

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA**

***POLIMORFISMO DO HLA-G EM PACIENTES COM  
DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS***

**NUTIANNE CAMARGO SCHNEIDER**

**Porto Alegre  
2009**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA**

***POLIMORFISMO DO HLA-G EM PACIENTES COM  
DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS***

**NUTIANNE CAMARGO SCHNEIDER**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção de grau de Mestre pelo Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, área de concentração de Clínica Médica da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

**Orientadora: Dra. Denise Cantarelli Machado**

**Co-orientadora: Dra. Marta Brenner Machado**

**Porto Alegre  
2009**

S359p Schneider, Nutianne Camargo.

Polimorfismo do HLA-G em pacientes com doenças inflamatórias intestinais / Nutianne Camargo Schneider; orient. Denise Cantarelli Machado, co-orient. Marta Brenner Machado. Porto Alegre : PUCRS, 2009.

66 f.: il. tab.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de Concentração: Clínica Médica.

1. Enteropatias Inflamatórias. 2. Proctocolite. 3. Doença de Crohn. 4. HLA-G. 5. Polimorfismo Genético. 6. Imunogenética. 7. Estudos Transversais. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Machado, Marta Brenner. III. Título.

CDD 616.344  
NLM WI 522

Bibliotecária Responsável:  
Sabrina Caimi Silva da Costa  
CRB10/1606

## **Dedicatória**

***Aos pacientes,  
razão do meu trabalho e esforço.***

## **Agradecimentos**

Durante o período de execução deste trabalho pude contar com o auxílio de algumas pessoas, como colaboradores e amigos, que além da contribuição técnica e científica, confirmaram sua importância na minha vida. Deste modo, gostaria de agradecer:

A Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado, minha orientadora, por me aceitar como aluna, pelos momentos de ensino, paciência, competência e ajuda na elaboração deste estudo.

A Profa. Dra. Marta Brenner Machado, minha co-orientadora, por me despertar a paixão por esta área da gastroenterologia, pelo incentivo ao estudo e por me prover acesso aos pacientes.

Ao Prof. Dr. Jose Artur Bogo Chies, pelos ensinamentos em pesquisa biológica e genética, pela acolhida incondicional em um momento crítico deste trabalho, pela inestimável contribuição e disponibilidade durante a execução deste estudo.

A Profa. Dra. Alessandra Perez, pela ajuda nos momentos críticos, pelos ensinamentos em biologia, imunologia e genética e, pela acessibilidade e disposição nesses últimos anos.

Ao Prof. Dr. Mario Wagner, pela orientação epidemiológica, pela paciência e pela colaboração na análise estatística.

À Carmen Freitas, por ter acreditado em mim, pelo incentivo constante não me deixando desistir diante das dificuldades enfrentadas durante a realização deste mestrado.

A todas as instituições de ensino por onde passei, desde o ensino fundamental até o mestrado. A todos os professores, pouco valorizados em nosso país e muito importantes em nossas vidas.

Aos pacientes que participaram deste estudo.

Aos meus avós, pelos maravilhosos anos de amor, de convivência e de ensinamentos de vida que tive ao lado de vocês.

À minha família, em especial minha mãe Maria Beatriz, por ter me proporcionado durante toda a minha vida condições de realizar meus sonhos, por ser um exemplo de amor e de dedicação ao trabalho e pelo apoio incondicional sempre.

À Deus.

## Sumário

Dedicatória.....	iv
Agradecimentos .....	v
Sumário.....	1
Resumo .....	3
Abstract.....	5
Lista de figuras.....	7
Lista de tabelas .....	8
Lista de Abreviaturas.....	9
Lista de anexos .....	11
1. Introdução.....	12
2. Justificativa.....	14
3. Objetivos.....	15
3.1. <i>Objetivo principal:</i> .....	15
3.2. <i>Objetivos secundários:</i> .....	15
4. Revisão bibliográfica .....	16
4.1. <i>Epidemiologia</i> .....	16
4.2. <i>Fatores de risco</i> .....	18
4.3. <i>Aspectos clínicos</i> .....	19
4.3.1. <i>Doença de Crohn (DC)</i> .....	21

4.3.2. Retocolite Ulcerativa (RCU) .....	23
4.4. Etiologia .....	24
4.5. Fisiopatologia: regulação do sistema imune e mediadores inflamatórios .....	27
4.6. Caracterização imunogenética do HLA-G .....	33
<b>5. Material e Métodos .....</b>	<b>41</b>
5.1. Delineamento .....	41
5.2. População estudada.....	41
5.3. Metodologia.....	42
5.4. Extração do HLA-G e genotipagem.....	43
5.5. Análise estatística .....	44
5.6. Considerações éticas .....	44
<b>6. Resultados .....</b>	<b>45</b>
<b>7. Discussão .....</b>	<b>57</b>
<b>8. Conclusão .....</b>	<b>61</b>
<b>9. Bibliografia.....</b>	<b>62</b>

## Resumo

**Justificativa:** A doença inflamatória intestinal (DII) representada pela retocolite ulcerativa (RCU) e pela Doença de Crohn (DC) caracteriza-se por ser uma doença imunológica sistêmica que apresenta as principais manifestações ao nível do trato gastrointestinal. É uma doença multifatorial onde fatores genéticos interferem na predisposição ao desenvolvimento dos diferentes sintomas presentes nessas patologias. Alguns genes relacionados ao sistema imune já foram indicados como alvos potenciais no desenvolvimento da DII. A molécula de HLA-G é uma delas. Apesar de apresentar distribuição tecido específica e polimorfismo limitado comparado às moléculas de HLA clássicas, pode ser expressa diferencialmente nos processos inflamatórios crônicos, vindo a favorecer respostas do tipo Th2.

**Objetivo:** Analisar o polimorfismo inserção/deleção de 14 bp no éxon 8 da região 3'UTR do gene do HLA-G com a finalidade de verificar se existe associação entre as variantes com a DII.

**Material e métodos:** Foram avaliados 96 pacientes portadores de DII pertencentes ao ambulatório de DII do HSL-PUCRS. Foi extraído DNA genômico desses indivíduos, analisando-se a região 3' UTR referente ao polimorfismo inserção/deleção de 14pb no éxon 8 do HLA-G.

**Delineamento:** Estudo transversal.

**Resultados:** Os 96 pacientes com DII foram subdivididos em dois grupos, aqueles com DC (n = 56) e aqueles com RCU (n = 40). Realizou-se a análise da frequência genotípica em três grupos: os homozigotos para deleção (- 14bp/- 14bp) chamados **Hd**, os homozigotos para inserção (+ 14bp/+ 14bp) denominados **Hi** e os heterozigotos (- 14bp/+ 14bp) chamados **Ht**. O padrão de distribuição do genótipo dos três subgrupos (Hd, Ht, Hi) quando comparado entre os grupos de pacientes com DC, grupo de pacientes com RCU e grupo controle foi diferente (p = 0,013). A frequência de Hi foi significativamente menor nos

pacientes com DC (1,8%) quando comparado ao grupo de pacientes com RCU (20,0%) e ao grupo controle (15,2%) ( $p = 0,014$ ). Na comparação isolada dos grupos para a situação DC vs RCU observou-se um OR = 13,8 (IC95%: 1,6 a 306,6;  $P < 0,01$ ) e na situação DC vs Controle um OR = 9,87 (IC95%: 1,44 a 195,11;  $P < 0,01$ ). Já a frequência Hd, foi maior nos pacientes com DC (50,0%) quando comparado ao grupo de pacientes com RCU (30,0%) e ao grupo controle (36,0%) ( $p = 0,08$ ).

**Conclusão:** Podemos sugerir que a ocorrência do genótipo da inserção (+14bp) do HLA-G que direciona o padrão de resposta imune para um padrão do tipo Th2 é menor nos pacientes com DC, que apresentam um padrão de resposta imune do tipo Th1. Portanto, O genótipo +14pb/+14pb de HLA-G parece estar contribuindo no processo de inflamação DII. No entanto é essencial o aumento do número amostral para confirmação deste achado.

**PALAVRAS-CHAVES:** Doença inflamatória intestinal; Retocolite ulcerativa; Doença de Crohn; HLA-G; polimorfismo 14bp; resposta imunológica; imunogenética.

## **Abstract**

**Rational:** The inflammatory bowel disease (IBD) represented by ulcerative retocolitis and Crohn's disease is characterized for being an immunological systemic illness that presents the main clinical manifestations in gastrointestinal tract. This multifactorial disease is influenced by genetic factors that may predispose the development of the different symptoms of IBD. Some genes related to immune system already had been indicated as potentials in the development of the IBD. The HLA-G molecule is the of them. Although to present specific tecidual distribution and limited polymorphism compared with classic molecules of HLA, it's expression can distinguishing in the chronic inflammatory processes, come to favor to the Th2 type

**Objective:** To analyze the polymorphism insertion/deletion of 14 bp in éxon 8 of the region 3' UTR of the gene of the HLA-G with the purpose to verify if exists association between the IBD variants.

**Material and methods:** 96 carrying patients of the IBD clinic in HSL-PUCRS had been evaluated. DNA genomic of these individuals was extracted, analyzing itself it region 3' referring UTR to the polymorphism insertion/deletion of 14pb in éxon 8 of the HLA-G.

**Delineation:** Transversal.

**Results:** The 96 patients with IBD had been subdivided in two groups, those with DC (n= 56) and those with RCU (n=40). It was become fullfilled analysis of the genotypic frequency in three groups: the homozygous for deletion (- 14bp/- 14bp) called Hd, the homozygous for insertion (+ 14bp/+ 14bp) called Hi and the heterozygous (- 14bp/+ 14bp) called Ht. The standard distribution of the genotype of the three sub-groups (Hd, Ht, Hi) when compared between the patients with DC, with RCU and controls was different ( $p = 0,013$ ). The frequency of Hi genotype, was significantly lesser in the patients with DC (1.8%) when compared with the group of patients with RCU (20.0%) and to the group it has controlled

(15.2%) ( $p = 0,014$ ). In the isolated comparison of the groups for situation DC vs RCU, OR = 13,8 (IC95%: 1,6 the 306,6;  $P < 0,01$ ) and in situation DC vs Control OR = 9,87 (IC95%: 1,44 the 195,11;  $P < 0,01$ ). The Hd frequency, was bigger in the patients with DC (50.0%) when compared with the group of patients with RCU (30.0%) and to the group it has controlled (36.0%) ( $p = 0,08$ ).

**Conclusion:** We can suggest that the occurrence of the genotype of the insertion (+14bp) of the HLA-G that directs the standard of immune response for a Th2 type is lesser in the patients with DC, that present a standard of immune response Th1 type. Therefore, the genotype +14pb/+14pb of HLA-G seems to be contributing in the process of inflammation IBD. However the increase of the patients number for confirmation of this finding is essential.

**Key-words:** inflammatory bowel disease, ulcerative colitis, Crohn's disease; polymorphism HLA-G, immune response, immunogenetics.

## **Lista de figuras**

<b>Figura 1:</b> Ativação e ação dos linfócitos T CD4.....	29
<b>Figura 2:</b> Resposta imune mediada pelos linfócitos Th1 na DII.....	32
<b>Figura 3:</b> HLA-G.....	35
<b>Figura 4:</b> Atividades imunorregulatórias mediadas pelo HLA-G.....	37
<b>Figura 5:</b> Genotipagem do HLA-G em gel de acrilamida.....	50

## **Lista de tabelas**

<b>Tabela 1</b> – Comparação de variáveis demográficas, hábito tabágico e tempo de diagnóstico entre os pacientes com DC e RCU .....	45
<b>Tabela 2</b> – Comparação de variáveis clínicas, manifestações extra-intestinais e complicações entre os pacientes com DC e RCU.....	47
<b>Tabela 3</b> - Comparação de localização da doença na colonoscopia e realização de exames complementares entre os pacientes com DC e RCU.....	49
<b>Tabela 4</b> - Comparação da frequência genotípica no polimorfismo 14bp do HLA-G entre os pacientes com DC, RCU e controles .....	51
<b>Tabela 5</b> – Comparação da frequência alélica no polimorfismo 14bp do HLA-G entre os pacientes com DC, RCU e controles.....	52

## Lista de Abreviaturas

DII: doença inflamatória intestinal

HLA: antígeno leucocitário humano

HLA- G: antígeno leucocitário humano G

Th1: linfócito T auxiliar tipo 1

Th2: linfócito T auxiliar tipo 2

MHC: complexo de histocompatibilidade principal

NK: células *natural-killers*

UTR: região não traduzida

TGI: trato gastrointestinal

RCU: retocolite ulcerativa

DC: Doença de Crohn

AINE: anti-inflamatório não esteróide

NOD: *non obese diabetes*

NFkB: Fator de transcrição nuclear kB

IL: interleucina

TNF: fator de necrose tumoral

MALT: tecido linfóide associado à mucosa

GALT: tecido linfóide associado à mucosa gastrointestinal

LIE: linfócitos intra-epiteliais

GM-CSF: fator estimulador da colônia de granulócitos-macrófagos

APC: célula apresentadora de antígeno

IFN-  $\alpha$ : interferon alfa

TGF  $\beta$ : fator de crescimento tecidual beta

mRNA: ácido ribonucléico mensageiro

PCR: reação em cadeia pela polimerase

VSG: velocidade de hemossedimentação

PCR: proteína C reativa

LINF: linfócitos

HGB: hemoglobina sérica

OR: odds ratio

Hd: homozigoto para deleção

Hi: homozigoto para inserção

Ht: heterozigoto

pb: pares de bases

HSL: Hospital São Lucas

PUCRS: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

ANOVA: análise de variância

## **Lista de apêndices**

**Apêndice 1** - Termo de consentimento livre e esclarecido.

**Apêndice 2** - Ficha dos pacientes do ambulatório de doenças inflamatórias intestinais.

## 1. Introdução

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma doença multifatorial onde fatores genéticos parecem interferir na predisposição ao desenvolvimento de diferentes formas de apresentação clínica da doença. Alguns genes relacionados ao sistema imune já foram indicados como alvos potenciais de terapia nesta doença por possivelmente influenciarem no desenvolvimento da DII.

O sistema que está sendo estudado neste trabalho é o da molécula de HLA-G pertencente ao MHC classe I, que apesar de apresentar distribuição tecido específica e polimorfismo limitado comparado às moléculas de HLA clássicas de classe I, pode ser expressa diferencialmente durante processos de inflamações crônicas. O HLA-G parece desequilibrar o balanço da resposta imune Th1/Th2 vindo a favorecer respostas do tipo Th2.

O HLA-G foi inicialmente descrito na gestação. Sua presença no citotrofoblasto induziria a uma resposta T auxiliares do tipo 2 (Th2), com inibição das células *natural-killers* (NK) e prosseguimento da gestação. A falha deste mecanismo permitiria a ocorrência de uma resposta T auxiliares do tipo 1 (Th1), com ativação das células NK que assim levariam a ocorrência da pré-eclampsia ou até eliminariam o tecido embrionário (aborto).

A atuação do HLA-G como uma molécula imunossupressora com a função potencial de defesa contra a agressão inflamatória e, crucial no equilíbrio

da resposta imune. Na DII já está comprovada a ocorrência de um desequilíbrio na resposta imune do indivíduo. Estudos levantam a possibilidade do HLA-G estar presente no desenvolvimento desta resposta inflamatória exacerbada.

## **2. Justificativa**

As doenças inflamatórias intestinais (DII) representadas pela Doença de Crohn (DC) e pela Retocolite Ulcerativa (RCU) vêm aumentando gradativamente sua prevalência. Seja porque os hábitos e o estilo de vida vêm se alterando nas últimas décadas, seja porque hoje se dispõe de um arsenal diagnóstico melhor e mais adequado. Estima-se que mais de um milhão de americanos sejam portadores de RCU ou DC nos Estados Unidos da América.

Entretanto, mesmo com o avanço nos métodos diagnósticos ainda não foi possível de identificar etiologia destas doenças, o que, obviamente, dificulta o melhor controle e o alcance da cura das mesmas.

Acredita-se que a etiologia das DII seja multifatorial. Estudos realizados apontam para uma provável interação entre a genética, a predisposição individual e o ambiente externo. Esses fatores estariam envolvidos na ocorrência de uma modificação da resposta imune padrão e na formação de uma resposta inflamatória descontrolada e desordenada, como a que ocorre nos pacientes com DII.

