, secreções digestivas, motilidade intestinal, microbiota intestinal, produção de defensinas (células de Paneth), barreira de células epiteliais, camada aquosa e camada de mucina/ fator trefoil; e um conjunto de componentes imunológicos: produção de IgA secretora, imunidade inata (neutrófilos, células apresentadoras de antígenos, macrófagos) e imunidade adquirida (linfócitos T e B).

Na DII há redução do efeito de barreira intestinal devido a possíveis reduções de defensina, fator trefoil, substância que secreta MMS-68 e alterações de proteínas do citoesqueleto, além da diminuição do butirato com aumento da permeabilidade intestinal. Na DC há redução do sistema imune inato, gerando hiperestimulação do sistema adquirido, ampliando o processo inflamatório (QUILICI, 2007).

O epitélio intestinal é uma importante barreira para entrada excessiva de bactérias e outros antígenos, além de regular a comunicação com a circulação sanguínea. A integridade desta barreira tem íntima ligação com a preservação das junções intercelulares, que parecem estar mais frouxas nas DII, aumentando o espaço paracelular e a permeabilidade intestinal. Além disso, o muco, que dificulta a adesão de microorganismos e auxilia na reparação do epitélio celular, encontra-se diminuído nas DII, bem como a produção de defensinas, que atuam contra a invasão de microorganismos

(ABRAHAM; CHO, 2009).

Com a evolução dos estudos, passou-se a aceitar a teoria de que as DII estão associadas à perda de tolerância à microbiota intestinal normal, mas faltam estudos mais profundos sobre a composição do seu real conteúdo.

Também já foi documentado que nos doentes com DII ocorre uma facilitação à entrada de antígenos intraluminais formados por bactérias ou produtos bacterianos através da mucosa intestinal, ou seja, um aumento da permeabilidade intestinal (SARTOR, 2006).

2.6 Fatores relacionados à imunoregulação da mucosa: imunidade adquirida

Na DII a apresentação antigênica é encaminhada preferencialmente para as células TCD4+ – e não para as TCD8 como seria o habitual –, que então produzem citocinas e amplificam a resposta imune. Especialmente alguns subgrupos, como o Th1, Th2 e Th17 são cruciais na defesa contra microrganismos intestinais, mas a expressão exacerbada destas vias pode levar às doenças inflamatórias intestinais (ABRAHAM; CHO, 2009).

Atualmente, estudos apontam a importância da via Th17. O marco da atividade das DII é a pronunciada infiltração da lâmina própria de células da imunidade inata (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e células tipo NK – *natural killers*). O elevado aumento dessas células na mucosa intestinal eleva localmente o aparecimento de fatores de necrose tumoral (TNF alfa), interleucina 1 beta, interferon gama, citocinas e interleucina-23 na via Th17. Uma desregulação no balanço desta resposta inflamatória leva às DII (ABRAHAM; CHO, 2009).

A presença de antígenos na luz intestinal desencadeia a interação das diferentes respostas das células da imunidade inata e a produção de uma resposta adaptativa, através de linfócitos de memória, com resposta passando a ser adquirida para aquele estímulo. A resposta adquirida tende a ser mais rápida e potente que a inata e, nas DII, costuma estar exacerbada.

Os produtos bacterianos que entraram na mucosa e não foram adequadamente eliminados pela resposta inata estimulam a imunidade adquirida, que é uma resposta tardia, dependente da memória imunológica. Essa resposta é derivada de células T

(imunidade celular) e das células B (imunidade humoral).

A produção de anticorpos mediada pelas células B nas DII é aumentada tanto na mucosa quanto na corrente sanguínea (IgG, IgM e IgA).

As células apresentadoras de antígenos estimulam a diferenciação de células T nos linfonodos. Na DC, IL-12 e IL-23 estimulam a diferenciação das células T em células Th-1 e Th-17, com produção de INF-gama, IL-17 e IL-21. Estes achados suportam a ideia de que a DC é uma condição relacionada à resposta Th-1 (ABRAHAM; CHO, 2009).

A RCUI é uma condição associada a uma resposta Th-2 atípica, onde IL-12 e IL-23 estimulam a diferenciação das células T em Th-2, Th-17 e NK, com produção aumentada de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-17 (ABRAHAM; CHO, 2009)..

Além das células T-helper, outro grupo celular é formado. As células T regulatórias (Treg) têm função de monitorar a resposta imunológica e prevenir sua ativação excessiva. Aparentemente, o número e a função das células Treg estão alterados nas DII. Ainda faltam estudos sobre este tipo celular (ABRAHAM e CHO, 2009; FIOCHI, 1998; PODOLSKY, 2002; SARTOR, 2006; PALLONE, 2001).

Acredita-se que o modelo anterior DC/resposta Th1, RCUI/resposta Th2, na verdade, varie conforme a fase patogênica da doença, o que pode levar a adoção de determinada terapia biológica conforme a fase evolutiva da enfermidade (QUILICI, 2007).

2.7 Classificação das DII

Devido ao seu caráter transmural e sua ampla possibilidade de localização em qualquer segmento do tubo digestivo, a DC costuma ter uma evolução mais grave do que a RCUI.

A classificação de gravidade mais completa para RCUI é o Índice de atividade da doença na Retocolite Ulcerativa Idiopática (QUILICI, 2010) e é baseada em características clínicas e endoscópicas, como descritas na tabela 1. O valor diagnóstico dos marcadores sorológicos p-ANCA ou ASCA é limitado, pois existe uma grande variação na soroprevalência desses anticorpos em pacientes com DII. Uma metanálise demonstrou que a combinação de ASCA (+) com p-ANCA (-) possui uma sensibilidade de 54,6% para o diagnóstico de DC com especificidade de 92,8%. Por outro lado, a sensibilidade e especificidade de uma p-ANCA (+) para RCUI foram de 55,3% e 88,5%

respectivamente. Portanto, esses marcadores sorológicos não são recomendados rotineiramente no diagnóstico das DII (QUILICI, 2010).

Tabela 1: Índice de atividade da doença na Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI)

<i>ESCORE</i>	<i>CRITÉRIO</i>
FREQUÊNCIA DAS EVACUAÇÕES	
0	normal
1	1-2 vezes > normal
2	3-4 vezes > normal
3	>4 vezes > normal
SANGRAMENTO RETAL	
0	nenhum
1	estrias de sangue
2	sangramento moderado
3	sangramento importante
APARÊNCIA ENDOSCÓPICA DA MUCOSA	
0	normal
1	friabilidade leve
2	friabilidade moderada
3	sangramento espontâneo, exsudatos
AVAL. DO EXAMINADOR SOBRE ATIV. DOENÇA	
0	normal
1	leve
2	moderada
3	grave

Legenda: Aval., avaliação; ativ., atividade

Em relação a DC, a classificação de Montreal (Tabela 2), modificando a de Viena, estabeleceu critérios de topografia, idade, comportamento de doença e complicações, permitindo melhor agrupamento dos doentes, segundo fenótipo da sua apresentação, tendo suas características no momento do diagnóstico, significativa influência no curso do processo inflamatório.

O TGI superior é raramente acometido variando de 0,5-5% dependendo da série. O íleo é o segmento intestinal mais afetado, envolvido em até 70% dos casos. A inflamação estende-se para o ceco e cólon ascendente em 40% dos indivíduos. Em torno de 25% o envolvimento é predominantemente colônico (QUILICI, 2010).

Os pacientes que possuem um comportamento ulcerativo (não penetrante/ não estenosante) no momento do diagnóstico provavelmente desenvolverão complicações

estenóticas ou fistulizantes ao longo de sua doença e portanto o comportamento da DC é dinâmico e evolutivo.

Tabela 2: Classificação de Montreal (2005) para Doença de Crohn.

IDADE	DO	A1 < 16 anos A2: 17- 40 anos A3 > 40 anos	
DIAGNÓSTICO			Modificador de TGI Superior
LOCALIZAÇÃO	L1: íleo terminal L2: cólon L3: ileocolônica L4: TGI superior		L1+ L4 L2+L4 L3+L4
			Modificador Doença Perianal
COMPORTAMENTO	B1: não penetrante / não estenosante B2: Estenosante B3: Penetrante		B1p B2p B3p

Não são muitos os estudos prospectivos baseados em evidências referentes à evolução clínica dos pacientes com DC, até porque ela é variável e de difícil prognóstico (FBG, 2012). Em estudo retrospectivo, Louis *et al.* (2001) revendo dados evolutivos de 300 pacientes acompanhados por 1 à 25 anos, observaram que após 10 anos, apenas 16% dos casos haviam apresentado modificação do local do processo inflamatório inicial. Porém, analisados com 10 anos, 45,9% dos doentes tinham modificado o modelo das lesões de não penetrante / não estenosante para penetrante (29,4%) e estenosante (27,1%). A doença do íleo foi a que mais estenosou e a cólica ou ileocólica a que mais fistulizou (FBG, 2012).

Em trabalho igualmente retrospectivo, Beaugerie *et al* (2006) buscaram identificar quais fatores, já no diagnóstico ou surgidos durante a evolução em 5 anos de um grande grupo de doentes, pudessem ser utilizados como preditivos de um curso mais grave da doença. Foram considerados como fatores independentes, presentes no diagnóstico e

significativamente associados com evolução para a incapacidade, necessidade inicial de uso de corticoides, idade abaixo de 40 anos e presença de doença perianal (FBG, 2012).

O estudo Ibsen por Henriksen *et al* (2006) se propôs a avaliar prospectivamente em 5 anos portadores de DC e relacionar seus achados a classificação de Viena. A classificação de Viena (2000) é anterior a de Montreal (2005) e só divide a idade em maior e menor do que 40 anos e não considera os modificadores na localização e comportamento porém adota as mesmas subdivisões nesses quesitos. Dos 200 casos analisados, 13,5% tiveram mudança de localização da inflamação e 17,5% modificaram seu comportamento. Em 28% dos casos houve necessidade de cirurgia, dos quais 50% tinham doença no íleo terminal.

Em estudo populacional, Thia *et al* (2010) acompanharam a evolução a longo prazo de 306 pacientes com DC e utilizando a classificação de Viena, a partir de seu fenótipo inicial, 81% tinham a apresentação não estenosante/ não penetrante ; 4,6% o formato estenosante e 14% complicação fistulosa. O risco cumulativo para desenvolvimento de estenose e/ou fístula na primeira parcela da população foi de 22% em 1 ano, 33,7% em 5 anos e 50,8% em 20 anos de diagnóstico.

Ainda não se sabe que fatores determinam a apresentação de um ou outro fenótipo mas nessa população estudada os fatores de risco observados para mudança de apresentação foram a localização ileal da inflamação e a doença perianal.

Acredita-se que fatores genéticos possam influenciar a forma de apresentação predominante nas DII. Rieder e Fiocchi (2008) têm a hipótese de que a fibrose possa também se desenvolver por via independente da ativação imune persistente do intestino. Em estudo coreano recente, demonstrou-se um predomínio do alelo T e do genótipo TT do gen CD14 de portadores de DII se relacionando com uma maior frequência de pancolite como apresentação fenotípica da RCUI (KIM; CHUNG; PAIK *et al*, 2012).

Outro achado interessante foi o predomínio de DC em relação à RCUI em portadores do polimorfismo C1236T nos indivíduos homozigóticos polimórficos (KANE, 2010). Se somados, são vários os indícios de que o genótipo realmente pode influenciar o fenótipo nas DII.

2.8. O gene *MDRI*

De acordo com o National Cancer Institute (NCI), uma alteração genética que não

cause uma mudança na sequência de aminoácidos de uma proteína, ainda assim pode mudar a função esperada desta proteína. O estudo demonstra que alterações envolvendo apenas uma base nitrogenada em um gene conhecido como *multidrug resistance gene* (*MDR1*) apesar de não afetar a sequência de sua proteína, pode alterar a capacidade desta proteína de se ligar a certas drogas.

Essas alterações podem, então, afetar a resposta ao tratamento com vários tipos de medicamentos. As alterações examinadas no estudo mencionado são conhecidas como polimorfismo de base única (do inglês *single nucleotide polymorphisms* – SNPs) e são muito comuns. Como algumas dessas SNPs podem não alterar a sequência do DNA, são também chamadas de alterações silenciosas. Entretanto, essas alterações podem modificar profundamente a atividade normal da célula (KIMCHI-SARFATY C. *et al*, 2006).

