

Joana de Queirós Bouça Ribeirinho Machado dos Santos Sousa

SUSCETIBILIDADE GENÉTICA DA
DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto | 2012

Joana de Queirós Bouça Ribeirinho Machado dos Santos Sousa

SUSCETIBILIDADE GENÉTICA DA
DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Universidade Fernando Pessoa
Faculdade de Ciências da Saúde

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Porto | 2012

Joana de Queirós Bouça Ribeirinho Machado dos Santos Sousa

SUSCETIBILIDADE GENÉTICA DA DOENÇA INFLAMATÓRIA INTESTINAL

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Declaro que o presente trabalho foi realizado na íntegra por mim e que todo o material bibliográfico necessário se encontra devidamente referenciado.

(Joana de Queirós Bouça Ribeirinho Machado dos Santos Sousa)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob a orientação da Professora Doutora Amélia Assunção.

Porto | 2012

RESUMO

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) compreende duas patologias inflamatórias, crônicas e recidivantes, a colite ulcerosa (CU) e a doença de Crohn (DC).

Embora a etiologia continue por esclarecer, os resultados de estudos em modelos animais, a investigação no genoma humano e ensaios clínicos apoiam a ideia de que a CU e a DC são entidades heterogêneas, caracterizadas por defeitos genéticos que levam a uma resposta exagerada do sistema imunitário à flora comensal.

Porém, o aumento na incidência da DII nas últimas décadas não pode ser explicado por fatores genéticos mas pela existência de novos fatores ambientais que desempenham um papel chave na patogênese da DII, tais como a industrialização, hábitos alimentares e infecções prévias.

Os *genome-wide association studies* identificaram 100 genes ou *loci* genéticos de suscetibilidade para a DII, sendo alguns comuns a ambas as patologias. Estes *loci* codificam genes envolvidos num grande número de mecanismos homeostáticos, uns relacionados com a imunidade inata, como os recetores de reconhecimento padrão, a autofagia, a manutenção da integridade da barreira epitelial e a diferenciação dos linfócitos T *helper* 17 e outros relacionados com a orquestração da resposta imunitária secundária.

Apesar da extensa lista de polimorfismos identificados com risco associado à DII, o avanço do conhecimento tem-se traduzido em poucas aplicações clínicas novas. No entanto, as perspectivas futuras são o desenvolvimento de terapias cada vez mais eficazes individualmente, de acordo com o genótipo de cada paciente. Além disso, a identificação da relação genótipo-fenótipo permitirá prevenir complicações e, inclusivamente, o despoletar da doença.

ABSTRACT

Inflammatory Bowel Disease (IBD) comprises two inflammatory, chronic and relapsing pathologies, ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD). Although the etiology remains unclear, the results of studies in animal models, human genome research and clinical studies support the idea that UC and CD are heterogeneous entities, characterized by genetic defects that lead to an exacerbated immune response to commensal flora.

However, the increased incidence of IBD in recent decades cannot be explained by inheritance of genetic traits but probably by new environmental factors playing a role in the pathogenesis of IBD, like industrialization, eating habits and previous infections.

The genome-wide association studies have identified 100 genes or *loci* of susceptibility to IBD, some being common to both diseases. These loci encode genes involved in a number of homeostatic mechanisms related to innate immunity, such as pattern recognition receptors, autophagy, maintenance of epithelial barrier integrity, differentiation of T helper 17 lymphocytes and orchestration of secondary immune response.

Despite the lengthy list of identified polymorphisms with associated risk with IBD, the advancement of knowledge has resulted in few new clinical applications. However, future prospects are the development of individual-directed therapies. Moreover, the identification of the genotype-phenotype will prevent complications and even the onset of the disease.

AGRADECIMENTOS

Ao Hugo, pelo apoio incondicional e estímulo em todos os momentos, sobretudo pelo incentivo nos momentos de maior cansaço ao longo destes 5 anos

Aos meus filhos, por todas as horas de felicidade que me proporcionam e por todas as horas de felicidade que as Ciências Farmacêuticas lhes tiraram

Aos meus Pais, pela oportunidade de vida, tudo mais é mera consequência

À minha mãe por tudo

Aos meus sogros pela disponibilidade, carinho e incentivo sem par

A toda a minha família e amigos por todas as vezes que estive ausente nestes 5 anos

À minha orientadora, Prof. Amélia Assunção, pela sabedoria e disponibilidade dedicados à orientação deste trabalho e sobretudo pela força nas alturas de desânimo

Ao Grande Arquiteto do Universo que tornou tudo isto possível.

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1. Objeto do trabalho.....	1
2. Objetivo do trabalho	2
3. Metodologia	2
4. Estrutura da monografia	2
II. DESENVOLVIMENTO	4
1. Caracterização clínico-patológica da Doença Inflamatória Intestinal.....	4
i. Colite ulcerosa.....	4
ii. Doença de Crohn	10
2. Epidemiologia	17
3. Imunidade inata e adaptativa na DII.....	19
4. Alterações genéticas na DII	21
i. Imunidade Inata	24
a. Recetores de reconhecimento padrão	24
1. NOD2/CARD15.....	24
b. TLR.....	27
ii. Manutenção da integridade da barreira epitelial	29
a. TCF-4.....	31
b. PPAR- γ	32
c. Hath1, KLF4 e mucinas.....	32

d.	ECM1	34
e.	HNF4A.....	35
f.	CDH1	36
g.	LAMB1	37
h.	GNA12	38
iii.	Autofagia.....	39
a.	ATG16L1 e ATG5.....	39
b.	IRGM	41
5.	Imunidade Adaptativa.....	41
i.	Via de sinalização da IL-23 na diferenciação dos linfócitos Th17.....	41
a.	IL-23R.....	43
b.	JAK2 e STAT3	44
c.	CCR6.....	45
d.	ICOSLG.....	46
e.	TYK2.....	47
ii.	Orquestração da resposta imune secundária	48
a.	IL-10 e IL10R	48
b.	IL12B.....	50
c.	Região HLA.....	51
1.	TNF	53
2.	MIC	54
3.	HSP	54

III. CONCLUSÃO.....	55
IV. BIBLIOGRAFIA	57
V. ANEXOS	72
1. ANEXO I	72

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MUTAÇÃO <i>FRAMESHIFT</i>	25
FIGURA 2. MUTAÇÃO <i>MISSENSE</i>	26
FIGURA 3. BARREIRA INTESTINAL INTACTA EM INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS.....	30
FIGURA 4. DEFEITOS NA BARREIRA INTESTINAL INATA NA DC	31
FIGURA 5. DEFEITOS NA BARREIRA INTESTINAL INATA NA CU	33
FIGURA 6. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA ESTRUTURA DO COMPLEXO IL23/IL23R	42
FIGURA 7. MUTAÇÃO <i>NONSENSE</i>	49

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA I. ÍNDICE DE ATIVIDADE DA COLITE ULCEROSA DE MONTREAL	9
TABELA II. CLASSIFICAÇÃO DE MONTREAL DA DOENÇA DE CROHN	14
TABELA III. COLITE ULCEROSA <i>VERSUS</i> DOENÇA DE CROHN	15