Este estudo visa compreender melhor o papel e a influência dos fatores genéticos na resposta inflamatória do indivíduo com DII.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo principal:**

Analisar o polimorfismo inserção/deleção de 14 bp no éxon 8 da região 3'UTR do gene do HLA-G.

#### **3.2. Objetivos secundários:**

3.2.1. Realizar uma análise epidemiológica dos pacientes com DII: com determinação das variantes clínicas, sintomas, manifestações extra-intestinais e achados endoscópicos mais comuns nessas entidades.

3.2.2. Verificar se existe associação entre o polimorfismo no éxon 8 do gene do HLA-G com a DII.

3.2.3. Comparar as freqüências alélicas e genotípicas observadas para o grupo dos pacientes com DII com as freqüências observadas no grupo controle.

3.2.4. Verificar se há uma correlação entre as alterações imunogenéticas e as variadas características clínicas de RCU e DC.

## **4. Revisão bibliográfica**

As doenças inflamatórias intestinais (DII) mais comuns são: a doença de Crohn (DC) e a retocolite ulcerativa (RCU). Estas são afecções sistêmicas inflamatórias crônicas. Suas principais manifestações estão relacionadas ao trato gastrointestinal (TGI) devido às alterações na imunorregulação intestinal.

A RCU foi inicialmente descrita em 1875 pelos Drs Wilks e Moxon<sup>1</sup>. Enquanto que a DC foi descrita meio século após, em 1932, pelos Drs Burril Crohn, Gordon Oppenheimer e Leon Ginzburg<sup>2</sup>.

### **4.1. Epidemiologia**

A prevalência e incidência destas doenças variam de acordo com a região estudada. Hoje em dia essas doenças afetam mais de 1.000.000 de americanos<sup>3</sup>. Na América do Norte, a prevalência varia de 26 a 198 casos por 100.000 habitantes para DC e 37 a 246 casos por 100.000 habitantes para RCU. A incidência é de 3,1 a 14,6 por 100.000 pessoas/ano para DC e 2,2 a 14,3 por 100.000 pessoas/ano para RCU. Na Europa a prevalência varia de 8,3 a 21,4

casos por 100.000 pessoas/ano e a incidência de 0,7 a 9,8 por 100.000 pessoas/ano para DC e 1,5 a 20,3 por 100.000 pessoas/ano para RCU<sup>4</sup> .

No Brasil ainda não existem dados adequados para estudo de prevalência e incidência destas doenças provavelmente, devido à dificuldade de realizar o diagnóstico pela ausência de teste padrão-ouro, pela multiplicidade de sintomas e pelo custo dos exames diagnósticos. Porém estudos demonstram que a incidência das DII parece ser menor em pacientes de países em desenvolvimento, como o Brasil. Esse fato é difícil de ser avaliado devido à dificuldade em realizar-se o diagnóstico adequado e a grande prevalência de diarreias infecciosas e parasitárias. O que já está provado, é que uma vez que o país torne-se industrializado, com modificações, de dieta, do estilo de vida e da exposição ambiental essas doenças tornam-se mais prevalentes<sup>4</sup> .

As DII ocorrem em ambos os sexos embora exista uma discreta predominância do sexo feminino nos pacientes com DC sugerindo talvez a presença de fatores hormonais na expressão da doença. Já na RCU essa predominância parece ser discretamente a favor do sexo masculino<sup>5</sup> .

A distribuição das DII é bimodal, com o primeiro pico entre 15 e 25 anos e o segundo entre 50 e 80 anos. Os pacientes com RCU apresentam uma média de idade de cerca de 10 anos mais velha na época da realização do diagnóstico quando comparada com os pacientes com DC<sup>6</sup> . Na DC o primeiro e maior pico de incidência é quando se realiza a maioria dos diagnósticos. Nos jovens a doença tende a localizar-se mais frequentemente no intestino delgado. No

segundo e menor pico de incidência a doença frequentemente localiza-se no cólon<sup>7</sup>.

Parece haver uma predominância da DII em caucasianos que pode estar relacionada ao estilo de vida, às influências ambientais e genéticas<sup>4,8</sup>.

## **4.2. Fatores de risco**

A DII se desenvolve através da interação entre o ambiente e os fatores genéticos. Alguns fatores ambientais já estão definitivamente associados.

O fumo é o fator ambiental mais estudado na associação de DII e meio ambiente. O tabagismo é fator protetor para RCU, com razão de chances menor que 1<sup>4</sup>. Já na DC o fumo é fator de risco (risco relativo entre 1,33 e 4,99)<sup>9</sup>. Os fumantes têm doença mais severa e com mais recidivas mesmo após a cessação do tabaco<sup>10</sup>.

A realização de apendicectomia é protetora para pacientes com RCU mas quanto a DC ainda não está definida se esta relação é de risco ou de proteção devido ao fator confusional de que muitas vezes o quadro clínico de apresentação da DC é a apendicite<sup>11</sup>.

Existe fraca relação entre o uso de anticoncepcional oral e DII, talvez associada às propriedades trombogênicas da droga e da inflamação crônica<sup>12</sup>.

Acredita-se que a dieta esteja relacionada à DII e possa explicar as diferenças de risco e de incidência das DII em diferentes regiões geográficas porém faltam trabalhos consistentes nesta área<sup>11</sup>.

A amamentação parece ser um fator protetor para o filho em ambas as DII<sup>11</sup>.

A DC e RCU são comuns em países desenvolvidos, áreas urbanas e indivíduos com melhor padrão sócio-econômico, levantando a hipótese de que possa haver associação com higiene e sanitarismo básico, através da alteração da flora intestinal. O uso de anti-inflamatórios não-esteróides (AINEs) parece estar associado ao gatilho da DII<sup>11</sup>.

### **4.3. Aspectos clínicos**

Os pacientes comumente apresentam os seguintes sintomas, em ambos os tipos de DII: dor abdominal, febre, diarréia muco-pio-sanguinolenta, tenesmo, emagrecimento, náuseas e vômitos. Inicialmente deve-se tentar realizar o diagnóstico diferencial entre DII e outras patologias para, posteriormente definir a ocorrência de DC ou de RCU<sup>13</sup>.

O sintoma da diarréia está quase que invariavelmente presente nas queixas dos pacientes. É importante datar o seu início, saber se a diarréia está relacionada com algum outro sintoma ou fato, como por exemplo, dor abdominal,

presença de produtos patológicos nas fezes, febre, emagrecimento, fatores ambientais como viagens ou mudanças, fatores psicossociais e alterações do estilo de vida ou da dieta<sup>14,15</sup>.

A presença de produtos patológicos nas fezes é bastante sugestiva de processo inflamatório intestinal: DII, colites, parasitoses, isquemia, entre outras. O sangue presente nas fezes é muito comum em pacientes com RCU enquanto a presença de muco sugere se tratar de DC<sup>13,14,15</sup>.

A dor abdominal também está presente quase que invariavelmente em todos os pacientes com DII. Algumas características da dor podem apontar para RCU ou DC. Por exemplo, dor em fossa ilíaca direita recorrente e exacerbada pelas refeições pode sugerir DC enquanto dor em quadrante inferior esquerdo do abdome, tipo cólica, associada ao processo defecatório e algumas vezes à ocorrência de tenesmo pode sugerir RCU.

Os sintomas constitucionais estão comumente presentes nos pacientes com DII em atividade: emagrecimento, inapetência, febre, prostração, anemia.

Por se tratar de uma doença com componente auto-imune, estes pacientes também podem apresentar as chamadas manifestações extra-intestinais. Essas manifestações são sintomas e sinais em órgãos fora do tubo digestivo, porém com a mesma fisiopatologia.

Os sintomas extra-intestinais mais comuns são dermatológicos (eritema nodoso, pioderma gangrenoso), oculares (irite, uveíte, episclerite), osteoarticulares (poli ou mono artrites, espondilite anquilosante, sacroileíte, osteoporose), colangio-hepáticos (hepatite auto-imune, colangite esclerosante), hematológicos (anemia, trombozes arterial e venosa) e pulmonares (asma e hiperreatividade brônquica) <sup>13,14,15,16</sup>.

#### **4.3.1. Doença de Crohn (DC)**

A DC é caracterizada pela presença de um processo inflamatório transmural e intermitente ao longo de todo o tubo digestivo, isto é, da boca ao ânus. Ela acomete preferencialmente o íleo terminal. Cerca de 50% dos pacientes têm doença em íleo e ceco; 30-35% dos pacientes apresentam doença apenas em delgado e 20-25% apresentam apenas doença colônica <sup>14</sup>.

O quadro clínico é variado dependendo da duração, localização, extensão, atividade da doença e presença de complicações <sup>17</sup>.

Os pacientes apresentam mais frequentemente dor abdominal, que pode ser tipo cólica, intermitente, com períodos de maior intensidade intercalados com períodos de acalmia. Alguns quadros de DC apresentam-se sob a forma de suboclusão intestinal com dor abdominal, massa palpável e vômitos devido à fibrose estenosante que se desenvolve subclínicamente. Pacientes com DC ileocolônica têm maior risco de formação de fístula e massa palpável em fossa ilíaca direita podendo simular apendicite aguda. As complicações mais

freqüentes dos pacientes com DC são a suboclusão e oclusão intestinais podendo necessitar de tratamento cirúrgico em grande parte dos casos<sup>14</sup> .

Pacientes com componentes inflamatórios ativos apresentam além da dor abdominal, diarréia geralmente de moderada intensidade, com muco e algumas vezes sangue e pus, anorexia, emagrecimento e conseqüentemente desnutrição. A severidade da diarréia tende a correlacionar-se com a extensão e a severidade da inflamação transmural do intestino. Manifestações sistêmicas como fadiga, febre, anorexia e emagrecimento, são encontradas na maioria dos pacientes<sup>14,16</sup>.

Endoscopicamente a característica marcante da DC é o acometimento transmural que pode afetar todas as camadas, da mucosa à serosa e, que apresenta um caráter descontínuo das lesões (áreas de mucosa preservada em meio às de atividade inflamatória). A primeira anormalidade é o aumento dos folículos linfóides com anel eritematoso em volta. Isto leva a úlcera aftóide que progride para ulceração profunda, fissura, fibrose, estenose e fistulização. Os achados endoscópicos são variáveis desde discretas erosões, edema, friabilidade, enantema, sendo mais característico a presença de úlceras, que podem ser aftóides, elípticas ou lineares, intercaladas por mucosa normal, assim como lesões fibroestenósantes e fistulizantes<sup>18</sup> .

A natureza inflamatória transmural da DC favorece a ocorrência de fístulas. A fístula significa que a inflamação transmural penetrou nos órgãos adjacentes, tecidos ou pele. A ativação do sistema imune leva à liberação de proteases e metaloproteinases que contribuem para a destruição dos tecidos,

formação do trajeto fistuloso e penetração nos tecidos adjacentes<sup>13</sup>. Cerca de um terço dos pacientes com doença colônica apresentam manifestações perianais, como fístulas e abscessos. Geralmente inicia-se concomitantemente com os sintomas luminiais ou mais raramente pode preceder estes sintomas em até quatro anos em média <sup>19</sup>.

#### **4.3.2. Retocolite Ulcerativa (RCU)**

A RCU é caracterizada pelo acometimento contínuo do tubo digestivo por um processo inflamatório restrito à mucosa colônica. Ela acomete o reto e extensões proximais variáveis do cólon<sup>13,15,16</sup>.

Os pacientes apresentam mais frequentemente diarréia de intensidade moderada à severa, na maioria das vezes acompanhada de sangue vivo, separado ou junto às fezes associados à urgência evacuatória e tenesmo. A presença de diarréia noturna e de incontinência fecal pode ocorrer em casos severos. Os pacientes com RCU apresentam menos frequentemente muco nas fezes. A severidade da diarréia tende a correlacionar-se com a extensão e a severidade da inflamação colônica.<sup>15,16,20</sup>

Manifestações sistêmicas como fadiga, febre, anorexia e emagrecimento, são encontradas na maioria dos pacientes. A dor abdominal é de intensidade leve a moderada nesses pacientes e, torna-se severa apenas em casos de complicação da RCU, como no megacólon tóxico <sup>15,16,20</sup>.

Quando comparados com a população em geral, os pacientes com RCU apresentam um maior risco de adenocarcinoma de cólon, após 8-10 da realização do diagnóstico da doença<sup>21</sup> .

Endoscopicamente a característica marcante da RCU é a presença de processo inflamatório contínuo do cólon limitado à mucosa, que acomete o reto e extensões proximais variáveis. Habitualmente as alterações endoscópicas ocorrem conforme a severidade da doença, desde fina nodularidade da mucosa, edema, hiperemia, friabilidade, perda do padrão vascular até erosões ou úlceras recobertas por fibrina<sup>18</sup> .

Cerca de 40 a 50% dos pacientes possuem doença restrita até o cólon sigmóide, isto é, uma colite distal, processo inflamatório no reto e cólon sigmóide, até 30 cm da linha pectínea. Seguida pelo acometimento até a flexura esplênica em 30 a 40% (colite esquerda, quando a inflamação atinge o cólon, do reto ao ângulo esplênico) e em apenas 20% dos casos, a RCU acomete todo o cólon (pancolite). Alguns pacientes apresentam proctite, doença restrita ao reto, ou seja, com inflamação até 15 cm da linha pectínea<sup>18</sup> .

#### **4.4. Etiologia**

Quanto à etiologia exata destas doenças, até o momento não existe definição. Já se sabe que o fator genético está fortemente presente na DII e interage com os fatores ambientais na manifestação desta, caracterizando a DII

como uma herança multifatorial, onde o somatório dos fatores genéticos e ambientais pode levar a uma predisposição diferencial à doença.

O risco de desenvolvimento de DC em um familiar de primeiro grau de um paciente com DC é de 5-8% enquanto o risco de desenvolvimento de RCU em familiar de primeiro grau de um paciente com RCU é de 2-5%<sup>16</sup>. O risco relativo de DC em familiares de primeiro grau é de 4 a 15 em comparação com a população em geral. Um em cada cinco pacientes com DC tem um familiar também com DC<sup>22</sup>. Foi identificado um *locus* no cromossomo 16 ligado ao desenvolvimento de DC seguido da identificação do gene NOD32 neste local<sup>23</sup>. O gene NOD32 parece alterar a resposta imune inata às bactérias, ativando o NFκB<sup>24</sup>.

Vale ressaltar que nessas doenças auto-imunes os fatores ambientais, genéticos, sócio-econômicos e a microbiota intestinal estão envolvidos para desencadear uma cascata de reação inflamatória. O gatilho inicial pode ser um quadro viral ou bacteriano, ou até mesmo a própria flora bacteriana intestinal, no indivíduo geneticamente susceptível, desregulando o equilíbrio entre os antígenos luminais e a resposta imune da mucosa intestinal e assim, ampliando e perpetuando a reação de inflamação<sup>25</sup>.

Sabe-se que o sistema imune é um dos principais fatores determinantes da fisiopatologia da DII e que as citocinas, mediadores solúveis do sistema imune, estão envolvidas na morbidade da DII. Diversos trabalhos têm tentado associar a diversidade da flora intestinal dos pacientes e sua propensão ao

desenvolvimento de DII, ao passo que outros se dispõem mais precisamente a caracterizar a existência de uma resposta imune específica direcionada a esta microbiota intestinal.

A DII representaria uma resposta imune alterada em um indivíduo geneticamente suscetível aos estímulos inócuos do ambiente, portanto, uma doença do sistema imune regulatório. Na DII haveria uma falha do controle da resposta inflamatória crônica fisiológica, isto é, no *down-regulation* basal da inflamação da mucosa.

Um fator importante no desenvolvimento da DII parece ser o padrão preferencial de resposta imunológica do indivíduo. Análises da mucosa intestinal em indivíduos portadores de RCU e DC têm demonstrado um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-1 (IL-1), a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), o que sugere um direcionamento do sistema imune do indivíduo polarizado para um padrão de resposta de linfócitos Th1. Associa-se a este fato, um outro fator possivelmente contribuinte: uma resposta imune desregulada e excessiva na mucosa intestinal contra os microorganismos entéricos<sup>26</sup>.