Um códon é formado por uma sequência de três bases nitrogenadas do RNA mensageiro que codificam um determinado aminoácido. A associação de aminoácidos gera uma proteína, como, por exemplo, a P-glicoproteína (Pg-P). Um SNP, então, é uma alteração de uma única base na sequência de um gene, como o *MDR1*, que resulta em um códon alterado que pode ou não alterar um aminoácido.

Sabe-se que diferentes códons podem codificar um mesmo aminoácido, portanto, algumas alterações na sequência do DNA não alterariam o aminoácido. Acredita-se que a função da proteína gerada é modificada porque a célula é forçada a ler um códon diferente do habitual para gerar a mesma sequência de aminoácidos, o que poderia gerar uma alteração nesse ritmo de formação, com uma maior chance de alterar a conformação da proteína gerada (KIMCHI-SARFATY C. *et al*, 2006).

Um gene é formado por dois alelos de DNA e quando a sequência dessas bases nitrogenadas é a mesma em ambos os alelos, são considerados homozigotos. Quando há uma mudança de uma base nitrogenada em um alelo são chamados de heterozigotos e nos dois alelos são homozigotos polimórficos, sendo os alelos que mantêm a sequência de bases original denominados de homozigotos selvagens.

Em outra linha de pesquisa do NCI, observou-se que apesar de um sucesso inicial do tratamento com alguns quimioterápicos, muitos tumores desenvolviam uma resistência a estes quimioterápicos após alguns ciclos de tratamento. Descobriu-se, então, que uma das maneiras de se adquirir essa resistência era expelindo essas drogas através de bombas transportadoras na membrana celular (KIMCHI-SARFATY; OH; KIM; 2007).

Uma dessas bombas é chamada Pg-P, que é produzida pelo gene *MDR1*,

contribuindo para cerca de 50% da resistência a drogas em pacientes com câncer. A Pg-P age prevenindo o acúmulo de drogas nas células, seja por uma habilidade alterada de interação com certas drogas ou por alteração da regulação da bomba através da interação com moléculas inibidoras de bomba (WEERSMA *et al*, 2007).

A Pg-P é uma proteína transportadora ATP dependente da família ABCB1 codificada pelo gene *MDR1*, que tem 209 kb e fica situado do cromossoma 7q (BODOR, KELLY; HO, 2005). A Pg-P é expressa em vários tecidos como os intestinos, rins, fígado, linfócitos e em células que formam a barreira hemato-encefálica e parece ter fundamental importância no controle de absorção de medicamentos por estes tecidos (POTONIK *et al*, 2003).

A Pg-P situada na região apical de linfócitos e células epiteliais intestinais por exemplo, transporta ativamente os corticosteróides e outras drogas para fora dessas células, reduzindo a sua eficácia (FARRELL *et al*, 2000) e gerando uma possível explicação para a resistência aos corticoides nas DII (FARRELL; KELLEHER, 2003).

Farrel (2003) observou ainda que o polimorfismo C3435T apresentava significativa correlação com a expressão de Pg-P em indivíduos saudáveis. Assim, concluíram que os polimorfismos do gene *MDR1* podem alterar a Pg-P e essa alteração influenciar a entrada e saída de medicamentos nas células intestinais.

Há evidências ainda de que a inibição do *MDR1* tem implicação terapêutica em outras patologias inflamatórias crônicas, após observação de um significativo aumento de linfócitos T em pacientes com colagenoses com resistência ao corticoide (FARRELL *et al*, 2003).

Alguns polimorfismos (SNP), como o C3435T e o G2677T, estão relacionados a uma expressão alterada da Pg-P, enquanto outros, como o 3435TT e o GG2677, estão relacionados a uma menor expressão da atividade de Pg-P (HO *et al*, 2005).

A frequência do polimorfismo pode ainda variar conforme a etnia, como no C3435T com uma frequência estimada de 26% nos caucasianos, 34% nos asiáticos e 61% nos negros americanos (CASCORBI *et al*, 2001).

Sabe-se que além dos quimioterápicos, outras drogas como a prednisona, a ciclosporina, o metotrexato, a azatioprina, os inibidores de proteases, anticonvulsivantes e vários antibióticos, entre outros medicamentos, também servem como substrato para o *MDR1*. Muitas dessas drogas são usadas nas DII e torna-se interessante o estudo desta possível correlação (HO *et al*, 2005).

Aliado a esse interesse inicial, um trabalho canadense do departamento de pesquisa de pediatria da Universidade de Montreal observou que a modificação do loci 7q na expressão gênica do NF-kB1 do *MDRI* de ratos levou ao desenvolvimento espontâneo de colite nesses animais. O fato da colite ser prevenida e revertida, após o tratamento com antibióticos reforça a idéia de que a flora intestinal é crítica, tanto para a iniciação quanto para a perpetuação do processo inflamatório e que o *MDRI* está envolvido nesta resposta imunológica da flora bacteriana intestinal habitual (OOSTENBRUG *et al*, 2006).

Em humanos, Langman e colaboradores (2004) utilizaram a técnica de micro arranjo para analisar biópsias de portadores de DC, RCUI e controles num total de 22.283 genes avaliados. A reduzida expressão de RNAm de *MDRI* em biópsias de pacientes com RCUI concluiu que o gene *MDRI* apresentava menor expressão no cólon dos portadores de RCUI e aumentou o interesse dessa investigação (NOBLE *et al*, 2006).

Tendo em vista a significativa importância farmacogenética do *MDRI* como um gene transportador na mediação da homeostase do epitélio intestinal, estudos para melhor definir seu papel na produção da inflamação ou na resistência a drogas utilizadas para o tratamento serão de grande valia para o manejo de portadores de DII, tendo em vista a base imunológica da etiopatogenia dessa doença.

2.9. Tratamento Clínico

A etiologia das doenças inflamatórias intestinais é multifatorial e a inflamação é o produto final desta patogênese. Os medicamentos atuam no bloqueio ou ativação de diferentes células, receptores e mediadores participantes da cascata inflamatória visando à interrupção da inflamação e à remissão da doença.

Os principais objetivos do tratamento da DC e da RCUI são o controle dos sintomas, o equilíbrio nutricional, a melhora da qualidade de vida e mais recentemente o conceito de remissão endoscópica com cicatrização da mucosa. O paciente deve estar ciente e concordante com a opção terapêutica escolhida visando uma maior aderência, uma vez que se trata de doença crônica que exige tratamento contínuo e por tempo indeterminado.

O tratamento convencional é a forma de tratamento mais utilizada no Brasil e possivelmente no mundo, na qual são acrescentadas drogas cada vez mais potentes, porém

com mais possibilidades de efeitos colaterais, conforme a resposta insuficiente na etapa anterior. Este escalonamento de medicações progressivamente mais potentes é conhecido na literatura mundial como *step up*.

2.9.1 Tratamento de indução e manutenção segundo atividade de doença na RCUI

Uma parcela de cerca de 30% dos pacientes com RCUI pode ter remissão espontânea (QUILICI, 2007). A maioria responde ao tratamento com aminosalicilatos. Os derivados salicílicos são considerados agentes de primeira linha na indução de remissão na RCUI leve/moderada

As duas classes de salicilatos estão indicadas no tratamento de indução e manutenção de remissão na RCUI. Em função da não resposta completa as doses máximas de salicilatos está indicada a associação terapêutica com outra classe de medicamentos. A combinação mais utilizada é com os corticoesteróides por até 60 dias, com retirada gradativa da droga semanalmente. A apresentação mais comumente usada na fase ativa da doença continua a ser a prednisona, na dose de indução de remissão de 1mg/kg/dia, não devendo ultrapassar 80mg /dia. Pacientes que mantém a mesma atividade de doença após 4 semanas dessas doses são considerados córtico-refratários. Na melhora do quadro clínico reduzir de 5 a 10mg por semana da prednisona. Caso não se consiga reduzir as doses de corticóides em 3 meses sem retorno da atividade da doença ou se após 3 meses do fim das mesmas haja necessidade do uso de corticoides novamente, esses pacientes são considerados córtico-dependentes (ASSCHE V.G.; DIGNASS A.; PANES J, 2010). Estudos demonstram que dentre os portadores de RCUI, um quarto (1/4) são dependentes de esteroides e um sexto (1/6) a eles resistentes (FARRELL; KELLEHER, 2003).

Outros corticoesteróides têm sido estudados em virtude dos conhecidos efeitos colaterais que os tradicionais podem gerar e entre eles a budesonida por ser mais rapidamente metabolizada vem tendo espaço destacado na dose de indução de 9mg/dia. A hidrocortisona pode ser utilizada sob a forma de enema (artesanal) ou de forma intravenosa em casos mais graves.

A atuação dos corticoides consiste no bloqueio da fosfolipase A2 na cascata do ácido araquidônico, alterando o equilíbrio entre prostaglandinas citoprotetoras e leucotrienos pró-inflamatórios, além de estimular a apoptose de linfócitos da lâmina própria e suprimir a transcrição de interleucinas. É uma potente droga para induzir remissão, porém apresenta diversos efeitos colaterais que a contra indicam como medicamento de manutenção.

Os efeitos colaterais podem atingir a 50% dos pacientes e dentre eles, destacamos o aumento de peso, edema, insônia, labilidade emocional, psicose, acne, síndrome de Cushing, osteoporose, catarata, glaucoma, estrias, miopatia, susceptibilidade a infecções, esteatose hepática, HAS, DM e pancreatite aguda. Podem ser utilizados na gestação e lactação (QUILICI, 2007).

A ausência de resposta completa ao uso de corticoides orais ou a presença de corticodependência indica o início de imunossupressores, sendo a azatioprina o mais comumente utilizado.

Em caso de não tolerância ou contra-indicação ao uso de AZA e 6-MP podemos utilizar outros imunossupressores como o metrotexate, o micofenolato de mofetil ou o tacrolimus, mas há uma maior experiência do uso do metrotexate, que fica como segunda opção de imunossupressor.

Se a atividade persistir ou houver piora do quadro clínico mesmo com otimização de salicilatos e imunossupressores o paciente será reclassificado como em atividade acentuada e deverá ser internado para administração de medicação parenteral.

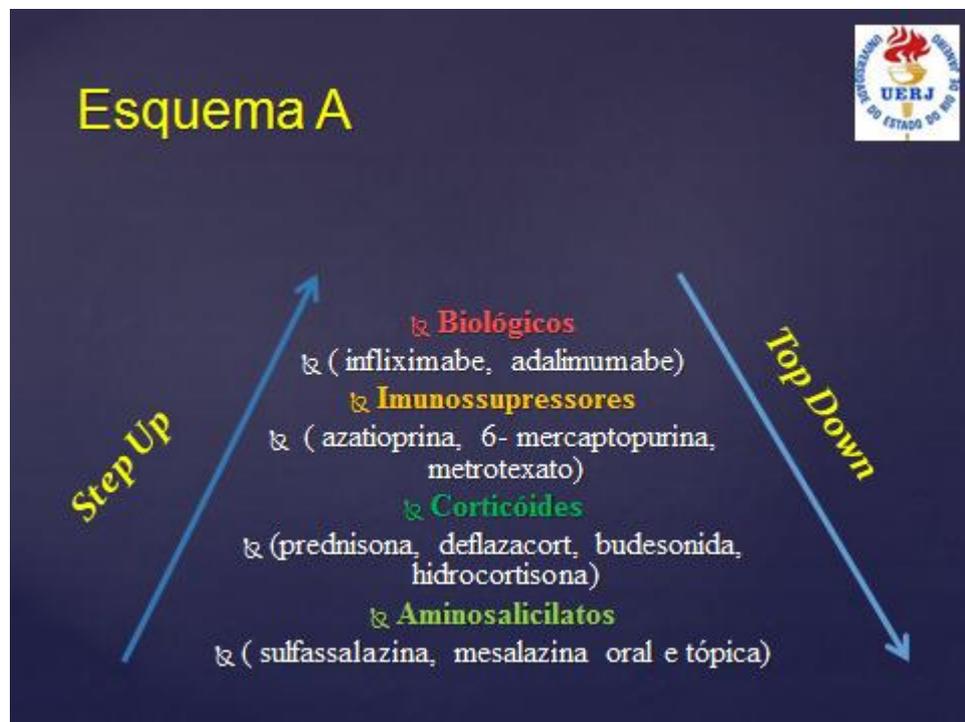
Durante a internação o paciente deverá ser submetido a tratamento parenteral seja com corticóides, terapia biológica ou ciclosporina.

Esses pacientes internados são considerados graves, devem ter acompanhamento de equipe multidisciplinar e a equipe de cirurgia pode vir a indicar a colectomia em casos de perfuração, hemorragia maciça, megacólon tóxico e doença ativa sem resposta de sucesso ao tratamento clínico otimizado.