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A

AICE – *Escherichia coli* aderente-invasiva

AINEs – anti-inflamatórios não esteroides

APC – células apresentadoras de antígenos

ASCA – anti-corpos anti-*Saccharomyces cerevisiae*

C

CARD15 – *caspase recruitment domain-containing protein 15*

CCR6 – recetor tipo 6 ligado às quimiocinas CC

CDAI – *Crohn's disease activity index*

CI – colite indeterminada

CJA – complexo de junção apical

CU – colite ulcerosa

D

DC – Doença de Crohn

DII – Doença Inflamatória Intestinal

DNA – ácido desoxirribonucleico

E

ECCO – *European Crohn's and Colitis Organization*

F

FC – frequência cardíaca

G

GWAS – *genome-wide association studies*

H

HLA – *human leukocyte antigen*

HSP – *heat shock proteins*

I

ICOSL – ligando inductor e co-estimulador das células T

IFN- γ – interferão- γ

Ig – imunoglobulina

IHB – Índice de Harvey-Bradshaw

IL – interleucina

J

JAK2 – janus quinase 2

L

LD – *linkage disequilibrium*

LPS – lipopolissacarídeos

LRR – região rica em repetições de leucina

M

MDP – muramil dipeptídeo

MEI – manifestações extra-intestinais

mi-RNA – micro RNA

MHC – complexo major de histocompatibilidade

N

NBD – domínio de ligação a nucleótido

NF- κ B – fator nuclear κ B

NK – *natural killer*

NOD – *nucleotide binding oligomerization domain*

P

p-ANCA – anticorpos anti-citoplasma perinuclear dos neutrófilos

PAMPs – padrões moleculares associados a patogénios

PPAR- γ – recetor proliferador-activador de peroxissomas γ

PRR – recetores de reconhecimento padrão

R

RMN – ressonância magnética nuclear

rs – *reference SNP*

S

SNP – *single nucleotide polymorphism*

SNPs – *single nucleotide polymorphisms*

STAT3 – transdutor de sinal e ativador da transcrição 3

T

TAC – tomografia computadorizada

TGF- β – fator transformador de crescimento- β

Th – *T helper*

TIRAP – *TIR domain containing adapter protein*

TJ – *tight junctions*

TLR – recetores Tool-like

TNF- α – fator de necrose tumoral- α

Tpt – temperatura

Tr – células T reguladoras

TYK2 – tirosina quinase 2

U

UTR – untranslated region

V

VS – velocidade de sedimentação

W

Wt – *wild type*

I. INTRODUÇÃO

1. Objeto do trabalho

A Doença Inflamatória Intestinal (DII) é uma entidade patológica que compreende dois tipos de desordens intestinais inflamatórias, crônicas e recidivantes, a doença de Crohn (DC) e a colite ulcerosa (CU).

A CU é a forma de DII mais comum e, ao contrário da DC, restringe-se à mucosa intestinal pelo que é menos suscetível a complicações e muitos indivíduos apresentam um curso da doença moderado (Danese and Fiocchi, 2011). A DC apresenta uma inflamação transmural, descontínua, que pode afetar qualquer parte do trato gastrointestinal (Van Limbergen et al., 2009).

Desde a Segunda Guerra Mundial tem-se assistido ao aumento da incidência de doenças inflamatórias crônicas, como a DII, o que parece estar associado a um padrão geográfico de industrialização e urbanização. A genética por si só não pode aumentar a prevalência em termos temporais mas evidências epidemiológicas apoiam a combinação do ambiente com fatores de risco genéticos (Renz et al., 2011).

Embora a etiologia precisa continue por esclarecer, segundo a teoria vigente na comunidade científica, a DII desenvolve-se em indivíduos geneticamente suscetíveis, devido à influência de fatores ambientais, que condicionam uma resposta inflamatória inapropriada e exagerada aos antígenos pelo sistema imunitário, a qual se traduz em dano tecidual (Nunes et al., 2011).

Os *genome-wide association studies* (GWAS) já identificaram 100 genes ou *loci* de suscetibilidade para a DII. Apesar deste grande avanço no conhecimento continuam por esclarecer a maior parte das variantes causais e o seu mecanismo biológico de ação. O conhecimento dessas variantes que predispõe para a doença, bem como as interações com gatilhos ambientais vai potencializar a aplicação clínica da genética da DII (Lee, 2011).

Na verdade, apesar da extensa lista de polimorfismos identificados com risco associado à DII, muitos dos clínicos poderão questionar-se acerca do impacto dessas investigações

na sua prática diária, uma vez que o avanço do conhecimento tem-se traduzido em poucas aplicações clínicas novas (Lee, 2011).

Assim, o objetivo da identificação dos *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) é que a farmacogenómica consiga desenvolver terapias cada vez mais eficazes de acordo com o genótipo de cada paciente. Além disso, a identificação da relação genótipo-fenótipo será uma ferramenta útil na atuação precoce e prevenção das complicações e, inclusivamente, do desenvolvimento da doença (Neuman and Nanau, 2012).

2. Objetivo do trabalho

Pretende-se com este trabalho elaborar uma monografia que reflita o conhecimento atual acerca da suscetibilidade genética da DII.

3. Metodologia

A metodologia utilizada consiste na revisão bibliográfica de bases de dados de artigos científicos publicados sobretudo em revistas internacionais tal como a *Pubmed*, *Elservier*, *Scopus*, *B-on*, *ScienceDirect*, entre outras. Uma ferramenta fundamental para a realização deste trabalho foi o programa *Endnote* para a execução da bibliografia.

4. Estrutura da monografia

Com o intuito de cumprir os objetivos propostos este trabalho foi dividido em três partes: introdução, desenvolvimento e conclusão.

Na introdução são apresentados os objetivos do trabalho, os métodos e técnicas utilizadas e os resultados do trabalho.

O desenvolvimento é uma revisão bibliográfica onde se faz a caracterização clínico-patológica da CU e da DC; segue-se uma breve abordagem à epidemiologia e imunidade da DII até se entrar no âmago do tema deste trabalho, as alterações genéticas. Uma vez que não era concebível no espaço disponível a apresentação de cada um dos 100 genes ou *loci* de suscetibilidade identificados, foram desenvolvidos aqueles que segundo alguns artigos recentes de revisão teriam maior relevância, estando agrupados consoante se relacionam com a imunidade inata, como os recetores de reconhecimento

padrão, a autofagia, a manutenção da integridade da barreira epitelial e a diferenciação dos linfócitos Th17 ou com a orquestração da resposta imunitária secundária.

A última parte do trabalho é a conclusão onde se discutem os principais dados bibliográficos recolhidos bem como as limitações atuais associadas ao tema, terminando com as perspetivas futuras.

II. DESENVOLVIMENTO

1. Caracterização clínico-patológica da Doença Inflamatória Intestinal

A DC e a CU são doenças que afetam o trato gastrointestinal e são coletivamente conhecidas como DII.

A CU foi descrita pela primeira vez em meados do século XIX, enquanto que a DC foi relatada pela primeira vez em 1932 como “ileíte regional”. Embora sejam entidades fisiopatológicas distintas, foram incluídas na definição de DII, uma vez que a DC pode envolver o cólon e partilha várias manifestações clínicas com a CU (Danese and Fiocchi, 2011). A DC e a CU são as formas major da DII e a colite indeterminada (CI), partilha características quer de DC, quer de CU (Danese and Fiocchi, 2011).

i. Colite ulcerosa

Segundo o Consenso Europeu baseado na evidência para o diagnóstico e manutenção da colite ulcerosa da *European Crohn's and Colitis Organization* (ECCO), esta é definida como uma doença crónica inflamatória, remitente e recidivante, que apresenta inflamação contínua, concêntrica e confluyente da mucosa do cólon, com ausência de granulomas nas biopsias, afetando o reto e uma extensão variável do cólon em continuidade (Stange et al., 2008).

A doença afeta igualmente ambos os sexos (Stange et al., 2008) e apresenta-se geralmente na adolescência tardia ou no início da idade adulta, embora nalgumas populações se tenham registado picos de incidência após os 50 anos (Loftus, 2004). A idade de início da doença não é relevante uma vez que não afeta a gestão da doença, pois as terapias apresentam igual eficácia em crianças e adultos (Stange et al., 2008). Porém, outros autores referem que a CU é mais grave nas crianças, uma vez que estas, mais frequentemente, apresentam crises refratárias à medicação (Turner et al., 2008).

O início da doença geralmente é gradual (Danese and Fiocchi, 2011) com sintomas presentes durante semanas e, por vezes, meses sem que o doente recorra ao médico (Stange et al., 2008). No entanto, 15% dos doentes têm sintomas iniciais insidiosos, apresentando crises severas com sintomas generalizados (Stange et al., 2008).

Este quadro heterogêneo exige uma colheita de informação completa por parte do médico a fim de estabelecer o diagnóstico correto. Assim, a anamnese deve incluir início e caracterização dos sintomas, hábitos e intolerâncias alimentares, doenças infecciosas entéricas, medicação (nomeadamente antibioterapia e anti-inflamatórios não esteróides (AINEs)), tabaco, práticas sexuais, história familiar de DII, apendicectomia e viagens recentes .