#### **4.5. Fisiopatologia: regulação do sistema imune e mediadores inflamatórios**

A mucosa que recobre o TGI constitui a maior interface do organismo com o meio externo. A defesa da mucosa gastrointestinal depende a ação conjunta de fatores imunológicos e não-imunológicos. A proteção não-imunológica é constituída por vários fatores como, ácido clorídrico gástrico, enzimas pancreáticas, sais biliares, muco intestinal, regeneração epitelial contínua, motilidade, lactoferrina, lisozimas, peroxidases e defensinas (proteínas com a atividade antibacteriana). A própria flora intestinal residente é um fator de defesa: competição por sítios de ligação e produção de substâncias com ação antimicrobiana. A proteção imunológica, como a defesa mais específica e organizada, como o tecido linfóide associado à mucosa (MALT – *mucosal associated lymphoid tissue*) que no trato gastrointestinal recebe o nome de GALT (*gut associated lymphoid tissue*)<sup>27</sup>.

A interação permanente com diversos estímulos antigênicos exige uma constante resposta imune da mucosa local com inflamação crônica fisiológica. Esta é a principal diferença entre a imunidade sistêmica e a imunidade mucosa. O desafio do sistema imunológico da mucosa intestinal é diferenciar o estímulo patogênico do não patogênico, desencadeando uma reação de defesa com a indução de resposta imune ou a tolerância, respectivamente<sup>27,28</sup>.

Seu estado de inflamação crônica suprimida pode ser identificado através de três fenômenos: a tolerância oral, a inflamação crônica controlada e a

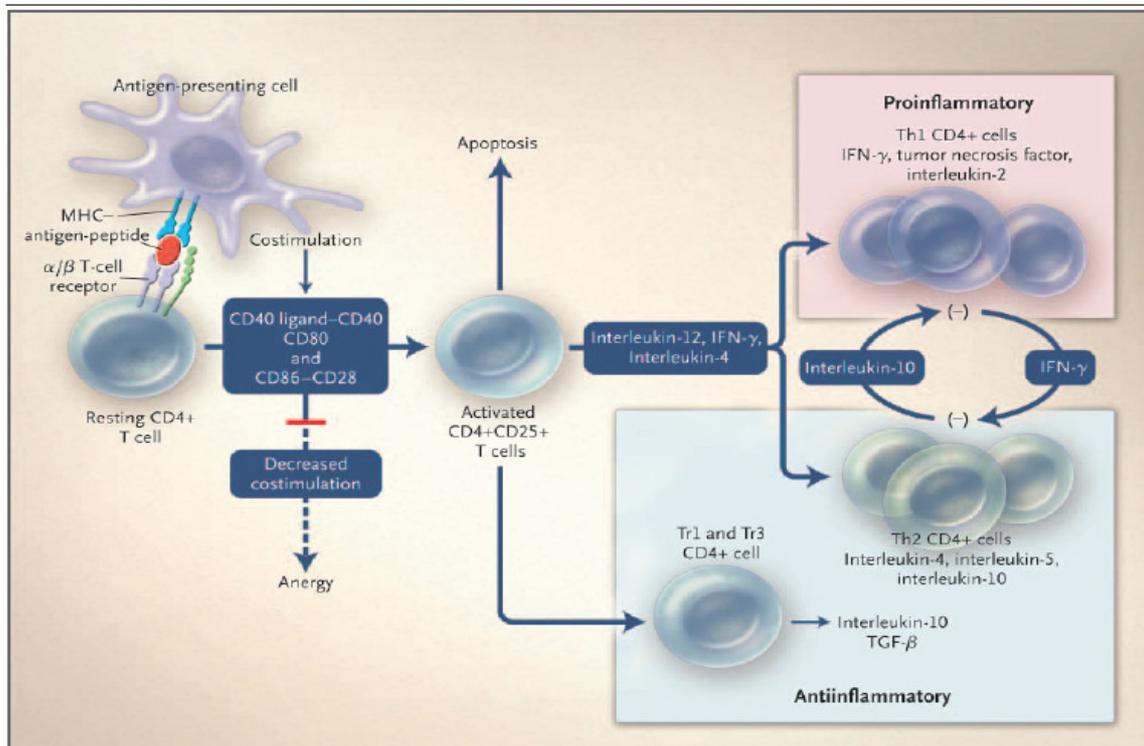
secreção de IgA. O desequilíbrio ou a quebra deste sistema homeostático pode levar a ocorrência de inflamação descontrolada da mucosa representada pela doença inflamatória intestinal<sup>29</sup>.

Os linfócitos intra-epiteliais (LIE) são a interface física e imunológica das bactérias da flora que colonizam e atravessam o lúmen intestinal mediando atividades citotóxicas (ao contrário dos linfócitos da lâmina própria). São predominantemente linfócitos T (85-95%) e cerca de 90% desses expressam o fenótipo DC8. São capazes de expressar citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , fator estimulador da colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e IL-1  $\alpha$  e  $\beta$  levando ao recrutamento e ativação de leucócitos e macrófagos<sup>27,29</sup>.

O evento central tanto para produção da resposta humoral como para a resposta celular depende da ativação e expansão clonal dos linfócitos T auxiliares (Th). Por outro lado, dependendo da forma como o antígeno é apresentado ao linfócito Th e na ausência de moléculas co-estimulatórias, os linfócitos T podem se tornar anérgicos, determinando um estado de tolerância<sup>29</sup>.

A ativação dos linfócitos Th é desencadeada pela interação entre o complexo do receptor de linfócito T e molécula CD3 (TCR-CD3) com um antígeno peptídico ligado a uma molécula do MHC de classe II na superfície de uma célula apresentadora de antígeno (APC). Os linfócitos Th ativados (CD4+) produzem citocinas que levam à ativação de outras células efetoras, que podem atuar diretamente ou produzir citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que junto

com a expressão das moléculas de adesão, controlam os processos de ativação e migração para os sítios inflamatórios<sup>27,28,29</sup>.



**Figura 1:** Ativação e ação dos linfócitos T CD4<sup>26</sup>.

A resposta imune do tipo Th1 compreende a produção aumentada de IFN- $\gamma$  e IL-2, que ativam predominantemente os linfócitos T citotóxicos e macrófagos, e representam a imunidade celular. Os macrófagos ativados produzem citocinas pró-inflamatórias como IL-1 e TNF- $\alpha$ , que favorecem a ocorrência da reação de hipersensibilidade tardia e também produzem IL-12 que estimula os linfócitos Th1 (mecanismo de *feedback* positivo). A DC pode ser considerada uma doença inflamatória crônica mediada por Th1 pois é caracterizada pela formação de granulomas na mucosa (achado histológico característico da resposta imune

Th1) e pelo aumento da expressão do IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-18, duas citocinas produzidas pelas células APC<sup>27</sup>.

A resposta imune do tipo Th2 promove o aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-6 que favorecem a imunidade humoral, estimulando a proliferação e diferenciação de linfócitos B e a consequente produção de anticorpos. Além disso, a resposta do tipo Th2 é capaz de inibir paralelamente a resposta Th1, através do aumento da produção de IL-10 e IL-13, mecanismo de *feedback* negativo sobre linfócitos Th1 e macrófagos<sup>27</sup>. A RCU é caracterizada basicamente por ser uma resposta imune do tipo Th2, com a produção de IL-5 e TGF- $\beta$ .

As células T reconhecem os antígenos após estes serem processados e apresentados por outras células do sistema imune. Esta função é desempenhada pelas APC, que na imunidade intestinal são representadas basicamente pelos macrófagos e pelas células dendríticas. As células APC induzem a resposta celular do tipo Th1 através da produção de citocinas IL-12 e IL-18 e podem atuar na regulação da resposta imune através da produção de IL-10 e TGF  $\beta$ <sup>27,28,29</sup>.

As células APC mais potentes são as células dendríticas localizadas nas placas de Peyer e os linfonodos. Estas células também possuem uma capacidade peculiar: são capazes de transportar fragmentos apoptóticos de linfonodos para as células T, atuando no mecanismo de tolerância das células T aos auto-antígenos dos linfócitos intra-epiteliais<sup>28,29</sup>.

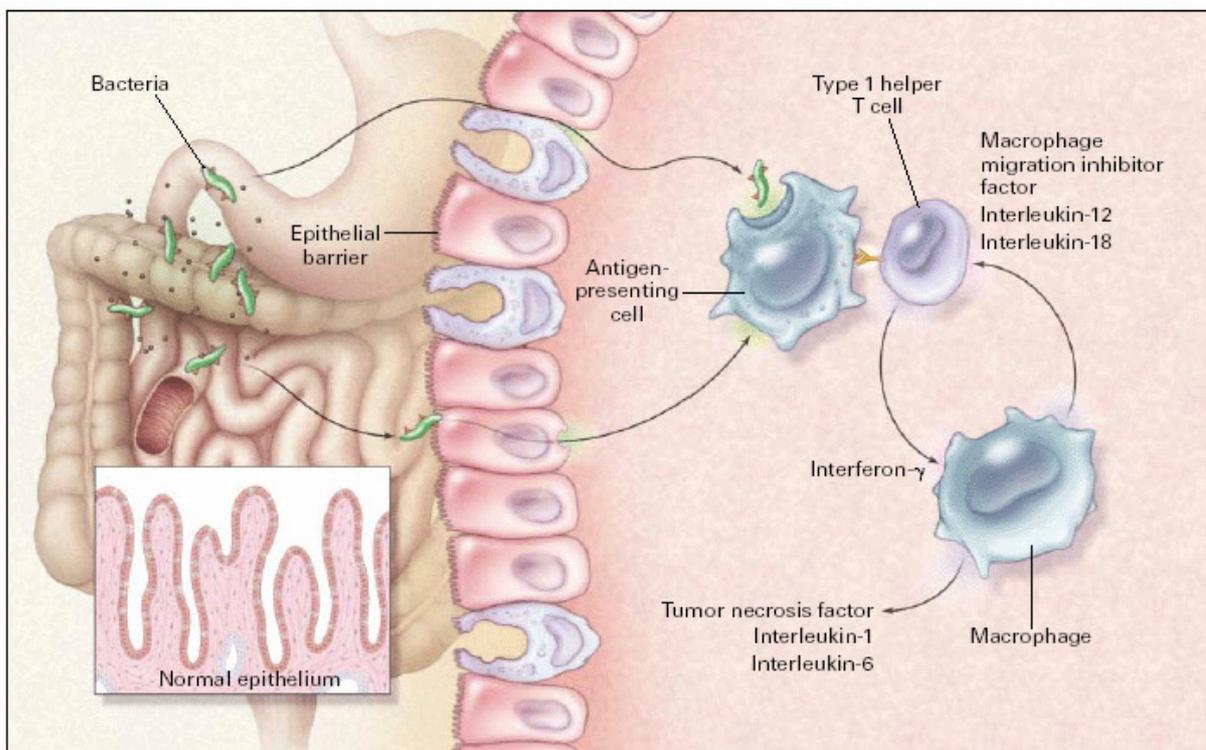
A inflamação intestinal na DII é caracterizada pela ativação das células T e pela entrada de células inflamatórias na mucosa, parte mediada pelo aumento da liberação local de citocinas inflamatórias e parte pelo aumento da expressão de quimiorreceptores. As citocinas pró-inflamatórias são produzidas pelos macrófagos e linfócitos T <sup>26</sup>.

A concentração de citocinas pró-inflamatórias está elevada na lâmina própria da mucosa intestinal de pacientes com DII em atividade. Existe a produção espontânea de TNF- $\alpha$  por células mononucleares da lâmina própria da mucosa intestinal de pacientes com DII ativa em comparação com a mucosa normal. Outros estudos demonstram a participação da IL-6 secretada pelas células epiteliais intestinais como modulador inflamatório, promovendo a diferenciação das células B, como co-fator na estimulação das células T e como indutor da liberação hepática de proteínas de fase aguda. A IL-8 secretada pelos macrófagos, polimorfonucleares e células epiteliais da lamina própria é um importante mediador inflamatório na quimiotaxia fagocitária, especialmente para os polimorfonucleares. A IL-8 é encontrada em altos níveis nos segmentos intestinais inflamados dos pacientes com DII especialmente naqueles com RCU. Existe uma elevação dos níveis de IFN- $\gamma$ , com maior produção de linfócitos CD8 mediada por células epiteliais intestinais em pacientes com DII em atividade <sup>30,31</sup>.

Vários estudos encontraram altos níveis do antagonista do receptor da IL-1 (IL-1ra) no plasma e nos tecidos de pacientes com doenças inflamatórias sistêmicas como artrite reumatóide e DII indicando que este pode fazer parte de

um mecanismo homeostático com objetivo de reduzir a cascata da resposta inflamatória sistêmica. Alguns estudos mostraram que a relação IL-1ra/IL-1 diminui com o aumento da atividade da DII<sup>30,31,32,33</sup>.

Portanto, a resposta imune da mucosa dos pacientes com DC é basicamente realizada por linfócitos T CD4+ com fenótipo Th1, caracterizados pela produção de IFN- $\gamma$  e IL-2 (Figura 1). A ativação da resposta Th1 é ainda aumentada pela redução da expressão de linfócitos T supressores/reguladores (Th3) que produzem citocinas *down*-reguladoras como IL-10 e TGF- $\beta$ . Já a resposta imune em pacientes com RCU é realizada por linfócitos T CD4+ com fenótipo Th2 caracterizado pela produção de TGF- $\beta$  e IL-5<sup>26,32,33</sup>.



**Figura 2:** Representação esquemática da resposta imune mediada pelos linfócitos Th1 na DII<sup>26</sup>.

#### 4.6. Caracterização imunogenética do HLA-G

Atualmente muitos estudos buscam a identificação dos genes envolvidos no desenvolvimento da DC e da RCU. Na literatura, as comparações das freqüências alélicas de genes candidatos entre indivíduos que manifestam a doença e grupos de controle saudáveis têm sido intensamente descritas.

A caracterização imunogenética dos indivíduos portadores de DII pode ser realizada através da análise de variantes polimórficas de genes já descritos como associados com DII e sistema imune.

O complexo de histocompatibilidade principal (MHC) também conhecido como antígeno leucocitário humano (HLA), é uma molécula que se encontra na superfície de praticamente todas as células do organismo, sendo responsável pela exibição de peptídeos exógenos e endógenos aos linfócitos T auxiliares e T citotóxicos, respectivamente <sup>34</sup>.

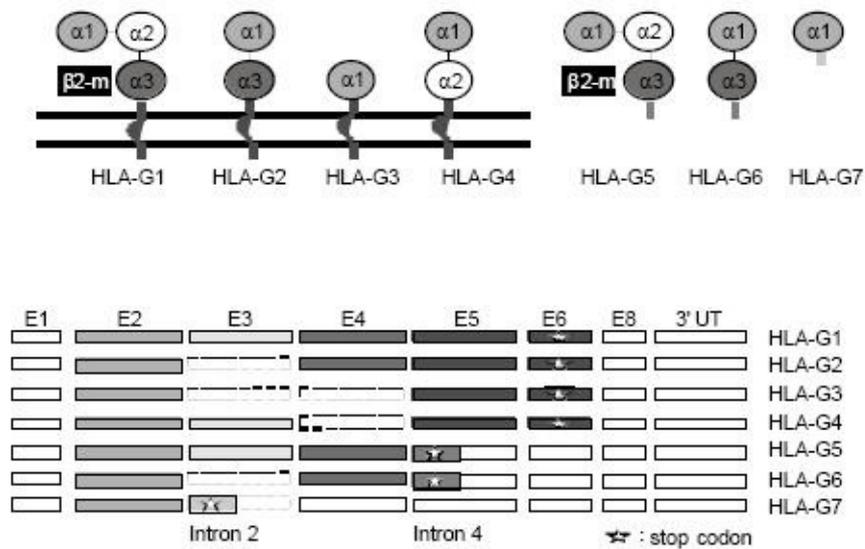
O MHC representa um conjunto de genes localizados no braço curto do cromossomo 6 e atua na resposta adaptativa do sistema imune, uma vez que anticorpos (células B mediados) e linfócitos T que mediam as respostas imunológicas são estimulados pelos genes do MHC <sup>34</sup>.