2.9.2 Tratamento de indução e manutenção na DC

2.9.2.1 DC com predomínio da forma inflamatória/ulcerativa

Bem como na RCUI a conduta mais empregada na prática clínica é o *step up* com adição progressiva de medicações mais potentes e com maior possibilidade de efeitos colaterais conforme a não resposta ao tratamento máximo otimizado do degrau anterior (veja esquema A). Outra conduta cada vez mais utilizada na DC é *top down*, com utilização de terapia biológica desde o início do tratamento, podendo mudar a história natural da doença.



Esquema A - Formas de tratamento das Doenças Inflamatórias Intestinais

Na DC colônica ou íleo-colônica de atividade leve a mesalazina pode ter boa resposta no controle dos sintomas e deve ser mantida na manutenção, ajudando na prevenção de câncer colorretal, com preferência para a forma de liberação em delgado nas apresentações íleo-colônicas. Tendo em vista a natureza transmural da DC e o conceito atual de cicatrização de mucosa, nota-se uma tendência mundial de início de imunossupressores mesmo nas formas leves da doença, sendo a azatioprina a medicação mais utilizada.

Em atividades moderadas a prednisona ou a budesonida podem ser utilizadas por até 2 meses com redução gradativa semanal e a azatioprina se ainda não tiver sido iniciada deve ser, uma vez que sua atividade ótima ocorre a partir de 12 semanas de uso. Um terço (1/3) dos pacientes com DC são córtico-dependentes e um quinto (1/5) córtico-resistentes (FARRELL; KELLEHER, 2003).

Em atividades acentuadas é indicada a internação para administração parenteral de medicamentos. A primeira opção venosa costuma ser a hidrocortisona. Na ausência de resposta devemos escolher conforme disponibilidade e experiência da equipe entre a ciclosporina e a terapia biológica. A associação com antibióticos é recomendada na suspeita de sepse e o tratamento cirúrgico pode ser indicado em casos de perfuração, hemorragia maciça, megacólon tóxico e doença ativa sem resposta de sucesso ao tratamento clínico.

Na DC de esôfago, gastroduodenal ou difusa de delgado não recomenda-se o uso de salicilatos e os corticoides podem ser utilizados enquanto se aguarda uma otimização dos imunossupressores. Se a resposta aos imunossupressores for insuficiente devemos acrescentar a terapia biológica.

2.9.2.2 DC com predomínio da forma obstutiva

O exame clínico e a história devem diferenciar casos de obstrução total, com indicação cirúrgica de casos de suboclusão intestinal. Dependendo da dor e da eliminação de flatos e fezes, uma dieta sem resíduos deve ser adotada e uma exame de imagem solicitado caso não haja um estudo prévio do nível de obstrução. A colonoscopia e/ou a enterografia por ressonância magnética (mais recomendada) ou tomografia computadorizada avaliarão a necessidade de dilatação endoscópica ou abordagem cirúrgica da lesão. O início de corticoides em doses imunossupressoras quase sempre está indicado visando à rápida redução do componente inflamatório do processo obstrutivo. Em casos de córtico-dependência ou córtico-resistência a terapia biológica pode ser indicada.

2.9.2.3 DC com predomínio da forma penetrante

As fístulas podem ocorrer na região perianal bem como entre o intestino e outros órgãos ou entre o intestino e a parede abdominal. É importante um estudo detalhado destas fístulas para definir sua anatomia, identificar ou excluir abscessos associados e classifica-las em simples ou complexas.

As fístulas perianais sintomáticas mais simples devem ter o tratamento iniciado com antibióticos como metronidazol e/ou ciprofloxacino e podem combinar uma abordagem cirúrgica como uma fistulectomia ou a colocação de sedenho. Já as mais complexas além dos antibióticos e da drenagem há indicação de imunossupressores e em caso de não resposta efetiva e exclusão de abscessos, a terapia biológica se apresenta como importante opção terapêutica. Há descrição de resposta clínica ao uso de talidomida que pode ser uma opção alternativa. Por se tratar de uma droga teratogênica deve ser evitada em indivíduos em idade fértil e sempre ser utilizada associada a métodos anticoncepcionais.

Os pacientes intolerantes ou que não respondem a terapia convencional e que não apresentam contra-indicações podem se beneficiar da terapia biológica, como o anti-TNF alfa intravenoso ou sub-cutâneo, efetivo na indução e na manutenção de remissão de pacientes com DII, além do fechamentos de fístulas na DC.

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo de estudo

Estudo de corte transversal com entrada prospectiva de pacientes.

3.2 Seleção de pacientes

Foram incluídos 224 pacientes do ambulatório de doenças inflamatórias intestinais da Disciplina de Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), 25 pacientes do ambulatório de doenças inflamatórias intestinais do Hospital Servidores do Estado do Rio de Janeiro e 7 pacientes do ambulatório de doenças inflamatórias intestinais do Hospital Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) – com diagnóstico confirmado de RCUI e de DC com base em parâmetros clínicos, endoscópicos, histológicos e radiológicos, independente da idade, do sexo, da duração, da atividade e da extensão da doença, no período de fevereiro de 2009 a janeiro de 2011. 20 das 256 amostras foram insuficientes e excluídas do estudo e dos 236 pacientes incluídos, 146 apresentavam DC e 90 RCUI.

Os pacientes responderam um questionário (APÊNDICE I) contendo identificação, sexo (gênero), idade (data de nascimento), diagnóstico, idade ao diagnóstico, atividade de doença, uso crônico de corticoides incluindo córtico-dependentes e córtico-refratários, efeitos colaterais de medicamentos em uso e história de cirurgia.

Para os pacientes portadores de DC, a localização da doença foi classificada em ileal (L1), colônica (L2), ileocolônica (L3) ou do trato gastrointestinal superior (L4); a forma predominante como ulcerativa/inflamatória ou não estenosante/não penetrante (B1), estenosante (B2) e penetrante (B3), de acordo com a classificação de Montreal

(Tabela 2). A doença perianal foi classificada a parte, sendo somada a forma predominante. A atividade de doença foi baseada no índice de Harvey-Bradshaw. (QUILICI, 2010).

Para os pacientes com RCUI, a extensão da doença foi baseada na classificação de Montreal utilizando critério modificado, combinando proctite e colite esquerda (E1+E2) denominadas não pancolite com a pancolite (E3). A atividade de doença foi baseada no Índice de atividade da doença na RCUI, demonstrado na Tabela 1 (QUILICI, 2010).

Um consentimento livre e esclarecido foi fornecido para os voluntários que aceitaram participar do estudo (APÊNDICE II).

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética do HUPE e foi aprovado sem restrições (ANEXO I). O protocolo de estudo está de acordo com os princípios éticos de pesquisa médica envolvendo humanos do Conselho Nacional de Saúde e da Declaração de Helsinki.

3.3 Coleção de DNA

Foram coletados 3 tubos com 5 mL de sangue periférico (cada) de 256 pacientes portadores de DII, para a extração de DNA genômico. Após a coleta, as 256 amostras foram estocadas a -20° no Laboratório de Toxicologia e Biologia Molecular localizado no Departamento de Bioquímica, IBRAG, UERJ, onde foi realizada a sua análise.

3.4 Extração de DNA genômico a partir de células de sangue periférico

Todo o trabalho de bancada foi realizado no Laboratório de Toxicologia e Biologia Molecular, localizado no Departamento de Bioquímica do IBRAG da UERJ. Das 256 amostras coletadas, 20 tiveram material insuficiente para extração de DNA e foram excluídas do estudo.

Em 5 mL de sangue coletado com anticoagulante (EDTA), adicionou-se 17,5 mL de tampão de lise de hemácias (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃ e 1 mM de EDTA – pH

7,4) e homogeneizou-se levemente, deixando, em seguida, a solução agir por 30 minutos no gelo.

Após 15 minutos de centrifugação a 1500-1800 rpm em microcentrífuga (centrífuga Eppendorf 5810R), descartou-se o sobrenadante. O sedimento foi ressuspensão em 5 mL de tampão de lise de hemácias e centrifugado a 1500 – 1800 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, o sedimento foi ressuspensão em 3 mL de tampão de lise de núcleo (10 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 2 mM de EDTA – pH 8,2).

Adicionou-se 80 µg de proteinase K e 150 µL de SDS 20% (p/v), deixando agir por 12 a 16 horas a 57°C. Centrifugou-se por 10 minutos a 14.000 rpm, retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de NaCl saturado. Centrifugou-se por 5 minutos a 12.000 rpm, descartou-se o sobrenadante e o DNA foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto.

O DNA foi então lavado com etanol 70% para retirar o excesso de sal e seco à temperatura ambiente. Posteriormente, o DNA foi ressuspensão em 200 a 500 µL de TE (10 mM Tris-HCl e 1 mM EDTA – pH 7,5) e armazenado a 4°C. Por último, foram adicionados 0,1 mg/mL de RNase por 30 minutos a 37°C (MILLER, 1988).

3.5 **Quantificação do DNA**

Após a extração, 2 µL do DNA foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro (NanoVue – GE Healthcare) usando comprimento de onda igual a 260 nm. A pureza do DNA foi verificada a partir da leitura a 280 nm, que detecta preferencialmente proteínas. Quando a relação das densidades óticas, 260/280, foi igual ou maior que 1,7 o material foi considerado puro.

Para a obtenção da concentração de DNA foi considerada a relação de que uma unidade de densidade ótica a 260 nm corresponde a 50 µg/mL de DNA. A integridade do DNA foi observada posteriormente em gel de agarose 0,8% (GIBCO BRL, Brasil) (SAMBROOK, 1989).

3.6 Reação em cadeia da polimerase – (*Polymerase Chain Reaction – PCR*)

As detecções dos polimorfismos C1236T, G2677T e C3435T do gene *MDR1* foram determinadas pela técnica de PCR, utilizando-se oligonucleotídeos específicos para cada região a ser analisada e o termociclador *Veriti 96 well termo cycler* (Applied Biosystems).

A técnica de PCR foi utilizada para amplificar as regiões dos DNAs genômicos correspondentes aos exons 12, 21 e 26 do gene *MDR1*. Os seguintes pares de oligonucleotídeos senso e antisenso (IDT, USA) foram utilizados (Tabela 3):

Tabela 3: Pares de oligonucleotídeos senso e antisenso dos exons 12, 21 e 26 do gene *MDR1*.

<p>1° Exon 12 – C1236T</p> <p>C1236T Senso: 5' CCTATATCCTGTGTCTGTG 3'</p> <p>C1236T Anti-Senso: 5' CTGTGGGGTCATAGAGCCTC 3'</p>
<p>2° Exon 21 – G2677T</p> <p>G2677T Senso: 5' AGCAGGAGTTGTTGAAATGAA 3'</p> <p>G2677T Anti-Senso: 5' AGAGCATAGTAAGCAGTAGG 3'</p>
<p>3° Exon 26 C3435T</p> <p>C3435T Senso: 5' CGAGCACACCTGGGCATC 3'</p> <p>C3435T Anti-Senso: 5' GAGGCTGCCACATGCTCCCA 3'</p>

A reação de PCR foi realizada utilizando tampão de PCR 1X (20 mM de Tris-HCl – pH 8,4 – e 50 mM KCl – Promega, USA), 0,75 mM de MgCl₂ (Promega, USA), 0,2 mM de mistura de dNTPs (1 mM de dATP, 1 mM de dCTP, 1 mM de dGTP e 1 mM de dTTP – Promega, USA), 1,5 U de Go Taq Flexi DNA polimerase (Promega, USA) para os polimorfismos C1236T e C3435T, 1,5 U de Platinum Taq DNA polimerase (Invitrogen) para o polimorfismo e 2677T, além de 25 pmol de cada par de oligonucleotídeos (senso e antisenso) e 200 ng do DNA a ser analisado.

A reação teve 50 µL de volume final, complementada com água deionizada estéril. A reação de amplificação foi realizada na termocicladora *Veriti 96 well termo cycler* (Applied Biosystems), com uma pré-desnaturação (5 minutos a 94°C), seguida de 35

ciclos consistindo de três etapas: desnaturação (30 segundos a 94°C), anelamento (30 segundos a 60°C para os exons 12, 21 e 58° C para o exon 26) e extensão (45 segundos a 72°C) e um ciclo adicional por 10 minutos a 72°C.

3.7 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose 10,8% (p/v) foi realizada com a finalidade de verificar a qualidade do DNA genômico extraído. Para isso, foi utilizado 1 µg de DNA genômico extraído de sangue periférico dos 236 pacientes.