É fundamental questionar os fatores de risco que já estão comprovadamente relacionados com CU, como o tabaco, que é um fator protetor no desenvolvimento da CU e associado a doença ligeira, (Hoie et al., 2007, Mahid et al., 2006), ao passo que ex-fumadores têm 70% maior risco de contrair a doença (Beaugerie et al., 2001, Birrenbach and Bocker, 2004); o uso de anti-inflamatórios não seletivos pode levar à exacerbação da doença (Reinisch et al., 2003, Sandborn et al., 2006); história de apendicectomia antes do início dos sintomas de CU é um fator protetor quando realizada em indivíduos jovens, em contexto de inflamação do apêndice e reduz o risco de CU em 69% (Cosnes et al., 2002a, Frisch et al., 2001, Koutroubakis et al., 2002, Loftus, 2004, Radford-Smith et al., 2002, Rutgeerts et al., 1994). Relativamente à história familiar da doença, o risco de um familiar em primeiro grau de um doente com CU contrair a doença é de 5%, o que significa que tem 95% de hipóteses de não a contrair (Vermeire, 2006).

Os sintomas manifestados dependem do local do trato gastrointestinal afetado. Assim, quando só há atingimento do reto o doente apresenta urgência fecal, sangramento retal e, paradoxalmente, episódios de obstipação (Danese and Fiocchi, 2011). Quando a doença se estende ao cólon ou, inclusivamente, ao cego o doente refere diarreia, dejeções frequentes com sangue e muco, urgência fecal e tenesmo, dor abdominal, febre, mal-estar e perda de peso, dependendo da severidade da doença (Stange et al., 2008). Os sintomas expressos também dependem das manifestações extra-intestinais (MEI), que estão presentes em 31% dos doentes (Vavricka et al., 2011), as quais podem atingir articulações, pele, fígado, olhos, boca e mecanismos da coagulação (Danese and Fiocchi, 2011).

Ainda não existe um *single gold standard* para o diagnóstico de CU, pelo que releva a combinação da história médica com a avaliação clínica, achados endoscópicos, histológicos e procedimentos laboratoriais (Stange et al., 2008). Estes instrumentos são

úteis no diagnóstico diferencial, nomeadamente com a DC, tendo em conta que 10% dos doentes, nos primeiros 5 anos após o diagnóstico de CU, vêem o seu diagnóstico mudar para DC ou deixar de ser uma DII (Stange et al., 2008). Aliás, outros autores referem que, após 25 anos da doença, o diagnóstico de 5 a 10% dos doentes muda de CU para DC (Langholz et al., 1994). 10% dos doentes apresentam uma entidade diferente, diagnosticada como CI, a qual tem características quer de DC, quer de CU (Danese and Fiocchi, 2011).

O estudo genético não é aconselhado como forma de diagnóstico, uma vez que a CU é uma doença multifactorial e as mutações genéticas para já identificadas não são suficientes para causar a doença, nem a sua ausência é suficiente para proteger da doença (Stange et al., 2008).

Relativamente aos procedimentos recomendados para estabelecer o diagnóstico, é fundamental realizar uma colonoscopia, preferencialmente com ileoscopia e com biopsias segmentares, incluindo do reto. Se existirem sintomas do trato gastrointestinal superior ou se o reto não for atingido deve ser feita uma esofagogastroduodenoscopia com biopsia da mucosa. Radiografia abdominal pode ajudar na confirmação da doença (Stange et al., 2008).

Não existem achados endoscópicos específicos que permitam estabelecer o diagnóstico de CU. Os mais úteis são o envolvimento colónico e retal, contínuo e confluyente, com demarcação clara entre zonas de inflamação e zonas de mucosa normal (Stange et al., 2008). Na doença ligeira a aparência endoscópica revela uma mucosa granulosa, eritematosa, friável, com perda do padrão vascular. Na CU moderada são visíveis erosões e micro ulcerações. Por sua vez, a doença severa apresenta ulcerações superficiais com sangramento espontâneo (Danese and Fiocchi, 2011). Embora sejam mais comuns as ulcerações superficiais, podem ser observadas ulcerações profundas nos casos de doença severa. Por vezes a CU pode manifestar-se com lesões perianais penetrantes e envolvimento do intestino delgado mimetizando a DC (Cosnes et al., 2011). Pode ocorrer displasia em qualquer fase da CU sem estar associada a malignidade, mas exige uma vigilância mais apertada do doente (Danese and Fiocchi, 2011).

A análise histológica é útil para diagnóstico, avaliação da atividade da doença e identificação de neoplasia ou displasia. Os achados microscópicos ou histológicos mais comuns incluem alterações arquiteturais, alterações epiteliais, e achados inflamatórios (Stange et al., 2008).

De entre as alterações arquiteturais pode observar-se distorção, ramificação, atrofia e irregularidade superficial das criptas (Stange et al., 2008).

Relativamente às alterações epiteliais pode ocorrer diminuição das células caliciformes ou depleção da mucina nessas células, o que é útil no diagnóstico de doença ativa e ajuda a distinguir da DC, na qual há preservação das mucinas. As aberrações epiteliais também podem ser manifestadas em metaplasia das células de Paneth, as quais, em circunstâncias normais, raramente se encontram no cólon, pelo que este achado não sendo específico para a CU ajuda a confirmar o diagnóstico na doença já estabelecida, uma vez que não é visualizado nas biopsias iniciais (Stange et al., 2008).

Quanto aos achados inflamatórios pode ocorrer aumento da celularidade da lâmina própria, plasmocitose basal (número aumentado de plasmócitos), agregados linfóides basais e eosinofilia (aumento de eosinófilos) da lâmina própria, cada um com diferente valor de diagnóstico. O aumento da celularidade da lâmina própria é típico nas inflamações coloreticais. Na CU, quando existe infiltrado, este é difuso e transmucosal.

O consenso da ECCO estabeleceu que devem estar presentes 2 ou 3 destes critérios, na ausência de verdadeiros granulomas (típico da DC), para que se possa estabelecer o diagnóstico de CU: plasmocitose basal, aumento da celularidade transmucosal da lâmina própria, distorção severa da arquitectura e diminuição da densidade das criptas (Nikolaus and Schreiber, 2007, Stange et al., 2008).

A plasmocitose basal, observada em 38-100% dos doentes adultos e 58% das crianças, é o melhor critério de diagnóstico, uma vez que muitas vezes é a primeira lesão a aparecer, sendo um bom marcador preditivo (Bentley et al., 2002, Nostrant et al., 1987, Robert et al., 2004, Schumacher et al., 1994, Washington et al., 2002).

O aumento da celularidade da lâmina própria pode estar ausente nas crianças (<12 anos) e desaparece com o tratamento, pelo que só é usado como critério de diagnóstico na doença estabelecida e a sua ausência não exclui a doença (Stange et al., 2008).

Quanto à distorção da arquitetura das criptas, segundo alguns autores, só é observada 16 a 30 dias após o início dos sintomas, pelo que está ausente nas biopsias iniciais (Schumacher et al., 1994).

Assim, no início da doença podem não estar presentes achados histológicos característicos, sendo observados apenas quando a doença já está estabelecida (Stange et al., 2008). A severidade da inflamação no exame histológico pode não se repercutir no exame endoscópico, pelo que é possível coexistir doença quiescente em termos endoscópicos e histologia de doença severa (Danese and Fiocchi, 2011). Por isso, segundo alguns autores, o diagnóstico de CU só deve ser considerado estabelecido através de critérios endoscópicos e histológicos e na ausência de critérios endoscópicos deve ser considerado provável (Lennard-Jones and Shivananda, 1997).