As moléculas do HLA são divididas em classe I e classe II. A classe II é representada basicamente pelas APC, que são os macrófagos, as células

dendríticas e as células B, que têm a função de apresentar peptídeos extracelulares aos receptores de células T nas células T auxiliares CD4+. O HLA de classe I é representado por quase todos os tipo celulares e têm a função de apresentar peptídeos intracelulares às células T citotóxicas CD8+. Em humanos o HLA de classe I é subdividido em dois grupos: grupo Ia, grupo clássico, composto pelo HLA-A, HLA-B e HLA-C, com alto polimorfismo e, grupo Ib, o não clássico, com baixo polimorfismo, cujos HLA-E, HLA-F e HLA-G são os representantes <sup>35</sup>.

O HLA- G (antígeno leucocitário humano G) é uma molécula não clássica do MHC classe I, caracterizada pelo baixo polimorfismo ao nível do DNA, distribuição tecidual limitada em estados não patológicos, sob isoformas solúveis e ligadas à membrana <sup>36</sup>.

O HLA-G é uma molécula de classe Ib constituída por três domínios alfa não covalentes associados a uma cadeia de  $\beta_2$ microglobulina. Apresenta baixo polimorfismo da e pouca expressão em condições saudáveis. Possui apenas 36 alelos que codificam 14 proteínas diferentes que formam as 3 cadeias alfa e, portanto, um baixo índice de polimorfismo <sup>37</sup>. Apresenta as seguintes isoformas: ligadas à membrana celular ou sob forma solúvel. O HLA-G é composto por 8 éxons, 7 íntrons e a região 3' transcrita e não traduzida (3' UTR').



**Figura 3:** HLA-G<sup>37</sup>.

O HLA-G foi inicialmente descrito na gestação e identificado no citotrofoblasto. Durante a gestação, o sistema imune materno esta em contato direto com as células e tecidos do feto semialogênico, sugerindo a ocorrência de mecanismos moduladores e moderadores específicos no sistema imune materno que impedem a rejeição do feto.

As células NK encontradas na decídua materna, reconhecem moléculas do HLA-G presentes na superfície do trofoblasto derivado do embrião determinando uma resposta Th2. A falha nesse reconhecimento gera uma resposta Th1, com ativação das células NK, que eliminam o tecido embrionário.

Estudos recentes demonstraram que durante a gestação normal ocorre uma elevação do número de receptores inibidores nas células NK decíduais que reconhecem as moléculas do HLA-G fetal, prevenindo a ativação de tais células.

Assim, o reconhecimento das moléculas HLA-G pelas células NK promove uma resposta imune favorável ao sucesso. Portanto, uma gestação de sucesso é chamada de um 'fenômeno Th2' enquanto algumas complicações gestacionais como a pré-eclampsia é chamada de 'fenômeno Th1' por ser uma resposta Th1. Para proteger o feto do sistema imune materno (função de indução de imunotolerância) evitando a lise celular mediada pela célula T, o citotrofoblasto expressa o HLA-G que inibe a ativação das células T citotóxicas e células NK maternas <sup>37,38</sup>.

Assim, na gestação o HLA-G atuaria como uma molécula imunossupressora. O HLA-G também parece proteger tumores alogênicos ou de classe I negativos da imunidade anti-tumoral mediada pelas células NK, inibir as respostas proliferativas das células T DC4+ e a proliferação das células T e células NK, assim como, inibir a maturação das células APC <sup>39</sup>.

Além da ação inibitória direta, o HLA-G também exerce efeitos de imunotolerância a longo prazo através da geração de células supressoras. Sob condições fisiológicas células T regulatórias estão em circulação no sangue periférico. Essas células podem ser células CD4+ ou CD8+ e expressarem HLA-G em sua superfície. As células T HLA-G positivas são hiporresponsivas e inibem a proliferação autóloga de células T. O mecanismo pelo qual isso acontece ainda permanece desconhecido <sup>40</sup>.

As células que não transcrevem o HLA-G podem se tornar HLA-G positivas mesmo que temporariamente. O mecanismo pelo qual isso ocorre chama-se

trogocitose. A trogocitose é a troca de pedaços de membrana através do contacto direto entre células <sup>41</sup>.

A função mais importante do HLA-G consiste da supressão de alguns processos imunológicos promovendo efeitos inibitórios na citólise das células NK, na resposta proliferativa das células T e na maturação das células dendríticas. Esse efeito inibidor do HLA-G é mediado por sua ligação com receptores inibidores como IL-2 e IL-4 na superfície das células imunocompetentes <sup>37</sup> (Figura 2).

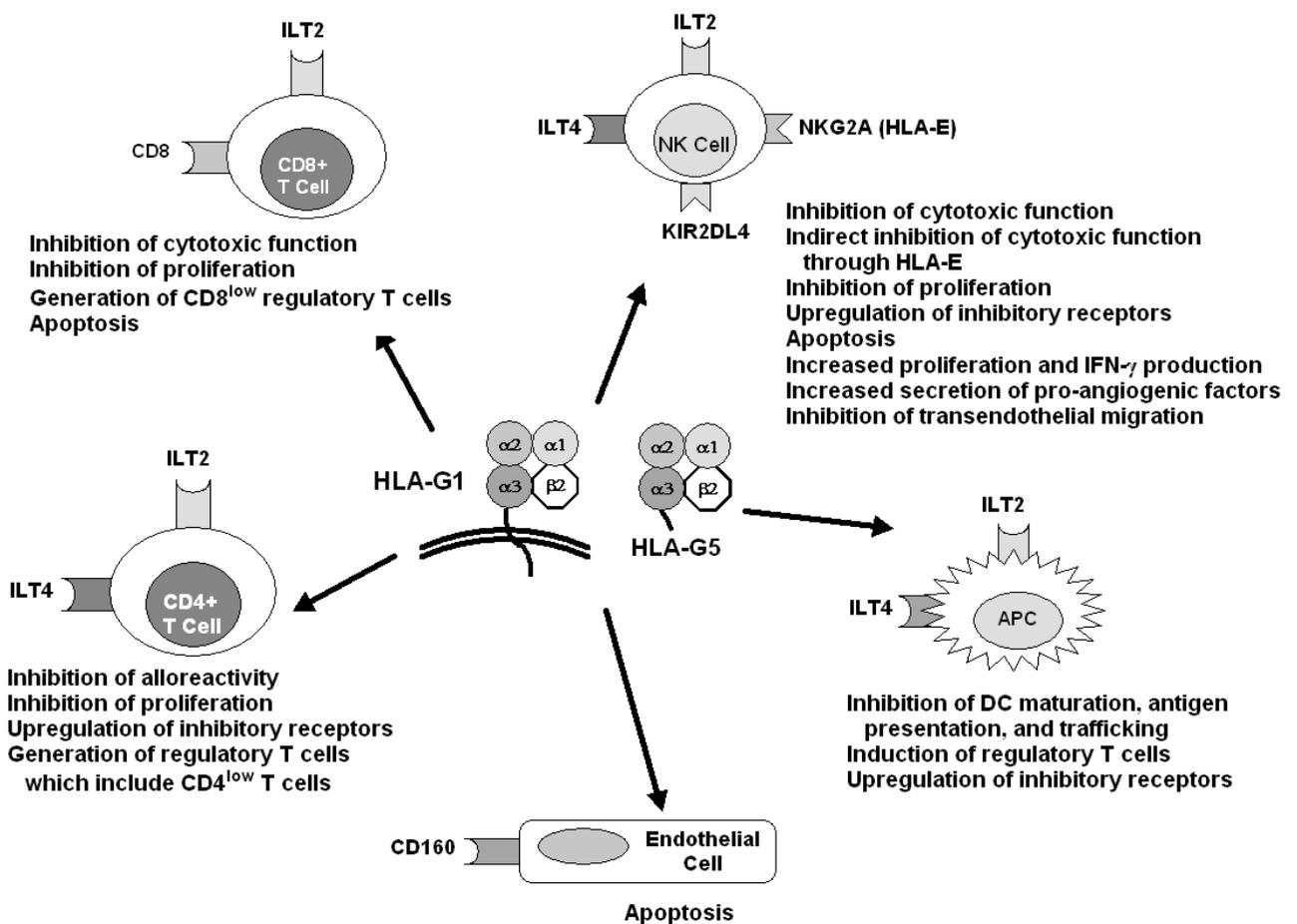


Figura 4: Atividades imunorregulatórias mediadas pelo HLA-G <sup>54</sup>.

A mucosa inflamada de pacientes com RCU apresenta altos níveis de expressão do HLA-G nas células epiteliais intestinais (CEI). As CEI além terem a função de absorção e transporte de nutrientes, exercem um importante papel na imunidade inata e adaptativa. Na RCU, a expressão do HLA-G no ápice da superfície das CEI pode ser essencial para a tolerância para antígenos alimentares e para microflora intestinal. Porém essa expressão parece não ser suficiente para proteger o intestino da inflamação induzida por antígenos. Uma vez que a agressão cesse, o HLA-G participa da supressão da atividade pró-inflamatória das citocinas e do retorno da resposta imune ao estado basal. Como o HLA-G age suprimindo a lise das células NK, mecanismos de inibição da célula NK podem estar presentes na RCU. Portanto, a expressão do HLA-G pode proteger as CEI da lise mediada pelas células NK<sup>42</sup>.

A IL-10 é uma citocina regulatória crucial no equilíbrio do sistema imune da mucosa, atuando na tolerância aos componentes da flora intestinal e na prevenção da resposta inflamatória aguda. Na sua ausência, os antígenos luminiais estimulam a resposta Th1 que ativa a inflamação. Alterações do microambiente reduzem a presença de IL-10 na mucosa inflamada de pacientes com DC. Pacientes com RCU expressam IL-10, assim como HLA-G sugerindo que a IL-10 poderia elevar a expressão do HLA-G na doença inflamatória<sup>43</sup>.

Apesar dos esforços o mecanismo que regula a expressão do HLA-G ainda não foi esclarecido. Já foi demonstrado que alguns fatores influenciam na expressão do HLA-G: IL-10, IFN, glicocorticóides e progesterona parecem estimular a expressão do HLA-G<sup>44</sup>.

A região não traduzida 3' (3'UTR) exerce um papel na expressão do HLA-G através de mecanismos reguladores pós-transcricionais. O polimorfismo inserção/deleção 14bp localizado na posição 3741 do éxon 8 age na estabilização do RNA do HLA-G. A transcrição com a inserção da 14bp permite a remoção de 92 bases da região durante o processamento, tornando o RNAm (ácido ribonucléico mensageiro) mais estável e completo. A deleção influencia a estabilidade do RNAm do HLA-G transcrito pois impede a perda das 92 bases do RNAm tornando-o mais instável <sup>45,46</sup>.

Assim, o polimorfismo da deleção/inserção do 14bp influencia a estabilidade do RNAm do HLA-G do trofoblasto, isto é, o alelo +14bp está associado a baixos níveis de HLA-G que por sua vez está implicado no surgimento da pré-eclâmpsia e dos abortos recorrentes <sup>37</sup>.

Na literatura já existe descrição de associação do HLA-G com esclerose múltipla, doença celíaca, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, asma, doença de Behçet, sarcoidose, pênfigo vulgar e miocardiopatia dilatada idiopática, transplantes, tumores celulares, estados inflamatórios e infecções virais <sup>45,47</sup>.

Recentemente passou-se a estudar o papel do HLA-G nas doenças inflamatórias. Baseado em estudos iniciais levantou-se a possibilidade do HLA-G transformar a resposta celular Th1 basicamente em resposta Th2, onde o HLA-G agiria como uma molécula protetora nas respostas inflamatórias teciduais.

Recentes estudos detectaram a expressão do HLA-G em pacientes com RCU mas não em pacientes com DC. Foi encontrada uma associação entre a deleção do alelo 14bp em pacientes com RCU e em pacientes com DC submetidos a ressecções cirúrgicas<sup>47,48</sup>. Glas e colaboradores avaliaram a ocorrência do polimorfismo da deleção/inserção de 14bp no HLA-G em pacientes com DII e encontraram uma menor frequência de homozigotos para a deleção 14bp em pacientes com RCU quando comparados aos pacientes com DC<sup>48</sup>.

Considerando o envolvimento de fatores genéticos ainda não exatamente identificados e, a importância do sistema imune na susceptibilidade à DII, este estudo a análise do polimorfismo do 14bp no HLA-G, agregando uma nova forma de diferenciação entre as doenças inflamatórias intestinais.

## **5. Pacientes e Métodos**

### **5.1. Delineamento**

Estudo transversal.

### **5.2. População estudada**

A população deste estudo é composta por pacientes atendidos no ambulatório de doenças inflamatórias intestinais (DII) do Hospital São Lucas da PUCRS, coordenado pela Dra. Marta Machado. O número total de pacientes que mantêm acompanhamento em intervalos regulares é de aproximadamente 200.

Todos os pacientes receberam o diagnóstico de DII, sendo subdivididos em Retocolite ulcerativa (RCU) e Doença de Crohn (DC) baseado em critérios clínicos, laboratoriais, endoscópicos, radiológicos e/ou histológicos. Cada paciente cadastrado no ambulatório possui um arquivo numeral onde são anotadas as consultas no ambulatório, os resultados de exames, as medicações em uso, as intercorrências clínico-cirúrgicas e as condutas médicas.

Pacientes que não apresentavam o diagnóstico de DII confirmado através dos critérios acima descritos foram excluídos do estudo.

Os pacientes do ambulatório de DII foram convidados a participar do estudo. E, aqueles que aceitaram, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

As amostras de sangue da população estudada foram coletadas durante a consulta de rotina realizada no ambulatório de DII do HSL-PUCRS, após a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Atualmente, estas amostras fazem parte de um Banco de DNA genômico armazenado no Laboratório de Imunogenética da UFRGS.

A amostra deste estudo compreende um total de 96 pacientes, ou seja, aqueles que aceitaram participar e assinaram o termo de consentimento informado.

Os pacientes que compuseram o grupo controle foram extraídos de uma amostra de doadores de sangue, saudáveis, de Porto Alegre e totalizaram 460 indivíduos.

### **5.3. Obtenção dos dados clínicos**

Todos os pacientes que aceitaram realizar o estudo apresentaram seus prontuários médicos revisados para a coleta de dados epidemiológicos, sintomatologia, de escores de gravidade na RCU e de padrão de comportamento clínico na DC, de complicações clínicas, de realização de exames endoscópicos

e radiológicos e seus resultados, de manifestações extra-intestinais, da ocorrência de cirurgia durante a evolução da doença. No dia da coleta da amostra de sangue foram obtidos os últimos resultados de exames laboratoriais trazidos pelo paciente na consulta (hemograma, PCR, VSG).

#### **5.4. Extração do HLA-G e genotipagem**

As amostras de sangue para a extração do DNA foram coletadas no dia das consultas no ambulatório de DII através da coleta de sangue periférico. O DNA foi isolado de células do sangue periférico de acordo com o protocolo descrito por Lahiri & Nurnberger<sup>49</sup>. O DNA foi armazenado a -20°C.

A genotipagem do gene *HLA-G* foi realizada através da técnica de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos<sup>50,51,52,53</sup>. A reação de PCR para cada amostra foi preparada para um volume final de 25 µL nas seguintes condições: 1 µL de DNA (0,2-0,5 µg), 2,5 µL de tampão de PCR 10X [200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl], 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 2 µL de dNTPs 5 mM, 1 µL de oligonucleotídeos iniciadores na concentração de 10 pmol para cada e 0,2 µL de Taq DNA polimerase 5U/µL. O programa de amplificação utilizado consistiu de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação, 64°C por 1 minuto para anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores e 72°C por 2 minutos para extensão, precedidos de um ciclo de desnaturação inicial por 2 minutos a 94 °C e seguidos de um ciclo de extensão final por 10 minutos a 72 °C.

A PCR com esses iniciadores produz fragmentos de 224 bp para homocigotos para a inserção (+14bp) e de 210bp para homocigotos para a deleção (-14bp). As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6% sendo coradas com brometo de etídeo para visualização sob luz ultravioleta.

### **5.5. Análise estatística**

As freqüências alélicas de ambos os genes foram determinadas por contagem. Para determinar se as amostras populacionais estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi usado o teste de qui-quadrado.

As freqüências alélicas e genotípicas do HLA- G foram comparadas entre o grupos de pacientes com DC e com RCU e os controles através do teste de qui-quadrado com correção de Yates, teste t de student e do teste exato de Fisher.

Na avaliação das médias e DP dos exames e sua comparação entre os grupos com DC e com RCU foram usados os testes ANOVA e Kruskal-Walls.