A eletroforese em gel de agarose 2% (p/v) foi utilizada para verificar os produtos amplificados das regiões de interesse do gene *MDR1*. Após a realização da PCR, então, foram aplicados no gel 5 µL de cada produto amplificado.

Em todos os casos as amostras foram misturadas com 1/10 do volume de tampão de carregamento (50% (v/v) de glicerol, 0,25% (p/v) de azul de bromo fenol e 0,25%(p/v) de xileno cianol). Após aplicação em gel de agarose a 2 % (p/v), dissolvida em SB 1X (200mM hidróxido de sódio – pH 8,5, ajustado com ácido bórico), as amostras foram separadas por eletroforese a 200 V/cm em cuba horizontal (GIBCO BRL-HORIZON-58, USA).

O DNA foi visualizado após coloração realizada por imersão em solução de SYBR SAFER (5 µg /mL – Invitrogen, USA), e o resultado visualizado em transluminador de luz UV (mod. TM-20, UVP, USA). Os resultados foram fotografados por sistema de fotodocumentação (sistema Alpha Innotech, USA) e arquivados.

3.8 Purificação

Antes do sequenciamento, todos os produtos de PCR foram purificados com os kits *illustra GFX™ PCR DNA e Gel Band Purification*, de acordo com o protocolo do fabricante (GE Healthcare, UK).

A cada tubo, com 100 µL de produto de PCR foram adicionados 500 µL de

tampão de captura. Posteriormente, essa solução foi colocada em uma coluna *GFX Microspin* com tubo coletor e foi centrifugada a 14.000 rpm por 30 segundos. O líquido no tubo coletor foi descartado. A coluna foi lavada com 500 μ L de tampão de lavagem centrifugando a 14.000 rpm por 30 segundos. O tubo coletor foi desprezado e substituído por um microtubo de 1,5 mL.

Em seguida, foram adicionados ao centro da coluna 20 μ L de tampão de eluição que ficou agindo por 1 minuto. Por fim, este material foi centrifugado a 14.000 por 1 minuto e no microtubo estava o DNA purificado.

3.9 Sequenciamento automático

As reações de sequenciamento foram feitas utilizando-se o kit *ET Dye Terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare), de acordo com o protocolo do fabricante. Para cada reação foram utilizados 2 μ L do produto de PCR purificado, 40 ng de um dos oligonucleotídeos (senso ou anti-senso) e 3 μ L do kit.

As reações foram feitas no termociclador *Thermo Hybaid* nas seguintes condições: 30 ciclos de 30 segundos a 95°C e 1 minuto a 58°C. Os oligonucleotídeos utilizados foram os mesmos da reação de PCR. Para cada produto foram feitas oito reações de sequenciamento, quatro com oligonucleotídeos senso e quatro com oligonucleotídeos anti-senso.

Cada reação de sequenciamento foi precipitada com 26 μ L de etanol absoluto (MERCK) e 1 μ L de acetato de amônia 7,5 M (GE Healthcare, UK) por aproximadamente 18 horas a -20°C. Após esta etapa, cada reação foi centrifugada (EPPENDORF 5415R) por 30 minutos a 4.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O sedimento foi lavado com 100 μ L de etanol 70% por 10 minutos a 4.000 rpm.

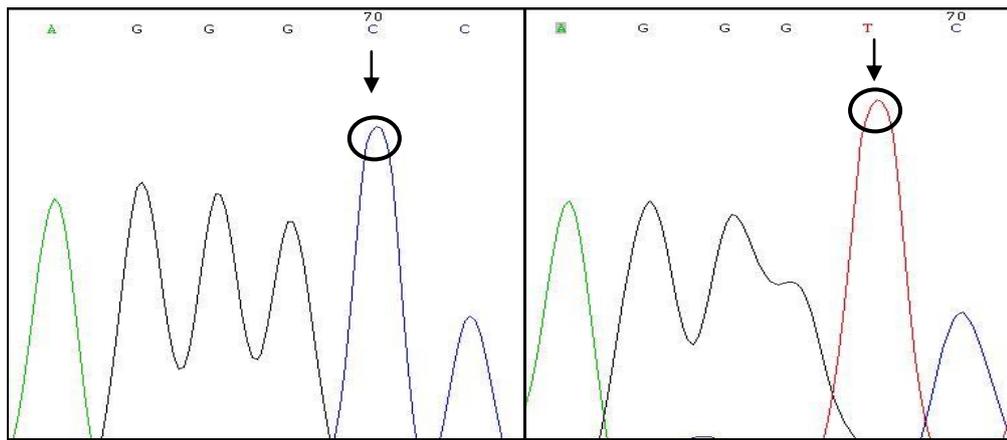


Figura 1: Exemplo do cromatograma do polimorfismo 1236: À esquerda a sequência selvagem agggCc e à direita o polimorfismo com troca de citosina por timina e sequência agggTc.

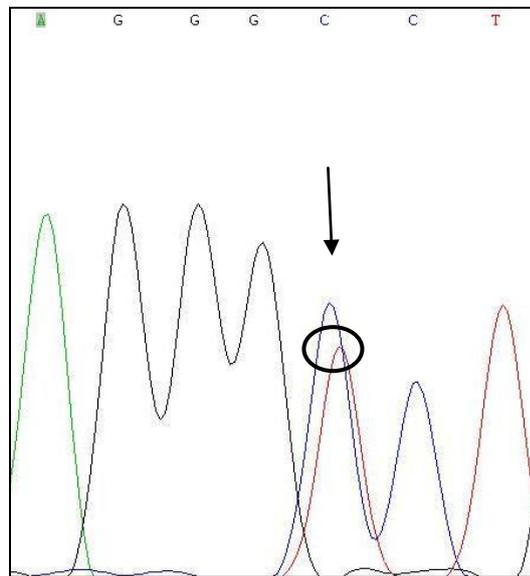


Figura 2: Exemplo de Cromatograma do polimorfismo C1236T demonstrando uma sobreposição de curvas de citosina e timina, indicativa de indivíduo heterozigoto

Posteriormente, o sedimento foi ressuspenso em 10 μ L de tampão *Loading* (GE Healthcare, UK) e a reação foi injetada no sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare, UK). A análise das sequências (Figuras 1 e 2) foi feita utilizando o programa *Chromas*¹.

¹ Disponível em: <<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>>. Acesso em: 19/03/2011.

3.10 **Análise Estatística**

O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4) foi feito utilizando o software Genepop (Genepop web versão 3.1).

Para a avaliação dos outros dados, foi utilizado o software SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). A distribuição das características individuais foi avaliada por estatística descritiva simples. As diferenças entre as distribuições das variáveis selecionadas foram avaliadas pelo teste de qui-quadrado para dados categóricos. Todos os testes foram bi-caudais, considerando como estatisticamente significativos valores de p inferior a 0,05. As associações de genótipo-fenótipo foram avaliadas através de odds ratio, calculadas para o alelo menor em cada polimorfismo. Vários modelos de regressão logística foram utilizados a fim de explorar o papel do genótipo sobre as variáveis de fenótipo, com a forma genotípica como variável dependente.

4 RESULTADOS

Dentre os 236 pacientes que entraram no estudo, observamos que 146 pacientes são portadores de DC enquanto 90 de RCUI. 136 são do sexo feminino e 100 do sexo masculino. A idade variou entre 10 e 80 anos com média de 42,70 anos e mediana de 43 anos.

O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4) foi realizado utilizando o software Genepop (Genepop web versão 3.1). O nível de significância de 5% para grau de liberdade 1 é de 3,84, e uma vez que o valor do qui-quadrado é menor que este valor, a hipótese nula de que a população está em equilíbrio de Hardy-Weinberg não é rejeitada.

Tabela 4: Polimorfismos C1236T, G2677T/A, e C3435T do gene *MDR1* distribuídos pela frequência dos alelos em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Polimorfismo	HzS	HTz	HzP	n	Frequência do Alelo		X ²	p
					C	T		
C1236T	C:C	C:T	T:T					
Observado	99	103	30	232	0.65	0.35	0.74	0.39
Esperado	93	107	31					
G2677T/A	G:G	G:T/A	T/A:T/A					
Observado	94	116	25	235	0.67	0.33	1.86	0.17
Esperado	93	109	32					
C3435T	C:C	C:T	T:T					
Observado	93	83	31	207	0.61	0.39	1.03	0.31
Esperado	78	99	30					

Legenda: HzS, homozigoto selvagem; HTz, heterozigoto; HzP, homozigoto polimórfico; X², qui-quadrado

Na tabela 5 observamos a frequência dos alelos nas populações do estudo. Das 236 amostras avaliadas, na DC, para o polimorfismo C1236T, 57 apresentaram genótipo homozigoto selvagem, 25 homozigoto polimórfico e 63 heterozigoto. Para o polimorfismo G2677T, 59 apresentaram genótipo homozigoto selvagem, 18 homozigoto polimórfico e 68 heterozigoto. Já para o polimorfismo C3435T, 52 apresentaram genótipo homozigoto selvagem, 19 homozigoto polimórfico e 52 heterozigotos.

Tabela 5: Análise dos polimorfismos do gene *MDR1* no diagnóstico diferencial das DII.

MDR1	HzS	HTz	HzP	p
Polimorfismo				
C1236T	C:C	C:T	T:T	
DC (n=145)	57	63	25	0.036
RCUI (n=87)	42	40	5	
G2677T/A	G:G	G:T/A	T/A:T/A	
DC (n=145)	59	68	18	0.442
RCUI (n=90)	35	48	7	
C3435T	C:C	C:T	T:T	
DC (n=123)	52	52	19	0.645
RCUI (n=84)	41	31	12	

Legenda: HzS, homozigoto selvagem; HTz, heterozigoto; HzP, homozigoto polimórfico.

Na RCUI, para o polimorfismo C1236T, 42 apresentaram genótipo homozigoto selvagem, 5 homozigoto polimórfico e 40 heterozigoto. Para o polimorfismo G2677T, 35 apresentaram genótipo homozigoto selvagem, 7 homozigoto polimórfico e 48 heterozigoto. Já para o polimorfismo C3435T, 41 apresentaram genótipo homozigoto selvagem, 12 homozigoto polimórfico e 31 heterozigotos.

Dos 146 portadores de DC, observou-se a seguinte distribuição de localização da doença (Gráfico 1): 24 tem atividade predominantemente ileal (L1), 72 ileocolônica (L2), 38 colônica, além de 8 pacientes com atividade em outras partes do intestino delgado e/ou trato gastrointestinal superior. 4 pacientes tem acometimento perianal como única forma de apresentação da doença, enquanto em 37 a doença perianal aparece concomitante com manifestações em outros segmentos, num total de 41 pacientes com acometimento perianal.

Dentre os portadores de DC, 50 (35%) tem como forma de apresentação predominante a ulcerativa (B1), 42 (30%) a estenosante (B2) e 49 (35%) a penetrante (B3) (Gráfico 2). Na DC, 52 desses 146 pacientes já sofreram alguma cirurgia, 32 foram considerados córtico dependentes/refratários e 45 tiveram algum efeito colateral as medicações que já tenham utilizado como tratamento específico da DC.

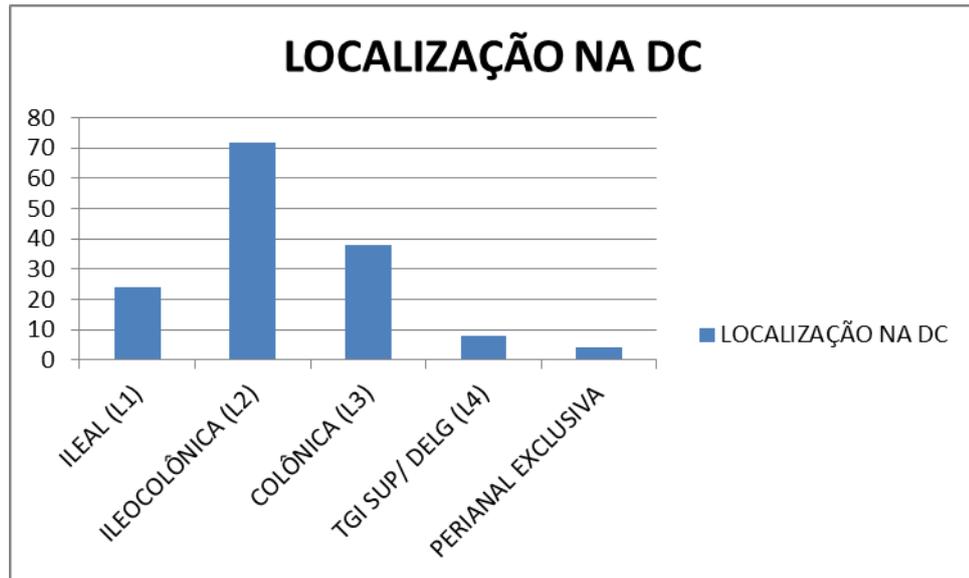


Gráfico 1 : Localização da Doença de Crohn (n=146)



Gráfico 2: Formas de apresentação predominantes encontradas nos pacientes com Doença de Crohn (n=146).