As tentativas de classificar a CU são várias e têm como objetivo a uniformização na avaliação e abordagem à doença. A classificação do grupo de trabalho de Montreal é a mais utilizada em contexto clínico, uma vez que é baseada nos critérios endoscópicos da extensão da doença, pelo que é uma ferramenta que influencia a gestão da doença e a escolha do tratamento. A CU é então classificada em proctite, na qual apenas está envolvido o reto; colite distal ou colite esquerda, em que a doença se estende para além do reto mas não ultrapassa o ângulo esplénico do cólon; e pancolite ou colite extensa, quando se estende para além do ângulo esplénico do cólon, podendo atingir o cego (Silverberg et al., 2005). Aquando dos primeiros sintomas, num terço dos casos a doença está limitado ao reto, um terço tem apresentação colorretal distal do ângulo esplénico e no outro terço é proximal ao ângulo esplénico (Moum et al., 1999). 25% dos doentes apresentam pancolite (Cosnes et al., 2011). Nos adultos o reto está sempre envolvido, mesmo que seja apenas em termos histológicos (Joo and Odze, 2010), enquanto que as crianças nem sempre apresentam lesões no reto (Bousvaros et al., 2007).

O grupo de Montreal propôs um índice de atividade da CU, que é uma escala clínico-laboratorial, adaptada do índice de Truelove-Witts e da classificação do Colégio Americano de Gastroenterologia. Neste índice a CU é dividida em 4 categorias de atividade/gravidade da doença (Tabela I).

Quanto à progressão da doença existem 4 padrões principais de evolução: declínio da intensidade dos sintomas após os primeiros episódios; padrão fulminante com intensidade aumentada; sintomas crônicos contínuos (5% segundo Stange, 2008) e exacerbação intermitente dos sintomas (80%) (Henriksen et al., 2006, Langholz et al., 1994, Selby, 1997).

Tabela I. Índice de Atividade da Colite Ulcerosa de Montreal

Gravidade	Definição
S0 Remissão	Assintomático
S1 Crise Ligeira	≤4 dejeções diárias, com ou sem sangue, sinais e sintomas sistêmicos ausentes VS normal
S2 Crise Moderada	> 4 dejeções diárias sintomas mínimos de toxicidade sistémica
S3 Crise grave	≥6 dejeções diárias com sangue FC > 90 bpm Tpt > 37,5°C Hemoglobina < 10,5g/dl VS > 30 mm/h

Adaptado de Silverberg et al., 2005

Relativamente às principais complicações da CU destacam-se hemorragia grave e megacólon tóxico, que podem ocorrer em doentes com inflamação severa e extensa, refratária à terapêutica. Durante a fase crónica da doença pode também emergir carcinoma colorretal (Danese and Fiocchi, 2011).

A probabilidade de colectomia num doente com CU é de 10-30%, sendo a severidade dos sintomas aquando do diagnóstico a melhor forma de predizer essa abordagem (Cosnes et al., 2011). Segundo alguns estudos a probabilidade de cirurgia é mais alta no primeiro ano após o diagnóstico (Langholz et al., 1994). No entanto, estudos mais recentes apontam para uma baixa taxa de colectomia na primeira década após o diagnóstico (Solberg et al., 2009).

É mais difícil determinar o prognóstico de um doente com CU do que com DC, uma vez que, o curso da doença é mais variável e a cirurgia também não é vista como tratamento definitivo (Cosnes et al., 2011).

ii. Doença de Crohn

A DC é uma patologia crónica, que atinge qualquer parte do trato digestivo, desde a boca até ao ânus e região perianal, com envolvimento focal ou transmural, sendo mais comum a doença ileal e/ou colónica. Pode apresentar várias MEI, bem como granulomas (Van Assche et al., 2010). O atingimento do trato gastrointestinal superior verifica-se em 10-15% dos doentes (Cosnes et al., 2011) e as lesões perianais estão presentes em 20-30% dos casos, 15-20% dos quais com fistulas (Cosnes et al., 2011, Thia et al., 2008, Vermeire et al., 2007a, Vermeire et al., 2007b), correspondendo a 50% o risco cumulativo de envolvimento perianal, ao longo do curso da doença (Cosnes, 2008, Cosnes et al., 2011, Schwartz et al., 2001).

A DC manifesta-se mais frequentemente na adolescência tardia ou no início da idade adulta, sendo igualmente distribuída por ambos os sexos (Loftus, 2004).

As manifestações clínicas são várias e dependem de inúmeros fatores, nomeadamente, da localização (trato digestivo alto, íleo, íleo e cólon e cólon com ou sem atingimento retal, região perianal), do comportamento (estenosante, perfurante, não estenosante e não perfurante), da severidade, da idade de início da doença (criança, adulto), da presença de MEI e da medicação (Ministro, 2008, Van Assche et al., 2010).

A heterogeneidade de manifestações exige uma completa anamnese, que deve incluir vários itens, entre os quais, a data de início dos sintomas, a evolução da doença, a existência de patologia infecciosa, a história medicamentosa (antibioterapia e uso de AINEs), o padrão alimentar e eventuais intolerâncias alimentares, co-morbilidades, comportamentos aditivos, viagens recentes e história de apendicectomia (Ministro, 2008, Van Assche et al., 2010). Tem particular interesse averiguar os fatores de risco já comprovados, nomeadamente tabaco, história familiar de DC e gastroenterite infecciosa recente (Van Assche et al., 2010).

De entre as manifestações clínicas mais comuns, a mais valorizada é a diarreia crónica (mais de 6 semanas), seguida de dor abdominal e sintomas constitucionais como

emagrecimento e astenia (sinais de malnutrição e mal absorção), mal-estar geral e febre (Ministro, 2008, Van Assche et al., 2010). A apresentação aguda da DC pode ocorrer, especialmente na doença aguda do íleo terminal, a qual pode ser confundida com apendicite aguda (Van Assche et al., 2010).

Relativamente às MEI podem ocorrer na pele, mucosas, serosas, olhos, articulações, fígado, vias biliares, pâncreas e rins, sendo observadas em 30% dos doentes, precedendo ou não as manifestações gastrointestinais (Su et al., 2002). De ressaltar que as MEI são comuns à CU, pelo que não permitem *per si* o diagnóstico de DC (Ministro, 2008).

O diagnóstico diferencial deve ser feito com outras doenças do trato digestivo, nomeadamente, infeções, doença inflamatória granulomatosa ou não, tumores e doenças sistémicas com manifestações gastrointestinais (Ministro, 2008). O diagnóstico diferencial deve ser feito com especial cuidado na distinção entre CD e CU, uma vez que 5% dos doentes vê o seu diagnóstico mudar de DC para CU (Stange et al., 2008).

Uma vez que ainda não existe um *single gold standard* para o diagnóstico de DC, este inclui um conjunto de passos, desde a avaliação clínica, combinada com endoscopia e exames histológicos, radiológicos e bioquímicos. Existem, no entanto, alguns critérios de exclusão à partida, definidos por Lennard-Jones (1997), entre os quais, a presença de infeção, isquemia, irradiação e neoplasia. Como critérios de inclusão definiu a localização da boca ao ânus, ser um processo inflamatório descontínuo, transmural, com fibrose, agregados linfóides, atividade mucipara presente e granulomas (Lennard-Jones and Shivananda, 1997).

A importância de exames endoscópicos prende-se com o facto de serem extremamente úteis para confirmação do diagnóstico mas também para caraterizar lesões, avaliar a extensão da doença, obter amostras para histologia, microbiologia e parasitologia, entre outras. Assim, uma ileocolonosopia é um exame fundamental para o diagnóstico, ao passo que uma endoscopia digestiva alta só fará sentido se existirem sintomas do trato digestivo superior (Van Assche et al., 2010).