### **5.6. Considerações éticas**

O estudo para a caracterização imunogenética dos pacientes com DII foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS no dia 22 de agosto de 2005. Este braço do estudo para a avaliação do polimorfismo do HLA-G na DII foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS em 01 de dezembro de 2008 em ofício 1365/08.

## 6. Resultados

Foram incluídos 96 pacientes com diagnóstico de DII no estudo. Esses pacientes foram subdivididos em dois grupos, aqueles com DC e aqueles com RCU. O grupo dos pacientes com DC totalizou 56 pacientes e o grupo com RCU compreendeu 40 pacientes (Tabela 1).

**Tabela 1** – Comparação de variáveis demográficas, hábito tabágico e tempo de diagnóstico entre os pacientes com DC e RCU

Variáveis	DC n = 56	RCU n = 40	P
Sexo feminino, nº (%)	29 (51,8)	24 (60,0)	0,56 <sup>[1]</sup>
Idade, anos	43,2 ± 14,6	41,7 ± 14,3	0,62 <sup>[2]</sup>
Etnia branca nº (%)	52 (92,8)	34 (85,0)	0,31 <sup>[1]</sup>
Fumo, nº (%)	12 (21,4)	5 (12,5)	0,39 <sup>[1]</sup>
Tempo de diagnóstico, meses			0,82 <sup>[2]</sup>
Média±DP	41,4 ± 70,9	21,7 ± 27,0	
Mediana	12,2 (1 a 47,7)	12,7 (4,1 a 24,4)	

Os dados são apresentados como média±desvio padrão (DP), mediana (mínimo e máximo) ou contagem (percentual). P: significância estatística, [1] qui-quadrado, [2] t de student.

Como pode ser observado na Tabela 1 a distribuição por etnia compreendeu 86 euro-descendentes (89,5%) e 10 afro-descendentes (10,5%) no pacientes com DII. Quando subdividimos nos grupos os euro-descendentes totalizaram 52 dos 56 pacientes com DC (isto é 92,8%) e 34 dos 40 pacientes com RCU (85%).

Quanto ao sexo, a maioria da população estudada pertencia ao sexo feminino (53/96 pacientes) numa percentagem de 55,2% contra 44,8% do sexo masculino (43/96 pacientes). Essa proporção manteve-se quando subdividimos em DC e RCU. A percentagem do sexo feminino com DC foi de 51,8% (29/56 pacientes) e com RCU foi de 60% (24/40 pacientes).

O tempo médio para a realização do diagnóstico das doenças inflamatórias intestinais em meses, foi de 41,4 meses (cerca de 3 anos e meio) para DC e 21,7 meses para RCU (quase 2 anos).

Apenas 8 dos 96 pacientes estudados apresentavam história familiar de DII, sendo que 4/8 eram portadores de DC e 4/8 de RCU.

Os sintomas clínicos mais comuns são semelhantes em ambas as patologias, porém suas freqüências são relativamente distintas. A dor abdominal está presente em mais de 85% dos pacientes com DC enquanto na RCU apenas 45% dos pacientes apresentam este sintoma. Já a diarreia é muito mais freqüente nos pacientes com RCU (82,5% casos) quando comparada a DC (60,7% casos). Chama a atenção é a presença de produtos patológicos nas fezes que ocorre em cerca de 60% dos pacientes com RCU enquanto menos de 1/4 dos pacientes com DC (23,2%) apresentavam sangue ou muco nas fezes.

(TABELA 2)

**Tabela 2** – Comparação de variáveis clínicas, manifestações extra-intestinais e complicações entre os pacientes com DC e RCU

<b>Variáveis</b>	<b>DC n = 56</b>	<b>RCU n = 40</b>	<b>P</b>
Sintomas, n <sup>o</sup> (%)			< 0,001
Diarréia	34 (60,7)	33 (82,5)	
Dor abdominal	48 (85,7)	18 (45)	
Sangue nas fezes	13 (23,2)	26 (65,0)	
Muco nas fezes	13 (23,2)	24 (60,0)	
Febre	9 (16,0)	4 (10,0)	
Tenesmo	3 (5,3)	13 (32,5)	
Suboclusão	10 (17,8)	1 (2,5)	
Manifestações extra-intestinais, n <sup>o</sup> (%)			0,54
Ósteo-articulares	17 (30,3)	15 (37,5)	
Pulmonares	7 (12,5)	4 (10,0)	
Dermatológicas	3 (5,3)	6 (15,0)	
Oculares	2 (3,6)	3 (7,5)	
Colangio-hepáticas	1 (1,8)	3 (7,5)	
Complicações, n <sup>o</sup> (%)			< 0,001
Fístula	24 (42,8)	0 (0,0)	
Obstrução	22 (39,3)	0 (0,0)	
Intratabilidade clínica	2 (3,6)	4 (10,0)	
Perfuração	5 (8,9)	0 (0,0)	
Abscesso	2 (3,6)	1 (2,5)	
Neoplasia	0 (0,0)	1 (2,5)	
Megacólon tóxico	0 (0,0)	1 (2,5)	

Os dados são apresentados como contagem (percentual). P: significância estatística

A manifestação extra-intestinal mais comum em ambos os grupos foi a osteo-articular, com uma ocorrência em mais de 1/3 tanto nos pacientes com DC e quanto nos pacientes com RCU. (TABELA 2)

Quando é analisada a ocorrência de complicações no curso da doença, observa-se uma maior freqüência destas no grupo de pacientes com DC. As complicações mais freqüentes neste grupo, as fístulas (42,8%) e a obstrução intestinal (39,3%), relacionam-se ao padrão da doença. Este é basicamente dividido em três grupos: inflamatório, estenosante e fistulizante. (TABELA 2)

Quando é avaliada a localização das doenças na colonoscopia observa-se uma maior freqüência de doença em íleo (28,6% casos) e em íleo mais cólon direito (19,6% casos) naqueles pacientes com DC. Enquanto os pacientes com RCU apresentam doença em todo o cólon (42,5% casos) seguido de doença em retossigmóide (27,5%) casos. Mais da metade (51,9% casos) dos pacientes com DC apresentam estenose no Rx de trânsito de delgado. Observando-se a presença de atividade inflamatória em intestino delgado, no Ecodoppler a cores intestinal, em cerca de 80% dos pacientes com DC. (TABELA 3)

**Tabela 3** – Comparação de localização da doença na colonoscopia e realização de exames complementares entre os pacientes com DC e RCU

Variáveis	DC n = 56	RCU n = 40	P
Localização à colonoscopia, n° (%)			< 0,001
Pancolite	3 (5,3)	17 (42,5)	
Íleo	16 (28,6)	0 (0,0)	
Retossigmóide	1 (1,8)	11 (27,5)	
Cólon direito e íleo	11 (19,6)	0 (0,0)	
Cólon esquerdo	3 (5,3)	6 (15)	
Anastomose cirúrgica	8 (14,3)	0 (0,0)	
Reto	1 (1,8)	6 (15)	
Perianal	2 (3,6)	0 (0,0)	
Íleo e reto	5 (8,9)	0 (0,0)	
Ausência de doença aparente	6 (10,7)	0 (0,0)	
Endoscopia digestiva alta, n° (%)	n = 41	n = 17	0,96
Normal	24 (58,5)	11 (64,7)	
Esofagite	7 (17,1)	2 (11,8)	
Gastrite	5 (12,2)	2 (11,8)	
Duodenite	5 (12,2)	2 (11,8)	
Rx de trânsito de delgado, n° (%)	n = 52	n = 15	<0,001
Normal	14 (26,9)	14 (93,3)	
Estenoses	27 (51,9)	1 (6,7)	
Edema	5 (9,6)	0 (0,0)	
Fístula	3 (5,8)	0 (0,0)	
Úlceras	3 (5,8)	0 (0,0)	
Ecodoppler intestinal, n° (%)	n = 41	n = 17	<0,001
Atividade em delgado	33 (80,5)	0 (0,0)	
Ausência de atividade	7 (17,1)	5 (29,4)	
Atividade em cólon esquerdo	0 (0,0)	7 (41,2)	
Atividade em todo o cólon	1 (2,4)	5 (29,4)	
	n = 6	n = 16	
ANCA positivo, n° (%)	1 (16,7)	11 (68,8)	0,60
	n = 6	n = 16	
ASCA positivo, n° (%)	4 (66,7)	16 (100)	0,60

Os dados são apresentados como contagem (percentual). P: significância estatística

Os 96 pacientes com DII foram analisados quanto à ocorrência da inserção/deleção do polimorfismo 14bp na região 3'UTR do gene do HLA-G. Esse grupo foi subdividido em dois grupos: aqueles com DC e aqueles com RCU, que posteriormente foram comparados com o grupo controle de indivíduos saudáveis doadores de sangue.

Os pacientes foram subdivididos em três grupos: os homozigotos para deleção (- 14bp/- 14bp) chamados **Hd**, os homozigotos para inserção (+ 14bp/+ 14bp) denominados **Hi** e os heterozigotos (- 14bp/+ 14bp) chamados **Ht**.

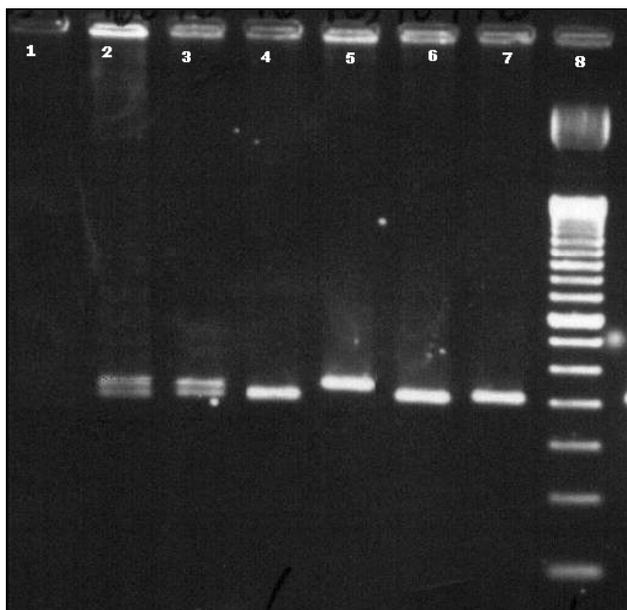


Figura 1: Eletroforese em gel de acrilamida 6% dos produtos da PCR para genotipagem do HLA-G. Canaleta 1: controle negativo; 2 e 3 heterozigotos (+14pb/-14pb); 4, 6 e 7 homozigotos para deleção (-14pb/-14pb); 5 homozigoto para inserção (+14pb/+14pb); 8 marcador molecular, ladder de 100pb.

O padrão de distribuição do genótipo dos três subgrupos (Hd, Ht, Hi) quando comparado entre os grupos de pacientes com DC, grupo de pacientes com RCU e grupo controle foi diferente. Esses resultados foram obtidos através do teste de significância global, o teste de qui-quadrado ( $p = 0,033$ ) e confirmados com o teste exato de Fisher ( $p = 0,013$ ).

**Tabela 4** – Comparação da frequência genotípica no polimorfismo 14bp do HLA-G entre os pacientes com DC, RCU e controles

<b>Genótipo</b>	<b>DC n = 56</b>	<b>RCU n = 40</b>	<b>Controles n = 460</b>
Hi (+14bp/+14bp)	1 (1,8)	8 (20,0)	70 (15,2)
Ht (+14bp/-14bp)	27 (48,2)	20 (50,0)	223 (48,5)
Hd (-14bp/-14bp)	28 (50,0)	12 (30,0)	167 (36,0)

Os dados são apresentados como contagem (percentual).  
 $P = 0,013$  (teste exato de Fisher)

A frequência de heterozigotos (Ht) foi semelhante no grupo de pacientes com DC (48,2%), com RCU (50,0%) e no grupo controle (48,5%). Esses resultados foram obtidos através do teste de significância global, o teste de qui-quadrado, com valor de  $p = 0,982$ . (TABELA 4)

Já a frequência de homozigotos para a deleção, isto é, o Hd, foi maior nos pacientes com DC (50,0%) quando comparado ao grupo de pacientes com RCU (30,0%) e ao grupo controle (36,0%). Considerando especificamente o genótipo Hd, obtivemos um valor  $p = 0,08$ , na comparação dos três grupos. Isso indica que apesar de observarmos uma maior frequência do genótipo homozigoto para deleção nos pacientes com DC, ainda não é possível constatar a presença de significância estatística clássica. (TABELA 4)

A frequência de homozigotos para a inserção 14bp, isto é, o Hi, foi significativamente menor nos pacientes com DC (1,8%) quando comparado ao grupo de pacientes com RCU (20,0%) e ao grupo controle (15,2%). Esses resultados obtidos mostraram significância estatística,  $p = 0,014$ , quando foi utilizado o teste de qui-quadrado. Na comparação isolada dos grupos para a situação DC vs RCU observou-se um OR = 13,8 (IC95%: 1,6 a 306,6;  $P < 0,01$ ) e na situação DC vs Controle um OR = 9,87 (IC95%: 1,44 a 195,11;  $P < 0,01$ ). (TABELA 4)

Quando é avaliada a distribuição alélica entre os três grupos, obtém-se um resultado estatisticamente significativo ( $p=0,01$ ). Na comparação isolada dos grupos para a situação DC vs RCU e DC vs controles observou-se significância estatística ( $p = 0,009$  e  $p = 0,007$  respectivamente). O que não ocorreu na comparação RCU vs controles ( $p = 0,39$ ). (TABELA 5)

**Tabela 5** – Comparação da frequência alélica no polimorfismo 14bp do HLA-G entre os pacientes com DC, RCU e controles

Alelo	DC n = 112	RCU n = 80	Controles n = 920
+ 14bp	29 (25,9)	36 (45,0)	363 (39,5)
- 14bp	83 (74,1)	44 (55,0)	557 (60,5)

Os dados são apresentados como contagem (percentual).  
 $P = 0,01$  (qui-quadrado)

Posteriormente efetuou-se a divisão do subgrupo de pacientes com RCU de acordo com a classificação de TrueLove-Witts<sup>55</sup> que é usada para

extratificação de gravidade dos pacientes com RCU. Esta classificação divide os pacientes com RCU em leve, moderada e severa intensidade da doença.

Quando foi aplicada esta classificação de gravidade aos subgrupos do polimorfismo 14bp dos pacientes com RCU obteve-se uma distribuição de freqüências onde o Hi foi de 62,5% (5/8) na RCU de leve intensidade contudo sem significância estatística ( $p= 0,78$ )

Efetou-se a divisão do subgrupo de pacientes com DC de acordo com o comportamento da doença em três conjuntos: comportamento fistulizante, comportamento estenosante e comportamento inflamatório. Quando foi aplicada esta classificação de comportamento aos genótipos 14bp dos pacientes com DC, apesar de haver uma aparente maior freqüência de pacientes Ht no grupo inflamatório de 42,3% (11/15) dos pacientes, não foi detectada diferença estatística significativa quando comparados os diferentes genótipos e o comportamento da DC ( $p = 0,86$ )

Posteriormente foi analisada a ocorrência de procedimentos cirúrgicos em ambos as doenças e a sua correlação com os polimorfismos 14bp. Cerca de 50% (28/56) dos pacientes com DC realizaram algum procedimento cirúrgico durante a sua evolução. Apenas 5% (2/40) dos pacientes com RCU foram submetidos a algum tratamento cirúrgico. O que é esperado de acordo com as características clínicas destas doenças. As análises dos subgrupos de polimorfismos na DC e na RCU separadamente os resultados não foram estatisticamente significativos.

Realizou-se a avaliação quanto à ocorrência de manifestações extra-intestinais nos pacientes com RCU e com DC. Observou-se que cerca de 50% dos pacientes com RCU (20/40) apresentavam alguma manifestação extra-intestinal. Apenas 35,7% (20/56) dos pacientes com DC apresentaram alguma manifestação extra-intestinal da DII. Quando examinados os genótipos do polimorfismo identificou-se uma maior ocorrência de Hd entre os pacientes que não apresentaram manifestações extra-intestinais, com uma distribuição de 64,3% (18/10) nos pacientes com DC e 66,7% (8/4) nos pacientes com RCU entretanto não houve diferença estatisticamente significativa.