Tabela 6: Associações genótipo – fenótipo de C1236T do *MDRI* em pacientes com DC

MDRI Polimorfismo C1236T	HzS	HTz	p	OR	HzP	p	OR
Gênero							
Masc (n=60, 41.4%)	22	27	0.635	1.19	11	0.646	1.25
Fem (n=86, 58.6%)	35	36			14		
Idade na data do diagnóstico							
<40 (A1) (n=74, 51.0%)	28	37	0.291	1.47	9	0.271	0.58
≥40 (A2) (n=71, 49.0%)	29	26			16		
Localização							
Íleo Terminal (L1) (n=24, 16.9%)	11	12	0.930	0.96	1	0.063	0.17
Cólon (L2) (n=72, 50.7%)	27	29	0.802	0.91	16	0.215	1.84
Ileocolônica (L3) (n=38, 26.7%)	14	18	0.664	1.20	6	0.889	0.92
Trato GI alto (L4) (n=8, 5.6%)	3	3	0.880	0.88	2	0.662	1.51
Comportamento							
Ulcerativa (B1) (n=49, 34.8%)	17	23	0.481	1.32	9	0.566	1.34
Estenosante (B2) (n=42, 29.8%)	20	17	0.299	0.66	5	0.172	0.46
Penetrante (B3) (n=50, 35.4%)	18	22	0.753	1.13	10	0.445	1.47
Atividade da Doença							
Moderada/severa (n=28, 19.3%)	9	15	0.272	1.67	4	0.980	1.02
Leve/Remissão (n=117, 80.7%)	48	48			21		
Cirurgia devido a DC							
Sim (n=52, 35.9%)	25	18	0.081	0.51	9	0.506	0.72
Não (n=93, 64.1%)	32	45			16		
Doença Perianal							
Sim (n=41, 28.9%)	17	17	0.725	0.87	7	0.915	0.94
Não (n=101, 71.1%)	39	45			17		
Uso Crônico de Corticóide							
Sim (n=32, 23.5%)	10	15	0.433	1.43	7	0.266	1.88
Não (n=104, 76.5%)	43	45			16		
Efeitos Colaterais							
Sim (n=45, 30.8%)	17	21	0.636	1.21	7	0.867	0.92
Não (n=99, 68.8%)	40	41			18		

Legenda: HzS, homozigoto selvagem; HTz, heterozigoto; HzP, homozigoto polimórfico; OR, odds ratio; Masc, masculino; Fem, feminino, DC, Doença de Crohn; todas as comparações foram feitas em relação ao grupo de homozigotos selvagens.

Dos 90 portadores de RCUI, em relação a localização da doença, 44 são do tipo pancolite e 43 não-pancolite. Na RCUI, 2 foram submetidos à cirurgia, 36 são córtico dependentes/refratários e 17 tiveram algum efeito colateral as medicações que já tenham utilizado como tratamento específico da RCUI.

Tabela 7: Associações genótipo- fenótipo de G2677T/A do *MDRI* em pacientes com DC

<i>MDRI</i> SNP G2677T/A	HzS	HTz	p	OR	HzP	p	OR
Gênero							
Masc (n=60, 41.4%)	20	33	0.081	1.89	7	0.664	1.27
Fem (n =86, 58.6%)	40	35			11		
Idade na data do diagnóstico							
<40 (A1) (n=74, 51.0%)	28	37	0.434	1.32	9	0.850	1.11
≥40 (A2) (n=71, 49.0%)	31	31			9		
Localização							
Íleo Terminal (L1) (n=24, 16.9%)	12	10	0.373	0.66	2	0.345	0.47
Cólon (L2) (n=72, 50.7%)	32	34	0.548	0.80	8	0.385	0.63
Ileocolônica (L3) (n=38, 26.7%)	11	21	0.126	1.91	6	0.215	2.09
Trato GI alto (L4) (n=8, 5.6%)	4	2	0.296	0.41	2	0.576	1.66
Comportamento							
Ulcerativa (B1) (n=50, 35.5%)	14	30	0.019	2.49	6	0.381	1.68
Estenosante (B2) (n=41, 29.0%)	21	15	0.077	0.49	5	0.573	0.71
Penetrante (B3) (n=50, 35.5%)	22	22	0.504	0.78	6	0.805	0.87
Atividade da Doença							
Moderada/Severa (n=28, 19.3%)	8	16	0.152	1.96	4	0.375	1.82
Leve/ Remissão (n=117, 80.7%)	51	52			14		
Cirurgia devido a DC							
Sim (n=52, 35.9%)	26	19	0.058	0.49	6	0.418	0.63
Não (n=93, 64.1%)	33	49			12		
Doença Perianal							
Sim (n=41, 28.9%)	16	18	0.841	0.92	7	0.305	1.79
Não (n=101, 71.1%)	41	50			10		
Uso Crônico de Corticóide							
Sim (n=32, 23.5%)	13	13	0.847	0.92	6	0.221	2.08
Não (n=104, 76.5%)	45	49			10		
Efeitos Colaterais							
Sim (n=45, 30.8%)	19	23	0.899	1.05	3	0.188	0.41
Não (n=99, 68.8%)	39	45			15		

Legenda: HzS, homocigoto selvagem; HTz, heterocigoto; HzP, homocigoto polimórfico; OR, odds ratio; Masc, masculino; Fem, feminino, DC, Doença de Crohn; todas as comparações foram feitas em relação ao grupo de homocigotos selvagens.

Tabela 8: Associações genótipo-fenótipo de C3435T do *MDR1* em pacientes com DC

<i>MDR1</i> Polimorfismo C3435T	HzS	HTz	p	OR	HzP	p	OR
Gênero							
Masc (n=49, 39.8%)	22	18	0.4290	0.72	9	0.703	1.23
Fem (n=74, 60.2%)	30	34			10		
Idade na data do diagnóstico							
<40 (A1) (n=61, 49.6%)	24	27	0.556	1.26	10	0.628	1.30
≥40 (A2) (n=62, 50.4%)	28	25			9		
Localização							
Íleo Terminal (L1) (n=21, 17.5%)	8	10	0.703	1.22	3	0.956	0.96
Cólon (L2) (n=61, 50.8%)	26	26	0.758	0.88	9	0.673	0.80
Ileocolônica (L3) (n=33, 27.5%)	12	15	0.621	1.25	6	0.552	1.42
Trato GI alto (L4) (n=5, 4.2%)	3	1	0.279	0.30	1	0.892	0.85
Comportamento							
Ulcerativa (B1) (n=43, 35.5%)	18	19	0.954	1.02	6	0.730	0.82
Estenosante (B2) (n=34, 28.1%)	13	11	0.564	0.76	10	0.036	3.16
Penetrante (B3) (n=44, 36.4%)	19	22	0.657	1.20	3	0.076	0.31
Atividade da doença							
Moderada/severa (n=23, 18.7%)	6	11	0.184	2.06	6	0.046	3.54
Leve/Remissão (n=100, 81.3%)	46	41			13		
Cirurgia devido a DC							
Sim (n=45, 36.6%)	20	20	1.000	1.00	5	0.342	0.57
Não (n=78, 63.4%)	32	32			14		
Doença Perianal							
Sim (n=37, 30.6%)	17	16	0.780	0.89	4	0.378	0.57
Não (n=84, 69.4%)	34	36			14		
Uso Crônico de Corticóide							
Sim (n=30, 26.1%)	10	12	0.789	1.14	8	0.043	3.29
Não (n=85, 73.9%)	37	39			9		
Efeitos Colaterais							
Sim (n=39, 31.9%)	13	22	0.071	2.14	4	0.700	0.78
Não (n=83, 68.1%)	38	30			15		

Legenda: HzS, homocigoto selvagem; HTz, heterocigoto; HzP, homocigoto polimórfico; OR, odds ratio; Masc, masculino; Fem, feminino; DC, Doença de Crohn; todas as comparações foram feitas em relação ao grupo de homocigotos selvagens.

As tabelas de 6 à 11 demonstram a análise multivariada pesquisada em cada polimorfismo buscando possíveis associações com características clínicas e demográficas dos dois grupos de pacientes: RCUI e DC, com avaliação dos seguintes parâmetros: sexo (gênero), idade, localização, comportamento fenotípico, atividade de doença, cirurgia, acometimento perianal (na DC), uso crônico de corticóides e efeitos colaterais às medicações.

Tabela 9: Associação de genótipo-fenótipo de C1236T do *MDR1* em pacientes com RCUI

<i>MDR1</i> C1236T	HzS	HTz	OR	p	HzP	OR	p
Gênero							
Masc. (n=40, %)	15	24	2.70	0.027	1	0.45	0.483
Fem. (n=47, %)	27	16			4		
Idade na data do diagnóstico							
<40 (A1) (n=29, %)	12	16	1.67	0.275	1	0.63	0.685
≥40 (A2) (n=58, %)	30	24			4		
Localização							
Pancolite (n=43, %)	22	19	1.12	0.804	2	0.67	0.671
Não Pancolite (n=42, %)	22	17			3		
Atividade da doença							
Moderada/Severa (n=14, %)	5	7	1.57	0.473	2	4.93	0.095
Leve/Remissão (n=76, %)	37	33			3		
Cirurgia devido a RCUI							
Sim (n=2, %)	2	0	0	0.167	0	0	0.618
Não (n=84, %)	40	39			5		
Uso Crônico de Corticóide							
Sim (n=35, %)	4	2	0.39	0.302	0	0	0.364
Não (n=52, %)	14	18			3		
Efeitos Colaterais da medicação							
Sim (n=17, %)	8	7	0.90	0.856	2	2.83	0.279
Não (n=70, %)							

Legenda: HzS, homozigoto selvagem; HTz, heterozigoto; HzP, homozigoto polimórfico; OR, odds ratio; RCUI, Retocolite Ulcerativa Idiopática; todas as comparações foram feitas em relação ao grupo de homozigotos selvagens.

Tabela 10: Associação genótipo-fenótipo de G2677T / A do *MDR1* em pacientes com RCUI

<i>MDR1</i> G2677T/A	HzS	HTz	OR	p	HzP	OR	p
Gênero							
Masc (n=40, %)	9	27	7.68	0.006	4	3.85	0.100
Fem (n=50, %)	26	21			3		
Idade na data do Diagnóstico							
<40 (A1) (n=30, %)	17	23	0.97	0.953	3	0.79	0.782
≥40 (A2) (n=60, %)	18	25			4		
Localização							
Pancolite (n=44, %)	15	27	1.62	0.290	2	0.48	0.412
Não Pancolite (n=43, %)	18	20			5		
Atividade da doença							
Moderada/Severa (n=14, %)	4	9	1.79	0.364	1	1.29	0.831
Leve/Remissão (n=73, %)	31	39			6		
Cirurgia devido a RCUI							
Sim (n=2, %)	1	1	0.74	0.832	0	0	0.651
Não (n=85, %)	34	46			7		
Uso Crônico de Corticóide							
Sim (n=36, %)	4	1	0.15	0.078	1	1.63	0.717
Não (n=51, %)	13	21			2		
Efeitos Colaterais da Medicação							
Sim (n=17, %)	7	9	0.92	0.886	1	0.67	0.725
Não (n=73, %)	28	39			6		

Legenda: HzS, homozigoto selvagem; HTz, heterozigoto; HzP, homozigoto polimórfico; OR, odds ratio; RCUI, Retocolite Ulcerativa Idiopática; todas as comparações foram feitas em relação ao grupo de homozigotos selvagens.