O Consenso da ECCO, em 2006, estabeleceu como critérios macroscópicos (endoscópicos) para diagnóstico da DC, o padrão de envolvimento descontínuo, erosões

aftóides, úlceras serpiginosas, estenoses, orifícios fistulosos, empedrado, cicatrizes, áreas de mucosa com padrão vascular submucoso preservado, estando o reto tipicamente não afetado. Definiram ainda que devem ser realizadas biopsias de 5 segmentos, incluindo o íleo e o reto, com um mínimo de duas colheitas em cada segmento, com a exceção da colite fulminante em que se fazem apenas duas colheitas num segmento, por razões de segurança (Van Assche et al., 2010)

O mesmo consenso estabeleceu que o diagnóstico histopatológico da DC (critérios histológicos ou microscópicos) inclua a presença de granulomas epitelióides (agregados de células histiocitárias como monócitos e macrófagos) na ausência de infecções e um dos seguintes critérios: alteração focal (segmentar ou descontínua) da arquitetura das criptas (definidas como distorção, ramificação ou encurtamento, que podem atingir mais de 10% das criptas nas zonas com processo inflamatório focal ou segmentar), inflamação crônica focal ou em placa (sendo crônico definido pela presença de linfócitos e plasmócitos), preservação da atividade mucípara (quantidade de muco e de mucinas) nos locais de doença ativa. Na ausência de granulomas são necessários os três critérios para estabelecer o diagnóstico. Podem referir-se ainda como critérios microscópicos, a preservação da atividade mucípara nas zonas inflamatórias, erosões ou fístulas, aumento dos linfócitos intra-epiteliais e inflamação transmucosa. Quanto ao íleo verificou-se, além de todas estas alterações referidas, uma mudança na arquitetura vilositária. Estes critérios são adotados para peças operatórias ou para colheitas de biopsias. A histologia é frequentemente usada para o diagnóstico de CU e de DC. A ausência da inflamação da mucosa indica remissão na CU, ao contrário da DC, pois devido ao seu carácter descontínuo pode não haver inflamação no segmento biopsado mas a doença estar presente noutros segmentados que escaparam à biopsia (Van Assche et al., 2010).

A imagiologia (exames contrastados de radiologia convencional, tomografia computadorizada (TAC) ou ressonância magnética nuclear (RMN)) pode complementar a endoscopia em estenoses intransponíveis (estreitamentos que não permitam a passagem do endoscópio), na doença perfurante e sempre que se traduza em massas, abscessos ou fístulas e aglomerados inflamatórios (Van Assche et al., 2010).

Assim, o diagnóstico de DC engloba um conjunto de exames complementares que traduzem a heterogeneidade e complexidade que o fenótipo pode assumir.

Foram várias as tentativas de classificar a DC a fim de uniformizar a avaliação e atuação dos clínicos perante esta patologia. Foi classificada quanto ao fenótipo pela classificação de Roma e, posteriormente, pela de Viena. Em 2005, em Montreal, foi revista a classificação de Viena, adotando o nome de Classificação de Montreal, a qual se mantém atual (Tabela II). A DC também é classificada quanto à atividade da doença pelo Crohn's Disease Activity Index (CDAI), entre outros, e quanto à resposta à terapêutica (esteróide dependente ou esteróide resistente) (Van Assche et al., 2010).

Determinou-se que a localização da doença corresponde à máxima extensão da mesma antes da primeira ressecção intestinal (Silverberg, 2005). A necessidade de estabelecer este critério expressa o facto de que, após a cirurgia, podem aparecer lesões em áreas anteriormente ilesas (Ministro, 2008). Alguns estudos referem que dos pacientes com doença ileal, <20% desenvolve lesões colónicas dez anos após o diagnóstico (Peschard et al., 1998) e em <20% a doença estende-se para o intestino delgado (Hamon et al., 1993). No entanto, atualmente acredita-se que em pacientes adultos, a localização da doença (L) permanece estável após o diagnóstico, enquanto que o comportamento do fenótipo (B) muda ao longo do tempo, progredindo de não-penetrante e não-estenosante para penetrante (aparecimento de fístulas) e estenosante (Cosnes et al., 2002b, Louis et al., 2001). Inclusivamente pode coexistir o padrão estenosante e o penetrante no mesmo indivíduo e também no mesmo segmento intestinal (Cosnes et al., 2011).

Quanto à atividade da doença, o Crohn's Disease Activity Index (CDAI) é considerado o *gold standard* para a avaliação da atividade da doença e é a principal ferramenta para aferir a eficácia da terapêutica. A análise de oito variáveis (número de dejeções líquidas, severidade da dor abdominal, bem-estar geral, MEI, necessidade de fármacos antidiarreicos, presença de massas abdominais, hematócrito, perda de peso) permite obter um *score* que classifica o tipo de atividade que a doença de um certo indivíduo apresenta. Os investigadores designaram que o doente se encontra em remissão quando apresenta um *score* abaixo de 150, doença ligeiramente ativa tem um *score* entre 150-219, moderadamente ativa corresponde a 220-450, acima do qual se considera doença com atividade grave (Ministro, 2008, Sandborn et al., 2002).

O Índice de Harvey-Bradshaw (IHB), ou “índice simplificado” é, na verdade, uma simplificação ao CDAI, sendo facilmente aplicável na clínica, uma vez que tem menos variáveis, apenas é necessária uma visita para o cálculo do *score*, e o *score* final é o

somatório das várias pontuações, ao contrário do CDAI em que vários parâmetros são colhidos durante uma semana e a pontuação final resulta da ponderação das variáveis (Ministro, 2008, Sandborn et al., 2002).

Tabela II. Classificação de Montreal da Doença de Crohn

Idade de diagnóstico (A)	A1 ≤16 anos A2 17-40 anos A3 ≥ 40 anos
Localização (L)	L1 íleo terminal L2 cólon L3 íleo e cólon L4 tubo digestivo superior
Comportamento (B)	B1 não estenosante e não penetrante B2 estenosante B3 penetrante
Modificador: localização no tubo digestivo superior (L4)	L1+L4 íleo terminal+ tubo digestivo superior L2+L4 cólon+ tubo digestivo superior L3+L4 íleo e cólon+ tubo digestivo superior
Modificador: doença perianal (p)	B1p não estenosante e não penetrante e doença perianal B2p estenosante e não penetrante e doença perianal B3p penetrante e doença perianal

Adaptado de Silverberg et al., 2005

Aquando do consenso da ECCO (2006) referiram a importância de identificar marcadores genéticos e serológicos que permitam atuação precoce e precisa da DC (Van Assche et al., 2010).

Relativamente à história da doença, esta torna-se sintomática quando as lesões são extensas ou distais e estão associadas a reações inflamatórias sistêmicas ou a estenoses, abscessos ou fístulas. No entanto, também podem desenvolver-se fístulas ou estenoses

sem nenhuns sintomas durante anos (Cosnes et al., 2011). O curso da doença é, geralmente, caracterizado por episódios de agravamento dos sintomas seguidos de períodos de remissão, com duração variável, e apenas 10-15% dos doentes apresenta doença contínua e crónica (Munkholm et al., 1995). A progressão das lesões varia de semanas a meses e pode parar ou reverter, quer espontaneamente quer através da terapêutica. A doença colónica é mais sintomática e está mais relacionada com MEI do que a doença ileal, que pode permanecer latente durante vários anos (Cosnes et al., 2011).

A evolução clínica da DC passa quase inexoravelmente pela cirurgia, uma vez que 50% dos doentes são submetidos a cirurgia durante os primeiros 10 anos e 80% em diferentes períodos da doença (Carter et al., 2004). A cirurgia não é curativa, pelo que a probabilidade de recorrência é quase garantida. Aliás, menos de 5% dos doentes apresenta endoscopia normal 10 anos após a cirurgia (Cosnes et al., 2011).

Dada a grande variedade de manifestações clínicas da CU e da DC é apresentada uma tabela que procura resumir ambas as apresentações (Tabela III).