Foram avaliados alguns exames laboratoriais em ambos os grupos. Os exames foram escolhidos devido à importância que exercem no acompanhamento e na avaliação da gravidade das DII. Foram relacionados os seguintes exames: hemoglobina sérica (HGB), linfócitos totais (LINF), velocidade de hemossedimentação (VSG) e proteína C reativa (PCR).

O valor médio da PCR foi sempre mais elevado em pacientes Hd tanto quando avaliados pacientes com DC (PCR  $2,61 \pm 4,83$ ) quanto quando avaliados pacientes com RCU (PCR  $2,23 \pm 3,33$ ). Os pacientes Hi foram os que apresentaram o valor médio mais baixo da PCR tanto no grupo com RCU ( $1,59 \pm 2,15$ ) quanto no grupo DC ( $0,70$ ). Lembrando que o valor normal da PCR no laboratório do HLS-PUCRS é  $< 0,3$ . Não foi encontrada significância estatística dessas diferentes médias e DP entre os grupos Ht, Hd e Hi nos pacientes com DC ou RCU quando utilizou-se os testes ANOVA e Kruskal-Wallis.

O valor médio do VSG foi mais elevado no grupo do polimorfismo Hd nos pacientes com DC (VSG  $21,33 \pm 21,81$ ) e no grupo Ht nos pacientes com RCU (VSG  $29,65 \pm 34,60$ ). Novamente os pacientes Hi do grupo com RCU foram os que apresentaram o valor médio mais baixo do VSG ( $11,5 \pm 10,1$ ). Lembrando que o valor normal do VSG no laboratório do HSL-PUCRS é para homens  $< 20$  e para mulheres  $< 13$ . Entretanto não foi encontrada significância estatística dessas diferentes médias entre os grupos Ht, Hd e Hi nos pacientes com DC ou RCU quando utilizou-se os testes ANOVA e Kruskal-Wallis.

O valor médio da HGB foi mais elevado nos indivíduos com genótipo Hd nos pacientes com DC (HGB  $13,56 \pm 1,46$ ) e nos indivíduos com genótipo Ht nos pacientes com RCU (HGB  $13,38 \pm 1,88$ ). Lembrando que o valor normal da HGB no laboratório do HSL-PUCRS para homens é de 13 a 18g/dl e para mulheres de 12 a 16g/dl. Entretanto não foi encontrada significância estatística dessas diferentes médias entre os grupos Ht, Hd e Hi nos pacientes com DC ou RCU quando utilizou-se os testes ANOVA e Kruskal-Wallis.

Acreditando que HGB abaixo de 10 caracteriza anemia definiu-se este valor como ponto de corte. Apenas 3 pacientes, dois deles no grupo DC e um no grupo RCU apresentaram HGB abaixo de 10, sendo que todos possuem o genótipo Ht. Devido ao pequeno número amostral os testes não evidenciaram significância estatística.

O valor médio dos LINF foi sempre mais elevado nos pacientes com genótipo Hi tanto entre os pacientes com DC (LINF 3354) quanto com RCU (LINF 2046  $\pm$  1165). Já o valor médio foi sempre mais baixo nos indivíduos com genótipo Hd tanto entre pacientes com DC (LINF 1581  $\pm$  900) quanto entre os pacientes com RCU (LINF 1327  $\pm$  575). Mas não foi encontrada significância estatística dessas diferentes médias quando utilizados os testes ANOVA e Kruskal-Wallis.

## 7. Discussão

No presente estudo foram analisadas as freqüências do polimorfismo do 14bp do gene do HLA-G nos pacientes com doenças inflamatórias intestinais. O HLA-G é uma molécula envolvida na regulação do sistema imune humano e conseqüentemente está envolvida no desenvolvimento de doenças inflamatórias e autoimunes.

O objetivo do estudo foi analisar a ocorrência e a freqüência deste polimorfismo e verificar a sua potencial associação com determinadas características clínicas das doenças inflamatórias intestinais.

Possivelmente, em patologias de caráter inflamatório, como por exemplo, na doença inflamatória intestinal, a deleção de 14bp na região 3'UTR do éxon 8 diminui a estabilidade do mRNA e quando presente, parece diminuir a concentração das isoformas de proteínas HLA-G e isso parece estar associado com um padrão de resposta do tipo Th1 (inflamatória). Já o alelo de inserção de 14bp aumenta a estabilidade do mRNA e parece agir como um fator de proteção da mucosa gastrointestinal dificultando a infiltração de células T no tecido. Baixas concentrações de HLA-G resultariam em um aumento da resposta de linfócitos T citotóxicos e a indução de um perfil de citocinas do tipo Th1, enquanto altas concentrações não atuariam neste sentido.

Os grupos estudados, grupo DC, grupo RCU e grupo controle apresentavam equilíbrio de Hardy-Weinberg testado através do teste de qui-quadrado tanto para os grupos individualmente quanto para o conjunto global ( $p = 0,682$ ).

Neste estudo houve uma menor frequência do genótipo Hi (+14bp/+14bp) nos pacientes com DC ( $p = 0,014$ ). A baixa frequência de indivíduos da amostra foi caracterizada por apenas um indivíduo Hi entre os 56 pacientes com DC. Os pacientes com DC apresentam um desequilíbrio da resposta imune Th1/Th2 em direção a resposta Th1<sup>26,32,33</sup>. Podemos sugerir que a ocorrência do genótipo da inserção (+14bp) do HLA-G direciona o padrão de resposta imune para um padrão do tipo Th2, com supressão da resposta citotóxica (células T citotóxicas e células NK) e indução de um perfil de citocinas IL-4, IL-5 e IL-6 que favorecem a imunidade humoral. Nesse contexto, seria esperado que pacientes com DC apresentassem uma menor frequência do genótipo Hi, o que efetivamente observamos no estudo. Através do estudo observou-se que o cálculo da razão de verossimilhança dos indivíduos Hi com RCU e com DC atinge o valor de 13,75 (IC 95%: 1,61 a 306,61;  $P = 0,004$ ), o que significa que ao encontrarmos um paciente Hi este possui uma chance 13,75 vezes maior de apresentar RCU do que DC.

Também se observou uma maior frequência do genótipo Hd (-14bp/-14bp) em pacientes do grupo DC, apesar de não haver significância estatística ( $p = 0,08$ ).

A freqüência de distribuição do genótipo 14bp na RCU foi semelhante a da população de controles saudáveis, com discreto predomínio do genótipo Hi nos pacientes com RCU em comparação com os demais grupos. Houve significância estatística apenas quando comparados os grupos RCU e DC ( $p < 0,01$ ). O que sugere que o genótipo + 14bp/+ 14bp do HLA-G torna a resposta inflamatória dos pacientes com RCU diferente daquela dos pacientes com DC.

A distribuição das freqüências alélicas apenas corrobora os achados genotípicos: o alelo – 14bp está em maior freqüência nos pacientes do grupo DC e menor freqüência no grupo de pacientes com RCU.

Quando avaliamos algumas variáveis clínicas através da revisão de prontuário dos pacientes em acompanhamento no ambulatório de DII observamos algumas tendências, porém provavelmente devido ao pequeno tamanho amostral não se obteve valores estatisticamente significativos impossibilitando avaliar a relação destas variáveis com o polimorfismo 14bp do HLA-G.

Na avaliação de marcadores sanguíneos de inflamação (PCR e VSG) utilizados no acompanhamento clínico ambulatorial destes pacientes observa-se que o grupo de pacientes com deleção 14bp tende a apresentar marcadores inflamatórios em níveis mais elevados, independente de pertencerem aos grupos DC ou RCU, quando comparados aos pacientes com inserção 14bp. O inverso ocorre com a contagem de linfócitos no sangue periférico: que tende a ser de menor valor no grupo Hd e de maior valor no grupo Hi.

A hipótese discutida na revisão bibliográfica deste estudo vai ao encontro com os resultados obtidos no nosso trabalho, em que o genótipo de inserção encontra-se significativamente diminuído e o genótipo de deleção está aumentado no grupo de pacientes com DC, os quais apresentam um perfil inflamatório típico (Th1).

Os resultados aqui apresentados sugerem um envolvimento diferencial da molécula HLA-G, inferido a partir das freqüências genóticas do polimorfismo de 14bp, na DC e na RCU. No entanto, o real envolvimento do HLA-G na doença inflamatória intestinal só poderá ser estabelecido com a continuidade dos estudos que associem tanto as variantes gênicas do HLA-G quanto o nível de expressão das diversas isoformas desta molécula entre as diferentes doenças inflamatórias intestinais.

## 8. Conclusão

A análise do polimorfismo inserção/deleção de 14 bp no éxon 8 da região 3'UTR do gene do HLA-G permitiu concluir que:

8.1. Existe uma associação entre o polimorfismo no éxon 8 do gene do HLA-G com a DII.

8.2. As frequências alélicas e genótípicas observadas para o grupo dos pacientes com DII comparadas com as frequências observadas no grupo controle não foram semelhantes. Observou-se uma menor frequência do genótipo de inserção em pacientes com DC em relação aos pacientes com RCU e aos controles.

8.3. Não há uma correlação entre as alterações imunogenéticas e as variadas características clínicas de RCU e DC.

## 9. Bibliografia

---

<sup>1</sup> Wilks S, Moxon W. Lectures on pathological anatomy. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia, PA: Lindsay and Blakiston, 1875.

<sup>2</sup> Crohn B, Ginzburg L, Oppenheimer G. Regional ileitis. A pathological and clinical entity. JAMA 1932; 99: 1323-29.

<sup>3</sup> American Gastroenterological Association Institute Medical Position Statement on Corticosteroids, Immunomodulators and Infliximab in Inflammatory Bowel Disease. Gastroenterol 2006; 130: 940-87.

<sup>4</sup> Loftus E. Clinical epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: incidence, prevalence and environmental influences. Gastroenterol 2004; 126: 1504-17.

<sup>5</sup> Loftus E, Silverstein JF, Sandborn WJ, et al. Ucerative colitis in Olmsted County, Minnesota, 1940-1993: incidence, prevalence and survival. Gut 2000; 46: 336-43.

<sup>6</sup> Bjornsson S, Johannsson J. Inflammatory bowel disease in Iceland, 1990-1994: a prospective, nationwide, epidemiological study. Eur J Gastroenterol Hepatol 2000; 12: 31-33.

<sup>7</sup> Shivananda M, Fear N, Logan R, et al. Incidence of inflammatory bowel disease across Europe. Results of the European Collaborative Study of Inflammatory Bowel Disease (EC- IBD). Gut 1996; 39:690-97.

<sup>8</sup> Kurata J, Kantor FS, Frankl H, et al. Crohn's disease among ethnic groups in a large health maintenance organization. Gastroenterol 1992; 102: 1940-48.

---

<sup>9</sup> Persson PG, Ahlbom A, Hellers G, et al. Inflammatory Bowel Disease and tobacco smoke – case control study. *Gut* 1990; 31: 1377-81.

<sup>10</sup> Cosnes J, Beaugerie L, Carbonnel F, et al. Smoking cessation and the course of Crohn's Disease. *Gastroenterol* 2001; 120: 1093-99.

<sup>11</sup> Krishnan A, Korzenik J. In Inflammatory Bowel Disease and environmental influences. *Gastroenterol Clin N Am* 2002; 31: 21-39.

<sup>12</sup> Wakefield AJ, Fracs AM, Sawyerr MRCP, et al. Smoking, the oral contraceptive pill and Crohn's Disease. *Dig Dis Sci* 1991; 36: 1147-50.

<sup>13</sup> Sands B. From symptom to diagnosis: clinical distinctions among various forms of intestinal inflammation. *Gastroenterol* 2004; 126: 1518-32.

<sup>14</sup> Sands B. In Crohn's Disease. *Gastrointestinal and Liver Disease; Sleisenger & Fordtran*. 2002. 7th edition.

<sup>15</sup> Jewell, D. In Ulcerative Colitis. *Gastrointestinal and Liver Disease; Sleisenger & Fordtran*. 2002. 7th edition.

<sup>16</sup> Judge T, Lichtenstein G. In Inflammatory Bowel Disease. *Current: Diagnosis and Treatment in Gastroenterology; Friedman S, McQuaid K & Grendell J*. 2003. 2<sup>nd</sup> edition.

<sup>17</sup> Kotza L. Em Doença de Crohn. *Conduitas em gastroenterologia. Federação Brasileira de Gastroenterologia*. 2004. 1st edition.

<sup>18</sup> Machado M, Schneider N. Em Colonoscopia nas doenças inflamatórias intestinais. *Endoscopia Gastrointestinal Terapêutica. SOBED - Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva*. São Paulo. 2006; 141: 995-98.

---

<sup>19</sup> Baker WN, Milton-Thompson GJ. The anal lesion as the sole presenting symptom of intestinal Crohn's disease. *Gut* 1971; 12: 865-868.

<sup>20</sup> Sipahi A, Damião A. Doença inflamatória intestinal: Retocolite ulcerativa inespecífica e Doença de Crohn. *Conduas em gastroenterologia. Federação Brasileira de Gastroenterologia. 2004. 1st edition.*

<sup>21</sup> Davila R, Rajan E, Baron T. ASGE guideline: colorectal cancer screening and surveillance. *Gastrointestinal Endoscopy* 2006; 63: 546-57.

<sup>22</sup> Binder V. Genetic epidemiology of Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci* 1998; 16: 351-55

<sup>23</sup> Duerr R. The genetics of Inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am* 2002; 31: 63-76

<sup>24</sup> Ogura Y et al. A frameshift mutation in NOD32 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411: 603-09.

<sup>25</sup> Farrell R, LeMont J. Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am* 2002; 31: 41-62.

<sup>26</sup> Podolski DK. Inflammatory Bowel Disease. *N Eng J Med* (2002) 347; 6: 417-29.

<sup>27</sup> Elia C; Souza H. Imunologia da Mucosa Intestinal. In *Conduas em Gastroenterologia. Federação Brasileira de Gastroenterologia. 2004; 167-76.*

<sup>28</sup> Plevy S. The immunology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am* 31 (2002): 77-92.

---

<sup>29</sup> Sartor B. Mucosal Immunology and Mechanisms of Gastrointestinal Inflammation. In *Gastrointestinal and Liver Disease*. Sleisenger M, Friedman L and Feldman M. Saunders; 2002: 21-51.

<sup>30</sup> Chess L, Jiang H. Regulation of Immune Responses by T Cells. *N Eng J Med* 2006; 354: 1166-76.

<sup>31</sup> Bernstein CN, Wajda A, Blanchard J. The Clustering of Other Chronic Inflammatory Diseases in Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Study. *Gastroenterology* 2005; 129: 827-836.

<sup>32</sup> Diamond B, Davidson A. Autoimmune Diseases. *N Eng J Med* 2001; 345: 340-50.

<sup>33</sup> Shanahan F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics and ecotherapeutics. *Gastroenterology* 2001; 120: 622-35.

<sup>34</sup> Abbas A, Lichtman A, Pober J. The Major Histocompatibility Complex. *Cellular and Molecular Immunology*. 1994. 2<sup>nd</sup> edition.

<sup>35</sup> Ishitani A, Sageshima N, Lee N, et al. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functions roles for HLA- E, F and G in maternal-placental immune recognition. *J Immunol* 2003; 81: 199-252.

<sup>36</sup> Baricordi O, Stigmani M, Melchiorri L, et al. HLA-G and inflammatory diseases. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2008; 7: 67-74.

<sup>37</sup> Vianna P, Dalmaz C, Chies J, et al. Immunogenetics of pregnancy: role of 14bp deletion in maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. *Human Immunology* 2007; 68: 668-74.

<sup>38</sup> Tripathi P, Abbas A, Naik S, et al. Role of 14bp deletion in HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 64: 706-10.

- 
- <sup>39</sup> Downs-Kelly E, Schade A, Hansel D. The role of HLA-G in gastrointestinal inflammatory disease and malignancy. *Semin Cancer Biol* 2007; 17: 451-58.
- <sup>40</sup> Carosella ED, Howangyin KY, Favier B, et al. HLA-G-dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance. *Hum Immunol*. 2008, doi:10.1016/j.humimm.2008.08.280
- <sup>41</sup> Patel DM, Arnold PY, White GA, et al. Class II MHC/peptide complexes are released from APC and are acquired by T cell responders during specific antigen recognition. *J Immunol* 1999; 163: 5201–10
- <sup>42</sup> Torres M, Le Discorde M, Lorite P, et al. Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. *International Immunol* 2004; 16: 579-83.
- <sup>43</sup> Hviid G, Rizzo R, Christiansen O, et al. HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics* 2004; 56: 135-41.
- <sup>44</sup> Gobin SJ, Van Den Elsen PJ. Transcriptional regulation of the MHC class Ib genes HLA-E, HLA-F, and HLA-G. *Hum Immunol* 2000; 61:1102-7.
- <sup>45</sup> Veit T, Vianna P, Chies J, et al. Association of the HLA-G 14bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2008; 71: 440-46.
- <sup>46</sup> Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G, et al. The 14bp deletion-insertion polymorphism in the 3'UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 2003; 64: 105-10.
- <sup>47</sup> Veit T, Cordero E, Chies J, et al. Association of the HLA-G 14bp polymorphism with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2008 (no prelo).