Tabela 11: Associação genótipo-fenótipo de C343T do *MDR1* em pacientes com RCUI

<i>MDR1</i> C3435T	HzS	HTz	OR	p	HzP	OR	p
Gênero							
Masc. (n=40, %)	15	18	2.40	0.070	7	2.43	0.178
Fem. (n=44, %)	26	13			5		
Idade na data do diagnóstico							
<40 (A1) (n=30, %)	15	12	1.09	0.853	3	0.58	0.456
≥40 (A2) (n=54, %)	26	19			9		
Localização							
Pancolite (n=41, %)	20	16	1.09	0.865	5	0.68	0.560
Não Pancolite (n=40, %)	19	14			7		
Atividade da doença							
Moderada/Severa (n=12, %)	6	5	1.12	0.861	2	1.17	0.862
Leve/Remissão (n=2, %)	35	26			10		
Cirurgia devido a RCUI							
Sim (n=2, %)	2	0	0	0.219	0	0	0.435
Não (n=82, %)	39	30			12		
Uso Crônico de Corticóide							
Sim (n=32, %)	2	3	0.89	0.905	1	0.67	0.763
Não (n=52, %)	12	16			4		
Efeitos Colaterais da medicação							
Sim (n=17, %)	8	7	1.20	0.751	2	0.83	0.824
Não (n=67, %)	33	24			10		

Legenda: HzS, homocigoto selvagem; HTz, heterocigoto; HzP, homocigoto polimórfico; OR, odds ratio; RCUI, Retocolite Ulcerativa Idiopática; todas as comparações foram feitas em relação ao grupo de homocigotos selvagens.

Nenhuma diferença significativa foi observada nas frequências genotípicas para os polimorfismos G2677T/A e C3435T do *MDR1* na DC ou na RCUI. O polimorfismo C1236T foi significativamente mais comum na DC do que na RCUI ($p = 0,036$).

Na RCUI foram encontrados mais homens nos polimorfismos C1236T e G2677T no grupo de heterocigotos.

Foram encontradas associações significativas entre o polimorfismo C3435T do gene *MDR1* em pacientes com fenótipo estenosante na DC (OR: 3,16, $p = 0,036$), em oposição ao comportamento penetrante (OR: 0,31, $p = 0,076$), resultado importante por ser inédito na literatura. Dos 34 pacientes que apresentaram estenoses, 10 apresentavam o polimorfismo do C3435T da forma homocigótica polimórfica enquanto dos 44 com fístulas, apenas 3 eram do tipo homocigótico polimórfico.

Na DC, associações significativas também foram encontradas entre o polimorfismo C3435T, à atividade moderada/severa da doença (OR: 3,54, $p = 0,046$), e à

resistência / refratariedade ao corticosteróide (OR: 3,29, $p = 0,043$) nos homozigotos polimórficos.

Nenhuma associação significativa foi encontrada entre os polimorfismos do *MDR1* e categorias fenotípicas, atividade de doença ou resposta ao tratamento da RCUI.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a presença dos polimorfismos C1236T, G2677T e C3435T, os mais conhecidos do gene *MDRI*, em pacientes portadores de DII, correlacionando esses achados com possíveis associações de características clínicas e demográficas dos dois grupos de pacientes: RCUI e DC.

Identificamos a presença dos polimorfismos C1236T, G2677T e C3435T do gene *MDRI* no DNA extraído do sangue periférico de 236 pacientes brasileiros portadores de doenças inflamatórias intestinais.

O Brasil é considerado um país de baixa prevalência das DII e estudos desta população com uma amostra ampla de pacientes são de extrema relevância, uma vez que nossa realidade pode não ser refletida por trabalhos realizados em países de maior prevalência destas doenças.

Em particular, verificou-se que o polimorfismo C1236T foi significativamente mais comum na DC em comparação a RCUI nos indivíduos homozigóticos polimórficos. Sabemos que 10% das colites por DII permanecem sem o diagnóstico definido, ficando classificadas como colite indeterminada (KANE, 2010). Esses indivíduos costumam apresentar uma inflamação descontínua da mucosa colônica que depõe contra a classificação de RCUI, mas, no entanto, não apresentam fístulas ou estenoses e os achados histopatológicos são inespecíficos para caracterização de uma das duas síndromes. Nestes casos, costuma-se pedir o P-ANCA, mais prevalente na RCUI e o ASCA, mais prevalente na DC, porém nas situações em que permanecer a dúvida e uma suspeita mais evidente do diagnóstico da DC ter validade para a adoção de um tratamento mais agressivo como a terapia biológica, pode ser útil a avaliação do polimorfismo C1236T, já que demonstrou-se um predomínio de DC nestes casos.

Em relação aos fenótipos da DC, uma associação significativa entre o polimorfismo C3435T e a forma estenosante, ainda não tinha sido descrita na literatura. Além disso, associações positivas entre os polimorfismos C3435T tanto com a atividade da doença quanto com o uso crônico de esteróides também foram identificados em pacientes com DC. O achado de tendências positivas e negativas sobre fenótipos específicos e polimorfismos, tanto na heterozigose quanto na homozigose, sugere que variantes do gene *MDRI* podem determinar ambos os efeitos: de sensibilização e proteção na DC.

Evidências demonstram que os polimorfismos do gene *MDR1* podem estar associados com o desenvolvimento de DII. No entanto, os estudos sobre associações genéticas com os polimorfismos C3435T, G2677T/A, e C1236T produziram resultados contraditórios, tornando os dados inconclusivos. Atualmente, vários polimorfismos do gene *MDR1* foram relatados, tendo sido o polimorfismo C3435T o mais investigado nas DII.

Semelhante aos nossos resultados, uma associação entre alelos, polimorfismos e haplótipos do *MDR1* foi relatada em doentes com DC refratários ao tratamento, e, em menor proporção, também em doentes com RCUI, numa população eslovena (POTOCNICK; FERKOLJ; GLAVAC D. *et al.*, 2005). Em outro estudo realizado em uma grande coorte nos Estados Unidos, os investigadores observaram uma associação significativa de DC com um polimorfismo contido dentro do exon 21 (G2677T/CA1a893Ser/Thr), que acredita-se estar relacionada com a alteração do transportador e/ou da expressão da atividade do gene (BRANT; PANHUYSSEN; NICOLAE, *et al.*, 2003). Em estudo de caso-controle na Espanha, uma associação significativa do C3435T com a DC foi caracterizada, além da identificação de susceptibilidade do haplótipo 2677T/C3435 para a DC (URCELAY; MENDOZA; MARTIN *et al.*, 2006). Adicionalmente, em estudo de investigadores italianos foi encontrada associação significativa do polimorfismo C3435T com a localização ileocolônica da DC (ARDIZZONE; MACONI; BIANCHI *et al.*, 2007). Por outro lado, em estudo realizado no Reino Unido com um grande grupo de casos-controle, os polimorfismos C3435T e G2677T/A do gene *MDR1*, foram associados a um risco aumentado de desenvolvimento de RCUI (ONNIE; FISHER; PATTNI, *et al.*, 2006). Além disso, em contraste com os resultados da presente pesquisa, estudos controlados com coortes de pacientes europeus da Alemanha (SHWAB; SCHAEFFLERER; MARX. *et al.*, 2003), e da Escócia (HO; NIMMO; TENESA *et al.*, 2005), também sugerem uma possível associação entre o polimorfismo C3435T do *MDR1* e a RCUI. No entanto, em outro estudo italiano, os polimorfismos do gene *MDR1* não demonstraram nenhum papel significativo na susceptibilidade à doença ou à resposta ao tratamento nas DII (LATIANO A; PALMIERI O; LATIANO T. *et al.*, 2011).

As possíveis razões para tais discrepâncias entre os estudos podem ser atribuídas a diferentes desenhos de estudo, tamanhos de amostra, seleção de controles, mas também as populações distintas de pacientes. Na verdade, as meta-análises foram realizadas a fim de

tentar superar a heterogeneidade dos estudos envolvendo os polimorfismos do gene *MDR1*. Ressalta-se que alguns estudos parecem revelar que as freqüências alélicas das três principais variantes diferem consideravelmente quando analisadas em populações distintas. A associação significativa do alelo 3435T com a RCUI foi confirmada em uma meta-análise (ONNIE; FISHER; PATTNI, *et al.*, 2006), enquanto que em outro estudo, o alelo 3435T e genótipo 3435TT demonstraram estar significativamente associados a RCUI, mas não à DC (ANNSE; VALVANO; PALMIERI *et al.*, 2006). Diferenças da freqüência de alelos dos polimorfismos do C3435T foram detectadas mais vezes no alelo C (tipo selvagem) em populações africanas em comparação com populações caucasianas e populações asiáticas (SCHAELELER; EICHELBAUM; BRINMANN *et al.*, 2001). Em estudo asiático, perfis distintos de haplótipos e forte desequilíbrio de ligação no locus do gene *MDR1* foram detectados em todos os três grupos étnicos envolvidos na investigação (TANG; NGOI; GWEE, *et al.*, 2002).

Em um estudo recente, também realizado no Rio de Janeiro, Brasil, com a mesma área de recrutamento e etnia dos nossos casos de DII, 278 indivíduos saudáveis foram analisados em relação às freqüências genotípicas e alélicas de polimorfismos do gene *MDR1*. Os investigadores encontraram uma distribuição peculiar variante, com diferenças significativas entre C1236C e C3435T e também C1236C e C3435C, em comparação com os resultados obtidos com vários outros grupos étnicos (SCHEINER; DAMASCENO; MAIA, 2009). Neste contexto, deve-se ressaltar que os dados de populações de diferentes origens potenciais, como européia ou africana, não podem ser considerados representativos das freqüências genotípicas e alélicas dos brasileiros, devido à heterogeneidade e, especialmente, a mistura da grande parte da população brasileira (ALVES-SILVA; SANTOS; GUIMARAES, *et al.*, 2000 e PARRA; AMADO; LAMBERTUCCI J.R., *et al.*, 2003). Em conjunto com os resultados de nosso estudo, essas observações ressaltam a importância crítica de analisar polimorfismos do gene *MDR1* em brasileiros e, em especial, em pacientes brasileiros portadores de DII.

Potenciais associações de genótipo-fenótipo relativas ao gene *MDR1* também têm sido investigadas com resultados contraditórios. No presente estudo, demonstramos pela primeira vez associações positivas entre o polimorfismo C3435T tanto com córtico dependentes/refratários, quanto com a atividade da doença em pacientes com DC. Em um estudo britânico em DII, por exemplo, o alelo 2677T foi mais prevalente em casos de RCUI e o genótipo TT foi associado significativamente com RCUI grave e a utilização de

esteróides na RCUI (ONNIE; FISHER; PATTNI, *et al.*, 2006). Em contraste, em um grande grupo de pacientes com DII usando esteróides, tanto os polimorfismos C3435T quanto G2677T/A foram avaliados sem diferenças significativas nos subgrupos ou entre os subgrupos, e nenhuma influência de qualquer polimorfismo do *MDR1* foi encontrada com relação à resposta ao tratamento (PALMIERI; LATIANO; VALVANO R, *et al.*, 2005).

Os corticoides são potentes inibidores da ativação das células T e de citocinas pró-inflamatórias o que os torna bastante efetivos no tratamento agudo das DII. No entanto, a falência de resposta ao uso agudo ou crônico destes corticoesteroides é uma comum indicação de cirurgia.

Aproximadamente 50% dos pacientes com DC e 20% com RCUI necessitarão de alguma cirurgia ao longo de suas vidas. Estudos demonstram que um terço (1/3) dos pacientes com DC são córtico-dependentes e um quinto (1/5) córtico-resistentes. Dentre os portadores de RCUI, um quarto (1/4) são dependentes de esteroides e um sexto (1/6) a eles resistentes (FARRELL; KELLEHER, 2003).

Uma das possíveis explicações da resistência aos corticoides nas DII é o aumento de efluxo de corticoide mediado pela Pg-P, gerando conseqüente diminuição da concentração citoplasmática de corticoides em enterócitos com aumento da expressão do *MDR1* (FARRELL; KELLEHER, 2003).

A Pg-P situada na região apical de linfócitos e células epiteliais intestinais transporta ativamente os corticosteróides e outras drogas para fora dessas células, reduzindo a sua eficácia. Já foi demonstrada inclusive, a elevada expressão de *MDR1* nos linfócitos de sangue periférico e de enterócitos em portadores de DC e RCUI, que necessitaram de tratamento cirúrgico por falência de tratamento clínico (FARRELL *et al.*, 2000).

Esse achado sugere que portadores de DII refratários podem não se beneficiar dos efeitos imunossupressores dos esteroides ou de outras drogas como a ciclosporina, por serem essas drogas substratos comprovados da bomba de efluxo (Pg-P), que diminui a concentração das medicações nas células. Reforçando essa teoria, observou-se que o uso de inibidores da bomba ligada ao *MDR1*, como o PSC 833, podem aumentar os níveis intracelulares de cortisol e ciclosporina nos linfócitos T e enterócitos (FARRELL *et al.*, 2003).