Tabela III. Colite Ulcerosa *versus* Doença de Crohn

	CU	DC
<i>Apresentação clínica</i>		
Febre	Pouco comum	Comum
Dor abdominal	Variável	Comum
Diarreia	Muito comum	Pouco comum
Sangramento retal	Muito comum	Pouco comum
Perda de peso	Pouco comum	Comum
Sinais de malnutrição	Pouco comum	Comum
Doença perianal	Ausente	Pouco comum
Massa abdominal	Ausente	Comum
Quebra do crescimento em crianças ou adolescentes	Ocasional	Comum

Localização		
Cólon	Exclusivamente	2/3 dos doentes
Íleo	Nunca	2/3 dos doentes
Jejuno	Nunca	Pouco frequente
Estômago ou duodeno	Nunca	Pouco frequente
Esófago	Nunca	Pouco frequente
Complicações intestinais		
Estenoses	Desconhecido	Comum
Fistulas	Ausente	Pouco comum
Megacólon tóxico	Desconhecido	Ausente
Perfuração	Desconhecido	Incomum
Cancro	Comum	Pouco comum
Parâmetros endoscópicos		
Friabilidade	Muito comum	Pouco comum
Úlceras aftosas e lineares	Ausente	Comum
Empedrejamento	Ausente	Comum
Pseudopólipos	Comum	Pouco comum
Envolvimento retal	Muito comum	Pouco comum
Parâmetros radiológicos		
Distribuição	Contínua	Descontínua, segmentar
Ulceração	Fina, superficial	Profunda, extensão à submucosa
Fissuras	Ausentes	Comum
Estenoses ou fistulas	Raro	Comum
Envolvimento ileal	<i>Backwash ileítis</i>	Estenosante, nodular
Parâmetros laboratoriais		
Anticorpos pANCA	70%	Ocasional
Anticorpos ASCA	Ocasional	≥ 50% dos doentes

Adaptado de Podolsky, 2002

2. Epidemiologia

A CU e a DC são consideradas doenças das sociedades modernizadas, uma vez que tem aumentado a sua frequência nos países desenvolvidos, desde meados do século XX (Danese and Fiocchi, 2011).

Apesar da escassez de dados epidemiológicos destas doenças nos países em desenvolvimento, a incidência e prevalência da DII está a aumentar nas diferentes regiões do globo, o que demonstra a sua emergência como doença global (Molodecky et al., 2012).

O estudo epidemiológico de identificação de padrões temporais e geográficos da doença é útil no esclarecimento dos fatores de risco ambientais, genéticos (variações étnicas) e no planeamento das necessidades *versus* recursos de saúde pública (Molodecky et al., 2012).

Quando a DII é identificada numa nova população, a CU precede a DC e tem uma maior incidência (Danese and Fiocchi, 2011), com algumas exceções como Canadá e Austrália. A incidência anual (número de novos casos em 100 000 habitantes) de CU na Europa varia entre 0.6 e 24.3 em 100 000 pessoas, 0.1 e 6.3 em 100 000 pessoas na Ásia e Médio Oriente, e varia entre 0 e 19.2 em 100 000 pessoas na América do Norte. Quanto à DC a incidência anual varia entre 0.3 e 12.7 em 100 000 pessoas na Europa, 0.04 e 5 em 100 000 pessoas na Ásia e Médio Oriente e entre 0 e 20.2 em 100,000 pessoas na América do Norte. A maior prevalência (número de casos existentes em 100 000 habitantes) de DII foi observada na Europa (505 em 100 000 pessoas para a CU e 322 em 100 000 pessoas para a DC) América do Norte (249 em 100 000 pessoas para a CU e 319 em 100 000 pessoas para a DC) América do Norte (Molodecky et al., 2012). Estudos focados nos padrões temporais da DII relatam um aumento da incidência em várias regiões do globo nos últimos cinquenta anos. Nos países ocidentais a incidência de CU aumentou de 8 para 14 em 100 000 pessoas, quanto à DC passou de 6 para 15 em 100 000 pessoas. Quanto à prevalência da CU e DC, em 100 000 pessoas, aumentou de 120 para 200 e de 50 para 200, respetivamente (Cosnes et al., 2011).

À medida que os países se vão tornando industrializados a incidência de CU aumenta, seguida da DC, tal como aconteceu no Japão, Singapura e Coreia do Sul. Em África,

América Central e América do Sul os dados são escassos ou não estão disponíveis (Cosnes et al., 2011). A industrialização está associada a um conjunto de potenciais fatores de risco ambientais para a DII como mudanças na exposição a microrganismos, condições sanitárias, taxas de ocupação, dieta, estilo de vida, medicação e exposição a poluentes (Berner and Kiaer, 1986, Molodecky et al., 2012).

Em termos étnicos, a DII é observada igualmente em caucasianos e não-caucasianos. Foi observada uma elevada prevalência de DII em judeus, inclusivamente em judeus emigrados para zonas de baixa prevalência da doença (Cosnes et al., 2011, Fireman et al., 1989, Gilat et al., 1987). Outro estudo relatou uma baixa incidência de DII em judeus nascidos em África, Ásia e Israel, comparando com judeus nascidos na Europa e América do Norte (Cosnes et al., 2011, Fireman et al., 1989, Shapira and Tamir, 1992). Estes dados apoiam a combinação de fatores genéticos e ambientais na génese da DII.

A CU e a DC ocorrem igualmente em ambos os sexos e a sua incidência é mais alta entre a segunda e a quarta década de vida, ou seja, afeta os indivíduos na idade mais produtiva o que se repercute em custos a longo prazo para o doente, para o sistema de saúde e para a sociedade (Molodecky et al., 2012).

Uma vez que a mortalidade na DII é baixa (Duricova et al., 2010, Molodecky et al., 2012) e a doença é geralmente diagnosticada na juventude a prevalência global tende a continuar a aumentar. O aumento da incidência verificado no século XX pode ser explicado pelos fatores ambientais mas também pela sensibilidade dos médicos e do público em geral para a DII, bem como pelos novos meios de diagnóstico disponíveis, nomeadamente a colonoscopia (Molodecky et al., 2012).

Numa abordagem farmacoepidemiológica levada a cabo em Portugal, concluiu-se que Portugal acompanha a tendência mundial em termos de crescimento de DII. A prevalência aumentou de 86 casos em 100 000 pessoas em 2003, para 146 casos em 100 000 pessoas em 2007. A prevalência de CU aumentou de 42 casos em 100 000 pessoas em 2003 para 71 em 2007. Quanto à DC a prevalência aumentou de 43 casos em 100 000 pessoas em 2003 para 73 em 2007. A incidência anual de DII é de 15 casos em 100 000, o que coincide com a média europeia (Azevedo et al., 2010).

3. Imunidade inata e adaptativa na DII

O intestino está constantemente exposto a um grande número de microrganismos. A presença destes no trato gastrointestinal apresenta vantagens e desvantagens. Por um lado ajudam a degradar os hidratos de carbono facilitando a absorção, por outro podem prejudicar o hospedeiro causando inflamação. No entanto, na maior parte dos casos, os indivíduos são resistentes à infecção graças ao sistema imunitário altamente desenvolvido, o qual é composto por dois braços, a imunidade inata e a imunidade adaptativa (Gersemann et al., 2012).

A imunidade inata é mais simples, reconhece padrões bacterianos e virais o que resulta numa resposta rápida mas limitada. A imunidade adaptativa desenvolve uma resposta altamente específica, requer mais tempo mas proporciona memória imunológica. Ambas desempenham papéis chave e interligados na patogénese da DII (Siegmund and Zeitz, 2011).

No intestino, a imunidade inata inclui a barreira epitelial e as células fagocitárias da lâmina própria, como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Os linfócitos T representam a população celular chave da imunidade adaptativa. Quando ativados secretam citocinas, afetando todos os tipos celulares no local, como macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, células endoteliais e elementos do estroma (Siegmund and Zeitz, 2011).

Quando os antígenos atingem a lâmina própria ativam a imunidade inata, primeiro via recetores de reconhecimento padrão (PRR) e depois via células apresentadoras de antígenos (APC), o que resulta na resposta efetora das células T (Siegmund and Zeitz, 2011).

Vários estudos demonstraram que as subpopulações de células T ativadas de forma anormal na CU e na DC são diferentes. A resposta mediada pelas células T helper-1 (Th1) surge no contexto de apresentação de um patógeno intracelular pelas células apresentadoras de antígenos (APC) na presença de interleucina (IL) IL-12. O sistema imunitário pode, então, localizar o agente infeccioso e secretar fatores que promovam a apoptose (como o interferão- γ (IFN- γ) ou o fator de necrose tumoral- α (TNF- α)) ou

induzam a diferenciação de linfócitos T citotóxicos. A característica da resposta Th1 é o granuloma (Kobayashi et al., 2001, Siegmund and Zeitz, 2011).