- 
- <sup>48</sup> Glas J, Torok HP, Tonenchi L, et al. The 14bp deletion polymorphism in the HLA-G gene displays significant differences between ulcerative colitis and Crohn's disease and is associated with ileocecal resection in Crohn's disease. *International Immunol* 2007; 19: 621-26.
- <sup>49</sup> Lahiri K, Nurnberger JI JR. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 1991;19: 5444.
- <sup>50</sup> Hviid. V, Christiansen B. Linkage disequilibrium between human leukocyte antigen (HLA) class II and HLA-G--possible implications for human reproduction and autoimmune disease. *Hum Immunol* 2005; 66: 688-99.
- <sup>51</sup> Hviid V, Hylenius S, Hoegh M, et al. HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 2002;60: 122-32.
- <sup>52</sup> Hviid V, Hylenius S, Rorbye C, et al. HLA-G allelic variants are associated with differences in HLA-G mRNA isoform profile and HLA-G mRNA levels. *Immunogenetics* 2003; 55:63-79.
- <sup>53</sup> Torres Mi, MoreauP, Rouas-Freiss N, et al. HLA-G today. *Inmunología*, 2001; 20:18-29.
- <sup>54</sup> Pistoia V, Morandi F, Wang X, Ferrone S. Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? *Semin Cancer Biol* 2007; 17:469-79.
- <sup>55</sup> Truelove SC, Witts LJ. Cortisone in ulcerative colitis. *Br Med J* 1995; 2: 1041-48.

---

## Apêndice 1

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

#### **POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?**

A Doença Inflamatória Intestinal é determinada por uma série de fatores que incluem características genéticas e influência do ambiente no qual o indivíduo se encontra.

Este estudo está sendo realizado para tentar identificar e caracterizar fatores genéticos, principalmente associados ao sistema de defesa do organismo (sistema imune) envolvidos na Doença Inflamatória Intestinal.

#### **DE QUE CONSTA O ESTUDO?**

Será coletada uma amostra de sangue. O exame de sangue será destinado à avaliação genética e será utilizado para a análise da presença de proteínas solúveis ou ligadas às células sangüíneas que possam estar envolvidas no desenvolvimento da Doença Inflamatória Intestinal. A partir deste sangue também será extraído DNA o qual será utilizado para a análise de polimorfismos de genes que possam estar associados à inflamação existente nesta doença. O uso do sangue para quaisquer outras finalidades é vetado.

#### **QUAIS SÃO AS VANTAGENS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?**

1. Como o presente trabalho visa avaliar o padrão de resposta do sistema imune em indivíduos com Doença Inflamatória Intestinal, qualquer fator de predisposição identificado pode tornar-se alvo potencial de uma terapia voltada ao controle dos sintomas clínicos associados a esta característica.
2. Os participantes deste trabalho estarão auxiliando para o avanço e progresso do conhecimento sobre a Doença Inflamatória Intestinal.

#### **QUAIS SÃO AS DESVANTAGENS EM PARTICIPAR DESTE ESTUDO?**

1. Comparecer ao hospital
2. Realizar uma coleta de sangue, que pode causar dor temporária e/ou um hematoma.

#### **HÁ A POSSIBILIDADE DE ESTE ESTUDO CONTINUAR?**

Este estudo foi planejado para encerrar em 2008. No entanto, é possível que mais genes e outros fatores relacionados à Doença Inflamatória Intestinal possam vir a ser analisados mais adiante.

#### **DADOS RELATIVOS À PROTEÇÃO DO PACIENTE**

- A. Os dados coletados neste estudo são confidenciais, e não serão revelados dados que permitam identificar os pacientes em hipótese alguma.

- 
- B. A adesão ao estudo é voluntária, ou seja, cada paciente é livre para decidir não participar.
  - C. A decisão de não participar não interferirá no acompanhamento normal dos pacientes no centro.
  - D. O paciente é livre para desistir em qualquer momento do estudo, sem necessidade de fornecer justificativa.

### **COMPREENSÃO E AUTORIZAÇÃO**

Tendo compreendido as informações do presente termo de consentimento e concordado com elas, assinala com um X apenas uma das opções abaixo:

- ( ) Autorizo o uso do material coletado para esta pesquisa.
- ( ) Autorizo uso e estoque do material coletado para esta pesquisa e para a análise de outros fatores que possam vir a ser considerados relevantes dentro desta linha de pesquisa, desde que pelo mesmo grupo de pesquisa.

Paciente: \_\_\_\_\_

Registro: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Pesquisador: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 200\_\_.

Pesquisador Responsável no Centro: Dra. Marta Brenner Machado  
Pesquisador Responsável no Departamento de Genética da UFRGS: José Artur Bogo Chies. Telefone para contacto: 33 16 67 40 (c/ José Artur Bogo Chies)

---

## Apêndice 2

### AMBULATÓRIO DE DOENÇAS INFLAMATÓRIAS INTESTINAIS

Registro: \_\_\_\_\_  
Nome: \_\_\_\_\_  
Nome da Mãe: \_\_\_\_\_ Nome do Pai: \_\_\_\_\_  
Sexo: \_\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_ Estado civil: \_\_\_\_\_  
Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_  
Etnia (branca, amarela, preta, parda, indígena): \_\_\_\_\_ Ascendência Judaica: \_\_\_\_\_  
Endereço Completo: \_\_\_\_\_  
Cidade: \_\_\_\_\_  
UF: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ Qto tempo reside no local: \_\_\_\_\_  
Escolaridade: (analfab., ensino fundamental, médio, superior /// Completo x Incomp) \_\_\_\_\_  
Número de Anos Estudados: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_  
Ambiente de Trabalho (aberto/fechado) \_\_\_\_\_

Diagnóstico:  DC  
 RCUI  
 Colite Indeterminada

Forma de Apresentação:  Clínica  
 Cirúrgica

Nº de Familiares afetados: 1º grau: \_\_\_\_\_ 2º grau: \_\_\_\_\_  
Gestação:  SIM  NÃO  
Uso de ACO:  SIM  NÃO  
Número de Gestações: \_\_\_\_\_  
Data da Última Gestação: \_\_\_\_\_

Doenças Associadas:  NÃO  DM  HAS  Esclerose Múltipla  Psoríase  Asma  
 Outras: \_\_\_\_\_

Colonoscopias:  
1ª \_\_\_\_\_  
2ª \_\_\_\_\_  
3ª \_\_\_\_\_  
Outras \_\_\_\_\_

Data dos Primeiros Sintomas \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Data do Diagnóstico: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Idade do Diagnóstico:  <40 anos  
 >=40 anos  
Histórico Familiar:  SIM  NÃO

Tabagismo:  SIM  NÃO  
 Atual Nº de Cigarros/dia: \_\_\_\_  
 Progresso Nº de Cigarros/dia: \_\_\_\_  
Tempo de Tabagismo (anos) \_\_\_\_\_

#### RETOCOLITE ULCERATIVA

Localização:  Proctite/proctossigmoidite  
 Hemicolite esquerda  
 Pancolite  
Atividade da Doença:  SIM  NÃO

---

Truelove & Witts  Leve  Moderada  Grave  
Marcadores:  ANCA  ASCA  HLA-B27

#### DOENÇA DE CROHN

Localização:  Ileal/IleoCecal (L1)  
 Colônica (L2)  
 Ileocolônica (L3)  
 Sist. Digestório Superior (L4)  
 Anorretoperineal  
Comportamento:  Não penetrante (B1)  
 Estenosante (B2)  
 Penetrante (B3)  
Atividade da Doença:  SIM  
 NÃO  
Marcadores:  ANCA  ASCA  HLA-B27

#### COMPLICAÇÕES NÃO SIM

Abscesso  
 Perfuração em peritônio livre  
 Obstrução  
 Neoplasia  
 Outras: \_\_\_\_\_  
 Óbito (data e causa) \_\_\_\_\_

#### MANIFESTAÇÕES EXTRA-INTESTINAIS

Pele e Mucosa:  Eritema Nodoso  
 Pioderma Gangrenoso  
 Úlceras Orais  
 Outras: \_\_\_\_\_  
Olhos:  Irite  
 Episclerite  
 Uveíte  
 Outras: \_\_\_\_\_  
Osteoarticulares:  Artrite  
 Sacroileíte  
 Espondilite Anquilosante  
 Outras: \_\_\_\_\_  
Hepatobiliares:  Colangite esclerosante

#### TERAPÊUTICA ATUAL:

Esteróides:  Resposta Efetiva  Resposta Refratária  Dependente  
Salicilatos:  Sulfassalazina  5-ASA  
Antibióticos:  Ciprofloxacina  Metronidazol  Outros: \_\_\_\_\_  
Probióticos:  \_\_\_\_\_  
Azatioprina ou 6MP Início: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Fim: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Dose: \_\_\_\_\_  
 Intolerância  Resposta Satisfatória  Não-Resposta  
Outros:  Metotrexato  
 Anticitocinas  
 Citocinas  
 Outras medicações: \_\_\_\_\_



---

# ***THE HLA-G 14 bp POLYMORPHISM IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASE***

**Nutianne Camargo Schneider <sup>1</sup>**

**Raquel Rinke<sup>2</sup>**

**Alessandra Peres<sup>3</sup>**

**Marta Brenner Machado <sup>5</sup>**

**Denise Cantarelli Machado <sup>4</sup>**

**Jose Artur Bogo Chies <sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde, PUCRS, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Imunogenética, Departamento de Genética, UFRGS, Brazil.

<sup>3</sup> Centro Universitário Metodista IPA, Brazil

<sup>4</sup> Laboratório de Pneumologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas, PUCRS, Brazil.

<sup>5</sup> Faculdade de Medicina, PUCRS, Brazil.

---

## Abstract

Inflammatory bowel disease (IBD), represented by ulcerative retocolitis (UC) and Crohn's disease (CD), is a multifactorial disease influenced both by genetic as well as by environmental factors. Some genes related to immune responses were already implicated as potentially involved in IBD development. The HLA-G is one of these genes. HLA- G is a non-classical MHC class I molecule characterized by a low polymorphism at the DNA level and limited tecidual distribution. In the present work, we analyzed the insertion/deletion polymorphism of 14 bp on the HLA-G gene 3' UTR in order to verify its association to IBD variants. Ninety six IBD patients were evaluated. Patients were subdivided in two groups, CD (n= 56) and UC (n=40). Allelic and genotypic frequencies were compared among the patients as well as a group of health blood donors. Genotypic frequencies were different among the tested groups ( $p = 0.013$ ). The frequency of homozygous for the insertion allele was significantly lesser in CD when compared to both UC and control groups ( $p=0.014$ ). Conversely, the frequency of homozygous for the deletion allele was higher in the CD when compared to both UC and control groups ( $p = 0.08$ ). Our data suggest that the HLA-G genotype can contribute to the IBD process. However a higher number of patients is essential to confirm this finding.

**Key-words:** inflammatory bowel disease; HLA-G; immune response; immunogenetics.

---

## Introduction

Inflammatory bowel disease (IBD) can be divided in two different entities: Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), both characterized as inflammatory chronic systemic diseases. In Brazil there are no data available on IBD prevalence or incidence. The difficulty to diagnosis IBD is probably due to the absence of a gold standard test, the multiplicity of symptoms and the cost of diagnostic examinations. Nevertheless, differences on IBD prevalence among industrialized and underdeveloped countries were reported and highlight the need for study these diseases in different environments (1).

The ethiopathology of IBD involves genetic, environmental and socio-economic factors characterizing IBD as a multifactorial disease. It was suggested that IBD would represent a modified immune response in a genetically susceptible individual, directed by environmental stimulation. Therefore, IBD represents a dysregulation of the immune system. An important factor in the development of the IBD seems to be the pattern of immunological responses. Analyses of the intestinal mucosa in UC and CD individuals shown an increase in the expression of pro-inflammatory cytokines, such as interleucin-1 (IL-1), interleucin-6 (IL-6) and TNF- $\alpha$ , suggesting that Th1 lymphocytes would be involved on the exacerbated response (2,3,4).

Currently, several studies try to identify the genes involved in IBD development. Immune response related genes are specially important candidate targets in such studies.

The Human Leukocyte Antigen G (HLA-G) is a non-classical class I Major Histocompatibility Complex (MHC) molecule which is characterized by low polymorphism at DNA level, limited tissue distribution in non-pathological conditions and expression of both membrane-bound and soluble isoforms by

---

alternative splicing (5). Recent studies demonstrate that HLA-G is induced at the course of inflammatory pathologies such as myositic lesions, psoriatic lesions on skin and multiple sclerosis (6,7,8). HLA-G expression has been suggested as a possible mechanism of tissue protection against autoimmune inflammatory responses, therefore acting as a mechanism of immune surveillance (9,10). Furthermore, HLA-G expression on the surface of epithelial intestinal cells seems to play a role on the suppression of pro-inflammatory cytokines in ulcerative colitis (11).

Expression of HLA-G may be influenced by genetic variants on the *HLA-G* gene. Particularly, it was shown that a HLA-G gene polymorphism, a 14 bp insertion/deletion in exon 8 of the gene, might play a role in mRNA stability (12) and is, to some extent, associated with alteration in the plasmatic levels of soluble forms of HLA-G (13,14). The involvement of this polymorphism in situations where immune regulation is required, such as in the maintenance of pregnancy (15,16), in the success of *in-vitro* fertilization (17), development of pre-eclampsia (18,19) and other pathological conditions such as sarcoidosis (20) has been also described.

In our laboratory, we have found a positive association between the HLA-G -14bp/-14bp (del/del) genotype and susceptibility to Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA) (21). Considering the chronic inflammation present in IBD, and considering the previous works proposing a role to the HLA-G molecule in such disease (22), it would be interesting to investigate the influence of polymorphisms at the HLA-G gene in IBD, assessing the frequency of the 14bp polymorphic variants.

---

## Material and Methods

The patients group was comprised of 96 individuals that underwent treatment at the IBD ambulatory of the São Lucas Hospital (HSL-PUCRS) in Porto Alegre, capital of the southernmost state of Brazil. The patients were invited to participate of the study and an informed consent was obtained from all subjects that accepted to participate. Clinical features and demographic data, as well as data concerning endoscopic and radiologic exams and surgeries were obtained from their medical reports. The controls were healthy donor blood individuals from the urban population of Porto Alegre or other cities from the same geographic area of the patients.

Polymerase chain reaction (PCR) amplification of exon 8 of the HLA-G gene and genotyping: DNA was isolated from peripheral blood cells using a salting out method (26). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of exon 8 of the HLA-G gene was performed as previously described (27). The amplified PCR products were visualized in 6% polyacrylamide gel stained with ethidium bromide. Amplicon sizes for the 14bp polymorphism were: 224 pb for the +14bp allele and 210bp for the -14bp allele. All experiments included a control for both homozygous genotypes.

Statistical analysis: The allelic and genotypic frequencies were determined by counting. HLA-G genotypic frequencies were compared to Hardy–Weinberg (HW) expectations using Chi-Square tests. HLA-G allelic frequencies and HLA-G genotypes were compared among patient and control groups using the  $\chi^2$  test (with Yates correction when necessary), t student or Fisher's Exact Test. In the evaluation of the averages and standard deviation and its comparison among the groups ANOVA and Kruskal-Wallis were used. The significance level was set at  $\alpha = 0.05$  (two-tailed) and all statistical analyses were performed with SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) and winPEPI.