O *MDR1* tem sua expressão mais evidente em tecidos sujeitos à exposição a materiais tóxicos, como o fígado, os pulmões, o intestino e os rins. A localização da bomba excretora nas superfícies apicais das células serve como mecanismo de defesa para não entrada de toxinas, como por exemplo, no lúmen intestinal.

Há evidências ainda de que a inibição do *MDR1* tem implicação terapêutica em outras patologias inflamatórias crônicas, após observação de um significativo aumento de linfócitos T em pacientes com artrite reumatoide (MALILLEFERT, 1996) e nos portadores de lúpus eritematoso sistêmico (DIAZ-BORJON *et al*, 2000) com resistência ao corticoide (FARRELL *et al*, 2003).

Dentre os polimorfismos do *MDR1* os mais estudados são o C3435T, C1236T e G2677T. Observou-se que o polimorfismo C3435T apresentou significativa correlação com a expressão de Pg-P em indivíduos saudáveis (FARRELL *et al*, 2003), corroborando com os achados da presente pesquisa, que encontrou significância estatística para pacientes cortico-dependentes com o fenótipo homozigoto polimórfico deste polimorfismo.

Além disso, a frequência do polimorfismo C3435T varia conforme a etnia com uma frequência estimada de 26% nos caucasianos, 34% nos asiáticos e 61% nos negros americanos (CASCORBI *et al*, 2001). Estudos populacionais do tipo coorte evidenciam uma cortico-resistência variando de 20 a 40% nos caucasianos, o que sugere que a farmacogenética do *MDR1* pode estar influenciando este subgrupo, tendo em vista a proximidade das taxas observadas (FARRELL *et al*, 2003).

A DC apresenta três comportamentos fenotípicos habituais que podem se manifestar de forma isolada ou concomitante nos portadores da doença: a forma ulcerativa/inflamatória, a forma estenosante e a forma penetrante. A maioria dos pacientes apresenta a forma ulcerativa, enquanto a penetrante costuma se manifestar em cerca de 30% dos doentes e a forma estenosante em apenas 10% (KANE, 2010). Não há consenso na literatura sobre que fatores predisponem a uma ou outra forma fenotípica e acredita-se que fatores genéticos possam influenciar a forma de apresentação predominante. Recentemente demonstrou-se um predomínio do alelo T e do genótipo TT do gen *CD14* de portadores de DII na Coreia em relação ao grupo controle sem doença, e na análise por subgrupos foi evidenciada uma maior frequência de pancolite como apresentação fenotípica da RCUI (KIM; CHUNG; PAIK *et al*, 2012).

Como já citado, uma coorte italiana estudou diversos polimorfismos que poderiam se correlacionar com DII naquela população. Observou-se que os polimorfismos TNFSF15, NKX2-3, ZNF365 e PTPN2 tiveram associação significativa com a DC, enquanto e os polimorfismos PTGER4, NKX3-2, ZNF365, PSMG1 e HLA com a RCUI, e ainda que havia correlação entre NKX2-3 e necessidade de cirurgia e HLA com resistência a esteroides, ambos na RCUI. Além disso, na coorte de DC houve correlação de TNFSF15 com envolvimento colônico e ZNF365 com predomínio de apresentação da forma íleo-colônica, indicando que fatores genéticos podem influenciar a forma de apresentação da DII (LATIANO; PALMIERI *et al*, 2012) .

O comportamento estenosante da DC, também conhecido como forma fibroestenótica da DC, foi associado com o *NOD2*, variantes e no envolvimento do intestino delgado de pacientes com DC (ABREU; TAYLOR; LIN, *et al.*, 2002). No entanto, outro estudo demonstrou que o fenótipo fibroestenótico da DC, foi significativamente associado às variantes genéticas do *NOD2* e também com título elevado de anticorpos contra oligomannan, OmpC, I2, e CBIR, independentemente da localização da doença (IPPOLITI; DEVLIN; MEI, *et al.*, 2011). Estes resultados suportam a idéia de que a imunidade inata alterada pode ter sinergia com a perda de tolerância a antígenos microbianos e a resposta imune adaptativa, favorecendo um fenótipo específico de DC. Idéia em parte reforçada pela teoria de Rieder e Fiocchi (2008), que em artigo de revisão sobre fibrose intestinal, além dos mecanismos conhecidos de fibrose como migração e proliferação de fibroblastos, ativação de células estreladas e recrutamento de fibroblastos extraintestinais, os autores destacam novos mecanismos de produção de fibrose, como a transição epitelial-mesenquimal, a diferenciação de periócitos e o recrutamento de fibrócitos e propõem ainda que a fibrose possa se desenvolver por via independente da ativação imune persistente do intestino.

Em contraste com estudos relatados até agora sobre polimorfismos do gene *MDR1* na DII, outra associação de genótipo-fenótipo encontrada em nosso estudo foi a associação positiva significativa entre o polimorfismo C3435T e a forma estenosante da DC. Embora o mecanismo pelo qual um polimorfismo do *MDR1* possa determinar um fenótipo específico ainda precise ser determinado, existem algumas provas de que o *MDR1* participa de uma rede biológica complexa com múltiplos mediadores fisiologicamente relevantes e vias incluindo citocinas pró-inflamatórias (EVSEENKO; PAXTON; KEELAN, 2007), endotoxinas que induzem inflamação (TOMITA;

TAKIZAWA; KANBAYASHI, *et al.*, 2012.), fatores de transcrição tais como NF-kB (KUO; LIU; WEI, *et al.*, 2002 e INOUE; NAKASE; MATSUURA, *et al.*, 2009), e cicloxigenases (ZRIEKI A.; FARINOTTI R.; BUYSE M., 2010), que podem modular a expressão e a atividade do *MDRI* em diferentes níveis. Assim, estes complexos mecanismos reforçam o papel fundamental da P-gp na biodisponibilidade das drogas e na homeostasia epitelial no contexto da inflamação e da infecção. No entanto, a contribuição do gene *MDRI* na resposta aos medicamentos e, possivelmente, na susceptibilidade a fenótipos nas DII, incluindo o comportamento estenosante na DC, necessitam de maiores esclarecimentos. O melhor entendimento desse mecanismo de produção de fibrose pode estimular o uso de transplante de determinadas células tronco como terapia antifibrogênica em portadores de DII no futuro se confirmado.

Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem que os polimorfismos do gene *MDRI* poderiam estar implicados na susceptibilidade a DC e no seu fenótipo estenosante, como também estarem associados com uma resposta inadequada ao tratamento em um grupo de pacientes com DC. A forte relação com a DC suporta a existência de papéis adicionais para o *MDRI* em mecanismos específicos subjacentes na patogênese da DC, como o controle da microbiota intestinal, mediação e regulação da fibrose. Além disso, compreender os efeitos de vários fármacos associados a estas variantes do *MDRI* pode contribuir para a prescrição personalizada de regimes terapêuticos.

6 CONCLUSÕES

Os polimorfismos do gene *MDR1* podem contribuir com o diagnóstico das DII, especificamente a DC. Existe predomínio de DC em relação à RCUI em portadores do polimorfismo C1236T nos indivíduos homozigóticos polimórficos.

Os polimorfismos do gene *MDR1* estão associados ao fenótipo da DC. Existe associação positiva significativa favorável à presença de estenose e associação negativa em relação à forma penetrante do polimorfismo C3435T, achado inédito na literatura.

Existe correlação dos polimorfismos do gene *MDR1* na DC com a atividade de doença moderada/severa e com a resposta ao tratamento, observando-se associação positiva do C3435T em relação ao uso crônico de corticoides.

A presença dos polimorfismos do gene *MDR1* não está associada ao fenótipo, à gravidade da doença, à resposta ao tratamento ou a efeitos colaterais nos pacientes com RCUI.

REFERÊNCIAS

1. ABRAHAM C.; CHO H. **Mechanims of disease: Inflammatory Bowel Disease.** *N Eng J Med* (2009) 361:2066-78
2. ABREU M.T.; TAYLOR K.D.; LIN Y.C., *et al.* **Mutations in NOD2 are associated with fibrostenosing disease in patients with Crohn's disease.** *Gastroenterology.* (2002) 123:679-688
3. ALVES-SILVA J, SANTOS M. S.; GUIMARAES P.E., *et al.* **The ancestry of Brazilian mtDNA lineages.** *Am J Hum Genet.* (2000) 67:444-461
4. ANNSE V.; VALVANO M.R.; PALMIERI O., *et al.* **Multidrug resistance 1 gene in inflammatory bowel disease: a meta-analysis.** *World J Gastroenterol.* (2006) 12:3636-3644
5. ARDIZZONE S.; MACONI G.; BIANCHI V., *et al.* **Multidrug resistance 1 gene polymorphism and susceptibility to inflammatory bowel disease.** *Inflamm Bowel Dis.* (2007) 13:516-523
6. ASSCHE V.G.; DIGNASS A.; PANES J. *et al.* **The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis.** *Journal of Crohn's and Colitis* (2010) 4: 7–27
7. BODOR M.; KELLY E.; HO R. **Characterization of the human MDR1 Gene.** *The AAPS Journal* (2005) 7: a.1
8. BRANT S.R; PANHUYSEN C.I; NICOLAE D, *et al.* **MDR1 Ala893 polymorphism is associated with inflammatory bowel disease.** *Am J Hum Genet.* (2003) 73:1282-1292
9. DUBINSKY M.; TAYLOR K.; TARGAN S. *et al.* **Immunogenetic phenotypes in inflammatory bowel disease.** *World J Gastroenterol* (2006) 12 (23): 3654-3660

10. ENGLUND G.; JACOBSON A.; RORSMAN F. *et al.* **Efflux Transporters in Ulcerative Colitis: decreased expression of BCRP (ABCG2) and PGP (ABCB1).** *Inflamm Bowel Dis* (2007) v. 13, n.3
11. EVSEENKO D.A.; PAXTON J.W.; KEELAN J.A. **Independent regulation of apical and basolateral drug transporter expression and function in placental trophoblasts by cytokines, steroids, and growth factors.** *Drug Metab Dispos.* (2007) 35:595-601
12. FARRELL R.J.; KELLEHER D. **Mechanisms of steroid action and resistance in inflammation – Glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease.** *Journal of Endocrinology* (2003) 178, 339-346
13. FBG- FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE GASTROENTEROLOGIA (Brasil). **Doença Inflamatória Intestinal: Edições Monotemáticas da FBG.** São Paulo, 2012. p. 113-133
14. HO G-T.; NIMMO E.; TENESA A. *et al.* **Allelic Variations of the Multidrug Resistance Gene Determine Susceptibility and disease behavior in Ulcerative Colitis.** *Gastroenterology* (2005) 128:288-296
15. HO G-T; SORANZOA N.; NIMMO E.R. *et al.* **ABCB1/ MDR1 gene determines susceptibility and phenotype in ulcerative colites: discrimination of critical variants using a gene-wide haplotype tagging approach.** *Human molecular Genetics* (2006) v.15, n.5
16. HUEBNER C.; BROWNING B.; PETERMANN I. *et al.* **Genetic Analysis of MDR1 and Inflammatory Bowel Disease reveals protective effect of heterozygous variants for Ulcerative Colites.** *Inflamm Bowel Dis* (2009) v. 15, n.12
17. HUANG Y.; SADÉE W. **Membrane transporters and channels in chemoresistance and sensitivity of tumor cells.** *Cancer letters* (2006) 239:168-182

18. INOUE S.; NAKASE H.; MATSUURA M., *et al.* **The effect of proteasome inhibitor MG132 on experimental inflammatory bowel disease.** *Clin Exp Immunol.* (2009) 156:172-182
19. IPPOLITI A., DEVLIN S., MEI L., *et al.* **Combination of innate and adaptive immune alterations increased the likelihood of fibrostenosis in Crohn's disease.** *Inflamm Bowel Dis.* (2011) 16:1279-1285
20. KANE S.V. **IBD Self Management: The AGA guide to Crohn's Disease and Ulcerative Colitis.** AGA Press (2010): 1-46
21. KIM E.J; CHUNG W.C; LEE K-M *et al.* **Association Between Toll-like Receptors/ CD14 Gene Polymorphisms and Inflammatory Bowel Disease in Korean Population.** *J Korean Med Sci* (2012) 27: 72-77.
22. KIMCHI-SARFATY C.; OH J.M.; KIM I-W. *et al.* **Silent gene mutation can change function of anticancer drug pump.** *Science Express* (2007) v.13: 525-527
23. KUGATHASAN S.; AMRE D. **Inflammatory Bowel Disease – Environmental Modification and Genetic Determinants.** *Pediatric Clin N Am* (2006) 53: 727-749
24. KUO M.T.; LIU Z.; WEI Y., *et al.* **Induction of human MDR1 gene expression by 2-acetylaminofluorene is mediated by effectors of the phosphoinositide 3-kinase pathway that activate NF-kappaB signaling.** *Oncogene.* (2002) 21:1945-1954
25. LATIANO A; PALMIERI O; LATIANO T. *et al.* **Investigation of Multiple Susceptibility Loci for Inflammatory Bowel Disease in an Italian Cohort of Patients.** *PLoS ONE* (2011) vol 6; issue 7: e22688