As células Th17 foram as mais recentemente identificadas, produzem IL-17 e IL-22, ambas citocinas pró-inflamatórias capazes de promover a destruição local dos tecidos. As Th17 são ativadas pela combinação da IL-6 com o fator transformador de crescimento- β (TGF- β) e são induzidas pela IL-23 a diferenciarem-se em células maduras produtoras de IL-17. A IL-22 e IL-17 encontram-se elevadas na mucosa inflamada na DC (Siegmund and Zeitz, 2011, Zhou et al., 2007).

Outro subgrupo de células Th são as Th2, que secretam a IL-4, IL-5 e IL-13 e promovem a atopia através da indução de imunoglobulina (Ig) IgE, eosinófilos e mastócitos. Até há pouco tempo pensava-se que a CU era mediada pelas células Th2, no entanto, a ausência de IL-4 nas amostras colônicas de doentes com CU e os níveis aumentados de IL-13 e IFN- γ na mucosa da CU alteraram esse paradigma. Pensa-se que a IL-13 é induzida pelas células T *natural killer* (NK) e tem como alvo as células epiteliais que se tornam disfuncionais. O que está de acordo com o fato da CU ser uma doença mais superficial que a DC (Fuss et al., 2004, Heller et al., 2005, Siegmund and Zeitz, 2011).

Uma população celular especialmente importante para a defesa imunológica do intestino é a das células T reguladoras (Tr), uma vez que, ao contrário da imunidade sistêmica, é fundamental manter a supressão imunológica da mucosa intestinal. As células Tr1 secretam IL-10, que é uma citocina anti-inflamatória. Outra citocina imunossupressora, TGF- β , é produzida pelas células Th3, promove a produção de IgA e suprime a ativação das células T e B (Coffman et al., 2009, Cong et al., 2002, Siegmund and Zeitz, 2011). Para além destas populações, também são importantes as células Treg CD4⁺ CD25⁺, que requerem o fator de transcrição FoxP3 (Siegmund and Zeitz, 2011).

A lâmina própria intestinal é o local do organismo com maior proporção de células CD4⁺ Tr devido à manutenção de antígenos provenientes da alimentação e da flora comensal. Sabe-se que a diminuição de células Tr conduz à DII, no entanto, desconhece-se se a sobreabundância das células T ativadas se deve a um menor número de células Tr, ou a defeitos na sua função, ou resistência das células T ativadas à supressão, ou à combinação das várias hipóteses. Alguns autores observaram que o

número de células Tr na mucosa inflamada da DII é semelhante aos controlos pelo que defendem que o defeito está na função e não no número. Outros estudos apontam para uma função menos eficaz das células Tr na DII uma vez que sofrem apoptose mais rapidamente que as Tr de tecidos não-inflamados (Himmel et al., 2012).

Devido à grande capacidade de supressão de antígenos das células Tr, são candidatas promissoras para imunoterapia, a fim de substituir os fármacos imunossupressivos, frequentemente ineficazes e com risco associado de cancro e infeções. Em modelos murinos a utilização de células Tr não só preveniu como curou a DII (Himmel et al., 2012, Mottet et al., 2003).

4. Alterações genéticas na DII

A etiologia da DII continua por esclarecer, embora muitos estudos apontem para uma interação deficiente entre a flora comensal intestinal, normalmente em estado simbiótico com o sistema imune do hospedeiro (Baumgart and Sandborn, 2012), em indivíduos geneticamente suscetíveis expostos a diferentes fatores ambientais (Siegmund and Zeitz, 2011, Van Limbergen et al., 2009). O envolvimento de bactérias endógenas e patogénicas na génese da DII não está completamente esclarecido mas é apoiado por experiências em modelos murinos, nos quais ratinhos suscetíveis mantidos em ambientes livres de germes não desenvolvem colite espontânea (De Jager et al., 2007). Os microrganismos mais frequentemente associados à patogénese da DII são o *Mycobacterium avium* subespécie *paratuberculosis* e a *Escherichia coli* aderente-invasiva (Sartor, 2006).

Estudos epidemiológicos revelaram fortes influências ambientais na DII, tal como demonstrado pela relativamente baixa concordância da DII em gémeos univitelinos (cerca de 50% para DC e 10% para CU) (Halfvarson et al., 2003, Sartor, 2006). Apesar disso, a maior incidência de DII em familiares de primeiro grau implica a genética na patogénese da doença (Sartor, 2006). A capacidade do hospedeiro se adaptar ao ambiente que o rodeia é determinada em grande parte por fatores genéticos. As variações genéticas podem determinar se o hospedeiro vai desenvolver a doença em resposta a um stress ambiental (“penetrância”), e as diferentes respostas face a essa exposição (“expressividade”). Nalguns casos a natureza e intensidade da exposição ambiental é o principal determinante da doença, mas noutros casos os fatores genéticos

são mais importantes em ditar a resposta a stresses ordinários, tal como na DII (Boland, 2010).

Um dos maiores estudos sobre a influência dos fatores ambientais nas famílias com DII identificou múltiplas diferenças nos hábitos alimentares, fatores domésticos e historial médico entre famílias com DII e controlos. A título de exemplo, os que apresentavam DII consumiam mais queijo e leite não-pasteurizado, bebiam mais água do poço, e ingeriam menos aveia, centeio e farelo. Quanto a fatores domésticos observaram que o contacto precoce com animais domésticos era um fator protetor pois favorecia a estimulação do sistema imunológico (Nunes et al., 2011, Van Kruiningen et al., 2007).

Graças aos GWAS tem sido possível identificar se determinados polimorfismos genéticos estão associados a um risco alterado para o desenvolvimento da doença (Boland, 2010). Polimorfismos são variações de uma sequência particular de ácido desoxirribonucleico (DNA), os mais comuns consistem na alteração de um único par de bases, chamados polimorfismos singulares de nucleótidos (*single nucleotide polymorphisms* ou SNPs) (Collins).

As alterações genéticas associadas à DII compreendem um grande número de genes, sendo alguns específicos da DC ou da CU e outros comuns a ambas as patologias (DII). Assim, dos 100 *loci* identificados, 23 estão associados à DC, 8 à CU e 69 são partilhados por ambas as doenças (Lee, 2011) (ANEXO I). Esses genes alterados estão envolvidos em diferentes mecanismos homeostáticos, pelo que serão abordados separadamente genes relacionados com a imunidade inata, com moléculas envolvidas na manutenção da integridade da barreira epitelial, com mecanismos de autofagia, com imunidade adaptativa, com a via da IL-23 e diferenciação dos linfócitos Th17 e com a orquestração da resposta imune secundária (Lees et al., 2011, Van Limbergen et al., 2009). Apesar dos esforços conjuntos para identificar genes associados à DII, a maior parte dos polimorfismos já identificados não apresenta ligação com fenótipos particulares da doença.

Recentemente descobriu-se que variações genéticas em sequências não codificantes desempenham um papel importante em modificar a expressão dos genes. Embora muitos dos *loci* de susceptibilidade descritos ainda não tenham causalidade esclarecida, sabe-se que a maior parte não corresponde a polimorfismos codificantes, mas sim

regulatórios, associados a mudanças qualitativas e quantitativas. (Khor et al., 2011, Lee, 2011).

Um polimorfismo numa região codificante que mude a sequência de aminoácidos pode alterar a função biológica da proteína, no entanto sabe-se que a maior parte dos SNPs associados a doenças está localizada em intrões ou entre genes. Apesar disso, os SNPs não codificantes podem conduzir ao aumento ou diminuição da proteína em questão por influenciarem a transcrição do gene de várias formas, por exemplo afetando promotores, micro-RNAs ou reguladores de transcrição de longo alcance (Hindorff et al., 2009, Hrdlickova et al., 2011, Manolio, 2010, Van Wanrooij et al., 2012).