---

## Results

The present study comprised 96 patients with IBD subgrouped in UC (n = 40) and CD (n = 56) (see further details on demographic data on Table 1). The clinical features were similar in both diseases, however the frequencies are distinct. For example, abdominal pain was present in more than 85% of the CD patients while only 45% of the UC patients present this symptom. Diarrhea was much more frequent in UC (82.5%) when compared to CD patients (60.7%). The presence of pathological products in the feces occurs in about 60% of UC patients while less of ¼ of CD (23.2%). For further data on clinical features see Table 2.

In Table 3 a comparison of colonoscopic disease and complementary exams performed on patients is presented. When the localization of the disease in the colonoscopy was evaluated, a higher frequency of illness in ileum (28.6% cases) and right colon plus ileum (19.6% cases) was observed in CD patients. 42.5% of UC patients presented pancolitis and 27.5% presented retosigmoid disease. More than half of the CD patients (51.9%) presented stenosis in the intestinal transit radiologic exam. Intestinal inflammatory activity could be observed by color ecodoppler in about 80% of CD patients.

The 96 IBD patients were genotyped for the 14bp insertion/deletion polymorphism of the HLA-G 3' UTR. All groups were under Hardy-Weinberg equilibrium (data not shown). Genotypic frequencies were significantly different when CD and UC patients were compared to the control group [qui-square test ( $p = 0.033$ ) and confirmed with the accurate Fisher test ( $p = 0,013$ )]. The frequency of heterozygous was similar in all groups [CD (48.2%), UC (50.0%) and controls (48.5%)]. See Table 4. The frequency of homozygous for deletion was higher among CD patients (50.0%) as compared to UC patients (30.0%) and controls (36.0%). Considering specifically the  $-14\text{bp}/-14\text{bp}$  genotype, the  $p$  value was 0.08, in the comparison of the three groups. This indicates only a tendency to a higher frequency of this genotype among CD patients. In the isolated

---

comparison of the groups for the situation CD versus UC the OR observed was 2.33 (IC95%: 0.91 to 6.02; P=0.08) and in the situation CD versus controls the OR was 1.75 (IC95%: 0.97 to 3.17; P=0.06).

The frequency of +14bp/+14bp genotype was significantly lower among CD patients (1.8%) as compared to UC patients (20.0%) and to controls (15.2%) ( $p = 0.014$ ). In the isolated comparison of the groups for the situation CD versus UC was observed an OR = 13.8 (IC95%: 1.6 to 306.6;  $P < 0.01$ ) and in the situation CD versus control and OR = 9.87 (IC95%: 1.44 to 195.11;  $P < 0.01$ ) (TABLE 4).

When the allelic frequencies were compared, a statistical significant difference was observed ( $p = 0.01$ ). In the isolated comparison of the groups for the situation CD versus UC and CD versus controls the results were respectively  $p = 0.009$  and  $p = 0.007$ , Table 5.

Biochemical and hematological laboratory tests [serical hemoglobin (HGB), lymphocyte counts (LINF), hemossedimentation velocity (HSV) and C-reactive protein (CRP)] were also performed. The average CRP value was always higher in -14bp/-14bp individuals both in CD ( $2.61 \pm 4.83$ ) as well as in UC ( $2.23 \pm 3.33$ ) patients as compared to +14bp/+14bp [UC ( $1.59 \pm 2.15$ ) and CD (0.70 – only one patient with this genotype)]. The normal CRP value in the of the HSL-PUCRS laboratory is  $< 0.3$ . The average HSV value was higher in the -14bp/-14bp CD patients ( $21.33 \pm 21.81$ ) and in the +14bp/-14bp UC patients ( $29.65 \pm 34.60$ ). UC +14bp/+14bp patients presented the lower average HSV value ( $11.5 \pm 10.1$ ). The normal HSV value in the HSL-PUCRS laboratory is  $< 20$  for men and  $< 13$  for women. The HGB average value was higher in -14bp/-14bp CD patients ( $13.56 \pm 1.46$ ) and in +14bp/-14bp UC patients ( $13.38 \pm 1.88$ ). The normal HGB value in the HSL-PUCRS laboratory is 13-18g/dl for men and 12-16g/dl for women. However these differences were not statistically significant (ANOVA and Kruskal-Wallis tests). The average LINF count was higher among +14bp/+14bp both in CD (3354) as well as in UC patients ( $2046 \pm 1165$ ). Also, the average value was

---

always lower in -14bp/-14bp individuals [CD ( $1581 \pm 900$ ) and UC ( $1327 \pm 575$ )].  
Again, no statistical significant differences were observed.

---

## Discussion

In the present study the frequencies of the 14bp polymorphism of the HLA-G gene was analyzed in IBD patients. The HLA-G is a molecule involved in the regulation of the human immune system and consequently is potentially involved in the development of inflammatory and autoimmune diseases.

In this study a lower frequency of the +14bp/+14bp genotype was observed among CD patients ( $p = 0.014$ ), nevertheless, it should be pointed out that only one individual (out of 56 CD patients) fall in such category. A likelihood ratio of 13.75 (IC 95%: 1.61 to 306.61;  $P = 0.004$ ), was calculated, meaning that a +14bp/+14bp patient has a 13.75 times higher possibility to present UC as compared to CD. Also, a higher frequency of the -14bp/-14bp genotype was observed in CD patients although not statistically significant ( $p = 0.08$ ). The absence of statistic significance probably was due to the small sample size.

The genotypic frequency distribution among UC was similar to those on the control group, with a discrete predominance of the +14bp/+14bp genotype in UC patients. These findings suggest that the +14bp/+14bp genotype of the HLA-G gene interferes differently in the inflammatory response of UC and CD patients. The distribution of the allelic frequencies corroborates the genotypic findings: the -14bp allele frequency is higher in CD patients as compared to UC patients.

When clinical features were evaluated some trends were observed, although no statistical significant values were found. Therefore it is not possible to conclude a definitive relation of these variables and the HLA-G polymorphism 14bp. In the evaluation of inflammation markers (CRP and HSV) we observed that the group of patients with the -14bp/-14bp genotype tends to present higher levels as compared to the patients with the +14bp/+14bp genotype, independently to belong to the CD or to the UC subgroup. Lymphocytes counts in

---

the peripheral blood were also interesting: lower values were observed among -14bp/-14bp individuals and higher values among +14bp/+14bp individuals.

The results presented here suggest a distinct involvement of the HLA-G molecule, inferred from the genotypic frequencies of the 14bp polymorphism, in the CD and in the UC pathophysiology. However, the real involvement of the HLA-G molecule on IBD will only be established with the continuity of associative studies in different populations.

---

## Bibliography

1. Loftus E. Clinical epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: incidence, prevalence and environmental influences. *Gastroenterol* 2004; 126: 1504-17.
2. Farrell R, LeMont J. Microbial factors in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am* 2002; 31: 41-62.
3. Judge T, Lichtenstein G. In *Inflammatory Bowel Disease. Current: Diagnosis and Treatment in Gastroenterology*; Friedman S, McQuaid K & Grendell J. Lange. 2<sup>nd</sup> edition. 2003.
4. Podolski DK. Inflammatory Bowel Disease. *N Eng J Med* (2002) 347; 6: 417-29.
5. LeMaout J, Le Discorde M, Rouas-Freiss *et al.* Biology and functions of human leukocyte antigen-G in health and sickness, *Tissue Antigens* 2003; 62:273-84.
6. Wiendl H, Behrens L, Maier S *et al.* Muscle fibers in inflammatory myopathies and cultured myoblasts express the nonclassical major histocompatibility antigen HLA-G. *Ann Neurol* 2000; 48:679–84.
7. Aractingi S, Briand N, Le Danff C *et al.* HLA-G and NK receptor are expressed in psoriatic skin: a possible pathway for regulating infiltrating T cells? *Am J Pathol* 2001; 159: 71–7.
8. Wiendl H, Feger U, Mittelbronn M *et al.* Expression of the immune-tolerogenic major histocompatibility molecule HLA-G in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Brain* 2005; 128:2689–2704.
9. Carosella ED, Moreau P, Aractingi S *et al.* HLA-G: a shield against inflammatory aggression. *Trends Immunol* 2001; 22: 553–5.
10. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Weller M. Express and protect yourself: the potential role of HLA-G on muscle cells and in inflammatory myopathies. *Hum Immunol* 2003; 64: 1050–6.
11. Torres MI, Le Discorde M, Lorite P *et al.* Expression of HLA-G in inflammatory bowel disease provides a potential way to distinguish between ulcerative colitis and Crohn's disease. *Int Immunol* 2004; 16:579-83.

- 
12. Rousseau P, Le Discorde M, Mouillot G *et al.* The 14-bp deletion-insertion polymorphism in the 3' UT region of the HLA-G gene influences HLA-G mRNA stability. *Hum Immunol* 2003; 64: 1005–10.
  13. Rebmann V, Van der Ven K, Passler M *et al.* Association of soluble HLA-G plasma levels with HLA-G alleles. *Tissue Antigens* 2001; 57:15-21.
  14. Hviid TV, Rizzo R, Christiansen OB *et al.* HLA-G and IL-10 in serum in relation to HLA-G genotype and polymorphisms. *Immunogenetics* 2004; 56:135-41.
  15. Tripathi P, Abbas A, Naik S *et al.* Role of 14-bp deletion in the HLA-G gene in the maintenance of pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 64: 706-10.
  16. Hviid TV, Hylenius S, Hoegh AM *et al.* HLA-G polymorphisms in couples with recurrent spontaneous abortions. *Tissue Antigens* 2002; 60: 122-132.
  17. Hviid TV, Hylenius S, Lindhard A *et al.* Association between human leucocyte antigen-G and success of in vitro fertilization and pregnancy outcome. *Tissue Antigens* 2004; 64: 66-69.
  18. Hylenius S, Andersen AMN, Hviid TV. Association between HLA-G genotype and risk of preeclampsia: a case±control study using family triads. *Mol Hum Reprod* 2004; 4: 237-246.
  19. Vianna P, Dalmáz CA, Veit TD, Tedoldi C, Roisenberg I, Chies JA. Immunogenetics of pregnancy: role of a 14-bp deletion in the maternal HLA-G gene in primiparous pre-eclamptic Brazilian women. *Hum Immunol.* 2007; 68: 668-74.
  20. Hviid TV, Milman N, Hylenius S *et al.* HLA-G polymorphisms and HLA-G expression in sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 2006; 23: 30-7.
  21. Veit TD, Vianna P, Scheibel I, Brenol C *et al.* Association of the HLA-G 14-bp insertion/deletion polymorphism with juvenile idiopathic arthritis and rheumatoid arthritis. *Tissue Antigens* 2008;71: 440-6.
  22. Glas J, Torok HP, Tonenchi L, *et al.* The 14bp deletion polymorphism in the HLA-G gene displays significant differences between ulcerative colitis and Crohn's disease and is associated with ileocecal resection in Crohn's disease. *International Immunol* 2007; 19: 621-26.

**Table 1** – Comparison of demographic variables, smoke habit and time of diagnosis between CD and UC patients

<b>Variáveis</b>	<b>CD n = 56</b>	<b>UC n = 40</b>	<b>P</b>
Female sex, n° (%)	29 (51.8)	24 (60.0)	0.56 <sup>[1]</sup>
Age, years	43.2 ± 14.6	41.7 ± 14.3	0.62 <sup>[2]</sup>
Euro derived n° (%)	52 (92.8)	34 (85.0)	0.31 <sup>[1]</sup>
Smoke, n° (%)	12 (21.4)	5 (12.5)	0.39 <sup>[1]</sup>
Time to the diagnosis, months			0.82 <sup>[2]</sup>
Mean ± SD	41.4 ± 70.9	21.7 ± 27.0	
Median	12.2 (1 a 47.7)	12.7 (4.1 a 24.4)	

The data are presented as average ( standard deviation (SD), mean (minimum and maximum) or counting (percentile). P: statistics significance, [1] qui-square, [2] t of student.

**Table 2** – Comparison of clinical features, extra-intestinal manifestations and complications between CD and UC patients

<b>Variáveis</b>	<b>CD n = 56</b>	<b>UC n = 40</b>	<b>P</b>
Clinical features, n (%)			< 0.001
Diarrhea	34 (60.7)	33 (82.5)	
Abdominal pain	48 (85.7)	18 (45.0)	
Blood in feces	13 (23.2)	26 (65.0)	
Mucous in feces	13 (23.2)	24 (60.0)	
Fever	9 (16.0)	4 (10.0)	
Tenesm	3 (5.3)	13 (32.5)	
Subocclusion	10 (17.8)	1 (2.5)	
Extra-intestinal manifestations, n (%)			0.54
osteoarthricular	17 (30.3)	15 (37.5)	
Pulmonary	7 (12.5)	4 (10.0)	
Dermatological	3 (5.3)	6 (15.0)	
Eyes	2 (3.6)	3 (7.5)	
Colangio-hepatics	1 (1.8)	3 (7.5)	
Complications, n (%)			< 0.001
Fistula	24 (42.8)	0 (0.0)	
Obstruction	22 (39.3)	0 (0.0)	
Clinic intratable	2 (3.6)	4 (10.0)	
Perforation	5 (8.9)	0 (0.0)	
Abscess	2 (3.6)	1 (2.5)	
Neoplasia	0 (0.0)	1 (2.5)	
Toxic megacolon	0 (0.0)	1 (2.5)	

The data are presented as counting (percentile). P: statistic significance

**Table 3** – Comparison of colonoscopic disease and complementary exams between CD and UC patients

Variáveis	CD n = 56	UC n = 40	P
Colonoscopy disease extention, n <sup>o</sup> (%)			< 0.001
Pancolite	3 (5.3)	17 (42.5)	
Ileum	16 (28.6)	0 (0.0)	
Retossigmoid	1 (1.8)	11 (27.5)	
Right colon and ileum	11 (19.6)	0 (0.0)	
Left colon	3 (5.3)	6 (15.0)	
Surgery anatomosis	8 (14.3)	0 (0.0)	
Retum	1 (1.8)	6 (15.0)	
Perianal	2 (3.6)	0 (0.0)	
Ileum and retum	5 (8.9)	0 (0.0)	
No disease in colonoscopy	6 (10.7)	0 (0.0)	
Endoscopy, n <sup>o</sup> (%)	n = 41	n = 17	0.96
Normal	24 (58.5)	11 (64.7)	
Esofagitis	7 (17.1)	2 (11.8)	
Gastritis	5 (12.2)	2 (11.8)	
Duodenitis	5 (12.2)	2 (11.8)	
Jejuno and ileum Rx, n <sup>o</sup> (%)	n = 52	n = 15	<0.001
Normal	14 (26.9)	14 (93.3)	
Stenosis	27 (51.9)	1 (6.7)	
Edema	5 (9.6)	0 (0.0)	
Fistula	3 (5.8)	0 (0.0)	
Ulcers	3 (5.8)	0 (0.0)	
Intestinal Ecodoppler, n (%)	n = 41	n = 17	<0.001
Activity in ileum	33 (80.5)	0 (0.0)	
No activity	7 (17.1)	5 (29.4)	
Activity in left colon	0 (0.0)	7 (41.2)	
Activity in all colon	1 (2.4)	5 (29.4)	
ANCA positive, n (%)	n = 6	n = 16	
ANCA positive, n (%)	1 (16.7)	11 (68.8)	0.60
ASCA positive, n (%)	n = 6	n = 16	
ASCA positive, n (%)	4 (66.7)	16 (100)	0.60

The data are presented as counting (percentile). P: statistic significance.

**Table 4** – Comparison of genotype frequency of HLA-G 14bp polymorphism between CD, UC and control patients

<b>Genotype</b>	<b>CD n = 56</b>	<b>UC n = 40</b>	<b>Controls n = 460</b>
Hi (+14bp/+14bp)	1 (1.8)	8 (20.0)	70 (15.2)
Ht (+14bp/-14bp)	27 (48.2)	20 (50.0)	223 (48.5)
Hd (-14bp/-14bp)	28 (50.0)	12 (30.0)	167 (36.0)

The data are presented as counting (percentile). P= 0.013 (exact Fisher test)

**Table 5** – Comparison of allelic frequency of HLA-G 14bp polymorphism between CD, UC and control patients

<b>Allelic</b>	<b>CD n = 112</b>	<b>UC n = 80</b>	<b>Controles n = 920</b>
+ 14bp	29 (25.9)	36 (45.0)	363 (39.5)
- 14bp	83 (74.1)	44 (55.0)	557 (60.5)

The data are presented as counting (percentile). P= 0.01 (qui-square)