26. LI E; HAMM C; GULATI A. *et al.* **Inflammatory Bowel Diseases Phenotype, *C. difficile* and NOD2 Genotype are Associated with Shifts in Human Ileum Associated Microbial Composition.** *PLoS ONE* (2012) vol 7; issue 6 : e26284
27. NOBLE C.; NIMMO E.; GAYA D. *et al.* **Novel susceptibility genes in inflammatory bowel disease.** *World J Gastroenterol* (2006) 12 (13):1991-1999
28. OOSTENBRUG L.; DIJKSTRA G.; NOLTE I. *et al.* **Absence of association between the multidrug resistance gene and inflammatory bowel disease.** *Scandinavian Journal of Gastroenterology* (2006) 41:1174-1182
29. QUILICI F. **Guia prático da Doença Inflamatória Intestinal.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p.23-132
30. QUILICI F. **Guia prático da Doença Inflamatória Intestinal.** Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p.18-29
31. MIFFLIN R.C; PINCHUK I.V; SAADA J.I *et al.* **Intestinal myofibroblasts: targets for stem cell therapy.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2011) 300; 5: G684-G696
32. ONNIE C.M.; FISHER S.A.; PATTNI R, *et al.* **Associations of allelic variants of the multidrug resistance gene (ABCB1 or MDR1) and inflammatory bowel disease and their effects on disease behavior: a case-control and meta-analysis study.** *Inflamm Bowel Dis.* (2006)12:263-271
33. PALMIERI O.; LATIANO A.; VALVANO R, *et al.* **Multidrug resistance 1 gene polymorphisms are not associated with inflammatory bowel disease and response to therapy in Italian patients.** *Aliment Pharmacol Ther.* (2005) 22:1129-1138
34. PARRA F.C.; AMADO R.C.; LAMBERTUCCI J.R., *et al.* **Color and genomic ancestry in Brazilians.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2003) 100:177-182
35. PINHO M. **A Biologia Molecular das Doenças Inflamatórias Intestinais.** *Rev bras Coloproct.* (2008) 28; 1: 119-123.

36. POTOČNICK U.; FERKOLJ I.; GLAVAC D. *et al.* **Polymorphisms in multidrug resistance 1 (MDR1) gene are associated with refractory Crohn disease and ulcerative colitis.** *Genes and Immunity* (2005) 5, 530-539
37. RIEDER F and FIOCCHI C. **Intestinal fibrosis in inflammatory bowel disease – Current Knowledge and future perspectives.** *J Crohns Colites* (2008) vol 2; issue 4: 279-90.
38. SAKAI P. **Tratado de Endoscopia Digestiva Diagnóstica e Terapêutica.** Ed. Atheneu (2007) v. 4: 191-199
39. SCOTTO K. **Transcriptional regulation of ABC drug transporters.** *Oncogene* (2003) 22: 7496-7511
40. SCHAELELER E., EICHELBAUM M., BRINMANN U., *et al.* **Frequency of C3435T polymorphism of MDR1 gene in African people.** *Lancet.* (2001) 358:383-384
41. SCHEINER M.A.; DAMASCENO A.M.; MAIA R.C. **ABCB1 single nucleotide polymorphisms in the Brazilian population.** *Mol Biol Rep.* (2009) 37:111-118
42. SHWAB M.; SCHAEFFLERER E.; MARX C. *et al.* **Association between the C3435T MDR1 gene polymorphis and susceptibility for Ulcerative Colites.** *Gastroenterology* (2003)124: 26-33
43. TANG K.; NGOI S.M.; GWEE P.C., *et al.* **Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations.** *Pharmacogenetics.* (2002) 12:437-450
44. TOMITA M.; TAKIZAWA Y.; KANBAYASHI A., *et al.* **Suppression of efflux transporters in the intestines of endotoxin-treated rats.** *Int J Pharm.* (2012) 428:33-38
45. URCELAY E.; MENDOZA J.L.; MARTIN M.C., *et al.* **MDR1 gene: susceptibility in Spanish Crohn's disease and ulcerative colitis patients.** *Inflamm Bowel Dis.* (2006) 12:33-37

46. WEERSMA R.; VAN DULLEMEN H. M.; VAN DER STEEGE G. *et al.* **Review article: inflammatory bowel disease and genetics.** *Aliment Pharmacol Ther* (2007) 26 s.2: 57–65
47. ZRIEKI A.; FARINOTTI R.; BUYSE M. **Cyclooxygenase-2 inhibitors prevent trinitrobenzene sulfonic acid-induced P-glycoprotein up-regulation in vitro and in vivo.** *Eur J Pharmacol.* (2010) 636:189-197

APÊNDICE A – FORMULÁRIO DE ADMISSÃO NO ESTUDO**Ficha de acompanhamento dos pacientes portadores de DII****Paciente nº:**

Data de entrada no estudo: _____

Paciente: _____

Nº pront HUPE: _____

Externo : _____

Data de Nascimento: _____ Idade: _____

End: _____

Tel: _____

Assinou termo de consentimento: S () N ()

Início dos sintomas (ano): _____ Diagnóstico feito (ano): _____

Doença: RCUI () Extensão da doença: () não pan-colite () pancolite

Doença de Crohn () Forma da doença:

() ulcerativa

() estenosante

() penetrante

Extensão da doença: () íleo-colite () delgado proximal/TGI sup

() colite () íleo () perianal exclusiva

Medicações em uso / data de início/ dose:

Tabagista : () Sim () Não

Índice de atividade de doença no momento da coleta do sangue:

RCUI: () leve () moderada () grave (Índice de atividade da doença na RCUI)

Doença de Crohn: () leve () moderada () grave (Índice de Harvey-Bradshaw)

Efeitos Colaterais:

Síndrome gripal: S () N ()

Náuseas/vômitos: S () N ()

Mielossupressão S () N ()

Neutropenia: S () N ()

Elevação de transaminases/ hepatopatia: S () N ()

Elevação de Amilase/lípase S () N ()

Pancreatite clínica: S () N ()

Reação alérgica/Dermatite: S () N ()

Houve necessidade de diminuição da dose e/ou suspensão da medicação? Qual?

Avaliação antes do uso da medicação (se houver):

DATA:

Avaliação clínica:

Estado geral: ótimo () bom () regular () ruim () péssimo ()

Peso : _____ Altura: _____

Fadiga () Anemia () Hiporexia () Icterícia () Febre () _____

Perda ponderal() _____

Dor abdominal() _____

Nº evacuações/dia _____

Aspecto das fezes _____

Sangramento () Muco () Pus ()

Dor articular () Artrite () _____

Alterações oftalmológicas() _____

Alterações cutâneas() _____

Aftas orais() _____

Massa abdominal: _____

Alterações perianais: Fissura () Fístula () Abscesso ()

Outras fístulas: _____

Exames de sangue (data: ___/___/____)

Htº: _____ Hb: _____

Leuc: _____ Seg: _____ Bt: _____

VHS: _____ PCR: _____

TGO: _____ TGP: _____

G-GT: _____ FA: _____

Amilase: _____ Lipase: _____

Índice de Harvey-Bradshaw (DC): _____

Índice de atividade da doença na RCUI: _____

Avaliação pós tratamento:

DATA:

Medicações em uso(dose e tempo de uso):

Avaliação clínica:

Estado geral: ótimo () bom () regular () ruim () péssimo ()

Peso : _____ Altura: _____

Fadiga () Anemia () Hiporexia () Icterícia () Febre () _____

Perda ponderal() _____

Dor abdominal() _____

Nºevacuações/dia _____

Aspecto das fezes _____

Sangramento () Muco () Pus ()

Dor articular () Artrite () _____

Alterações oftalmológicas() _____

Alterações cutâneas() _____

Aftas orais() _____

Massa abdominal: _____

Alterações perianais: Fissura () Fístula () Abscesso ()

Outras fístulas: _____

Exames de sangue (data: ___/___/____)

Htº: _____ Hb: _____

Leuc: _____ Seg: _____ Bt: _____

VHS: _____ PCR: _____

TGO: _____ TGP: _____

G-GT: _____ FA: _____

Amilase: _____ Lipase: _____

Índice de Harvey-Bradshaw (DC): _____

Índice de atividade da doença na RCUI: _____

APÊNDICE B: TERMO DE CONSENTIMENTO INFORMADO



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
DISCIPLINA DE GASTROENTEROLOGIA E
ENDOSCOPIA DIGESTIVA

CONSENTIMENTO INFORMADO

O Sr (a) estará participando de um estudo para defesa de Mestrado intitulado: **Estudo dos polimorfismos C1236T, G2677T e C3435T do gene *MDR1* no sangue de pacientes portadores de doenças inflamatórias intestinais**, que investiga se algumas alterações genéticas podem influenciar no comportamento das Doenças Inflamatórias Intestinais (DII). Vamos avaliar se estas possíveis alterações genéticas ocorrem de maneira significativa nas DII e buscar possíveis associações com características clínicas e demográficas dos dois grupos de pacientes: Retocolite Ulcerativa Idiopática (RCUI) e Doença de Crohn (DC). Pretendemos ainda, correlacionar esses polimorfismos (material genético) com a atividade da doença (gravidade da doença), com a resposta ao tratamento e com os efeitos colaterais de medicamentos nos pacientes com DII.

Para realizar esta avaliação estudaremos o DNA presente no seu sangue. Para isso, serão colhidas amostras de sangue, durante uma consulta e o material será enviado ao laboratório para futura análise.

Em caso de dúvidas, estaremos a disposição no Serviço de Gastroenterologia e Endoscopia Digestiva do Hospital Universitário Pedro Ernesto, no telefone 2587-6358 ou, ainda, todas as sextas-feiras, a partir das 13 horas, no Ambulatório de Doenças Inflamatórias Intestinais.

A não participação neste trabalho não implicará em qualquer prejuízo ao seu acompanhamento e tratamento. As informações colhidas serão sigilosas e poderão contribuir para melhor entendimento de sua doença.

Li, entendi e concordo em participar do estudo.

Rio de Janeiro, ___ de _____ de 20____.

_____/_____
 Nome Documento de identidade

ANEXO A: APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



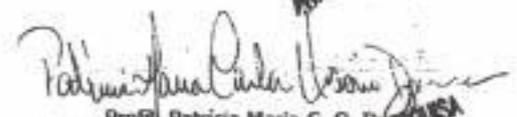
Rio de Janeiro, 10 de Dezembro de 2008

Do: Comitê de Ética em Pesquisa
Prof^ª. Patrícia Maria C. O. Duque
Para: Prof^ª. Ana Teresa P. Carvalho

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto (2310-CEP/HUPE) "LINHA DE PESQUISA EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS – FISIOPATOLOGIA DA INFLAMAÇÃO CRÔNICA, MECANISMO DE AÇÃO DAS DROGAS, RESPOSTAS CLÍNICA E EFEITOS COLATERAIS" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º 196, sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o consentimento livre e esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^ª., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.


Prof^ª. Patrícia Maria C. O. Duque
Membro do Comitê de Ética em Pesquisa
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
HUPE/UEERJ

ANEXO B: SUBMISSÃO DO ARTIGO EM REVISTA

----- Forwarded message -----

From: <clinics@hc.fm.usp.br>

Date: Wed, Oct 16, 2013 at 3:55 PM

Subject: CLINICS - Decision on Manuscript ID CLINICS-2013-0420.R2

To: heitor.souza@gmail.com

Cc: clinics@hc.fm.usp.br

16-Oct-2013

Dear Prof. Souza:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Multidrug Resistance 1 Gene Polymorphisms may determine Crohn's disease behavior in patients from Rio de Janeiro" in its current form, for publication in CLINICS.

The publication fee for this article is R\$ 2.400,00. Please print this letter, complete and sign the DECLARAÇÃO below, and return it attached to an email to our Editorial Office (n.gomes@hc.fm.usp.br and clinics@hc.fm.usp.br).

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of CLINICS, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Wagner Gattaz & Edmund Baracat

Editors, CLINICS

www.clinics.org.br