A abordagem dos GWAS não é capaz de identificar a variante exata causadora da doença pelo que o mapeamento genético é crucial para localizar as variantes de risco que podem ser usadas em estudos funcionais. Ainda que o mapeamento genético não consiga identificar as variantes causadoras da doença, vai diminuir o número de genes candidatos a estudos funcionais (Hrdlickova et al., 2011, Van Wanrooij et al., 2012).

O termo genético *linkage disequilibrium* (LD) refere-se à associação não-aleatória de alelos de dois ou mais *loci*, a qual dificulta a identificação do gene ou associação de genes que contribui para a doença (Slatkin, 2008). Vários alelos de risco identificados estão em LD, o que torna mais difícil o estudo do papel individual de cada *single nucleotide polymorphism* (SNP).

Polimorfismos com efeito modesto na função do gene são compensados pela imunidade inata e podem proporcionar diversidade na resposta da população à flora microbiana, enquanto que os polimorfismos com um forte efeito na função da proteína só podem sobreviver como alelos raros na população, o que se verifica com os alelos de risco do NOD2/CARD15, os quais são pouco comuns mas têm um efeito forte no risco da doença (De Jager et al., 2007, Economou et al., 2004). Apesar deste exemplo, na generalidade a inflamação crónica não é caracterizada por genes únicos, dominantes e altamente penetrantes que determinam a presença e intensidade da resposta imune, como acontece noutras doenças (Boland, 2010). De facto, apesar dos vários polimorfismos descritos associados à DII, o efeito individual é relativamente modesto. Assim, o desafio é perceber como é que os polimorfismos relacionados com as

variações na resposta inflamatória interagem uns com os outros (epistasia) e integrar na variedade das exposições individuais (Boland, 2010).

Os fatores genéticos parecem ser mais importantes para DC do que para a CU, no entanto, ambas podem resultar numa mistura de causas genéticas e ambientais (Boland, 2010).

i. Imunidade Inata

a. Recetores de reconhecimento padrão

1. NOD2/CARD15

O sistema imunitário inato é capaz de detetar padrões moleculares associados a patogénicos (*pathogen-associated molecular patterns*/PAMPs) como lipopolissacarídeos (LPS), muramil dipeptídeo (MDP), flagelinas e lipoproteínas, através de recetores PRR (*Pattern recognition receptors*) como os recetores *Toll-Like* (TLR) e NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*) (Akira et al., 2006, De Jager et al., 2007, Gersemann et al., 2012).

De entre a família dos recetores NOD, o NOD-2 (*nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2*) também chamado de CARD15 (*caspase recruitment domain-containing protein 15*) é uma proteína citoplasmática, expressa sobretudo em monócitos e células dendríticas e tem como função regular a inflamação e apoptose através da ativação de vias pró-inflamatórias como a via do fator nuclear- κ B (NF- κ B). Expressa-se também no epitélio intestinal, onde desempenha um papel antibacteriano ao funcionar como sensor para a deteção de bactérias. Segundo uns autores, NOD2 tem especificidade para detetar MDP, uma parte do peptidoglicano presente na parede das bactérias *Gram* positivas e *Gram* negativas (Girardin et al., 2003, Khor et al., 2011), segundo outros autores deteta LPS (Gersemann et al., 2012, Giachino et al., 2004, Girardin et al., 2003, Hugot et al., 2001, Inohara et al., 2003, Matsuda et al., 2003, Peyrin-Biroulet and Chamaillard, 2007, Siegmund and Zeitz, 2011).

A análise de DNA de famílias com vários membros afetados por DC ou CU identificou uma área na região pericentromérica do cromossoma 16q12 (cromossoma 16, braço longo, exão 12) que é comum entre familiares com DC mas não entre familiares com

CU. Embora o risco relativo associado a este *locus*, designado de IBD1, não fosse elevado, estudos independentes comprovaram essa associação.

Hugot e colegas (2001) mapearam detalhadamente o cromossoma 16, o que permitiu a identificação do gene responsável, pelo menos em parte, por esta associação (Hugot et al., 2001, Ogura et al., 2001, Podolsky, 2002). Este gene codifica o NOD2 e foi o primeiro gene a ser associado com certeza à suscetibilidade para a DC, na América do Norte e Europa (Hampe et al., 2001, Hugot et al., 2001, Ogura et al., 2001, Siegmund and Zeitz, 2011).

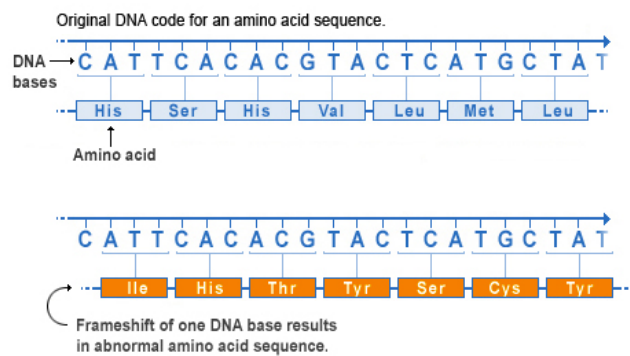
Após identificação do gene e caracterização dos polimorfismos concluíram que as três principais variantes associadas com a DC são, uma do tipo *frameshift* e duas *missense*.

Uma mutação do tipo *frameshift* (Figura 1) envolve a inserção, deleção ou duplicação de um nucleótido, pelo que o número de pares de bases deixa de ser divisível por três, o que é importante uma

vez que a célula lê o gene em grupo de três bases. Cada grupo de três bases corresponde a um dos vinte diferentes aminoácidos que servem para construir uma proteína. Esta mutação geralmente conduz à terminação precoce da proteína (codão stop) o que resulta numa proteína truncada, ou seja, sem atividade (Ostrander).

A mutação *Leu1007fsinsC* do tipo *frameshift* consiste na inserção de uma citosina no exão 11, nucleótido 3020, que leva a uma alteração no segundo nucleótido do codão 1007, traduzida na substituição da Leucina 1007 por uma Prolina, imediatamente seguida por um codão stop prematuro, o que vai codificar uma proteína NOD2 truncada, isto é, sem atividade. O gene alterado codifica uma proteína com 1013 aminoácidos em vez dos 1040 aminoácidos do NOD2 *wild-type* (wt) (Ogura et al., 2001).

Frameshift mutation



U.S. National Library of Medicine

Figura 1. Mutação *frameshift*

Adaptado de <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/mutationtypes?show=frameshift>

A mutação *missense* (Figura 2) ocorre quando se altera um único par de bases causando a substituição de um aminoácido da proteína, o que pode não ter qualquer efeito ou pode conduzir a uma proteína não funcional (Austin).

As duas mutações *missense* associadas ao NOD2 são a *R702W* ou *Arg702Trp*, onde uma arginina substitui um triptofano e a *G908R* ou *Gly908Arg*, em que uma glicina substitui uma arginina (Gersemann et al., 2012, Siegmund and Zeitz, 2011)

Do terminal amina ao terminal carboxílico, o NOD2 é composto por 2 domínios de recrutamento de caspases (CARD), um domínio de ligação a nucleótido (NBD) e uma região rica em repetições de leucina (LRR) (Hampe et al., 2001, Hugot et al., 2001).

As principais variantes identificadas alteram a estrutura do domínio LRR ou da região adjacente, responsável pela ativação do fator nuclear NF- κ B. Assim, confere suscetibilidade para a doença de Crohn ao interferir no reconhecimento de componentes bacterianos e na ativação inadequada do NF- κ B, (Hugot et al., 2001).

Segundo Ogura (2001) a proteína mutada é significativamente menos ativa em resposta a LPS bacterianos que a *wt*, o que se traduz na deteção deficiente de bactérias pelos monócitos e macrófagos (células que expressam NOD2) que explicaria a resposta inflamatória exagerada por parte da imunidade adaptativa. Outra possível explicação para a associação com a DC consiste no facto da proteína NOD2 não mutada poder induzir citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, o que não aconteceria em presença da forma mutada. Além disso, existe a possibilidade da proteína alterada conseguir detetar novos componentes bacterianos de patógenos desconhecidos, havendo assim, ganho de função (Ogura et al., 2001).

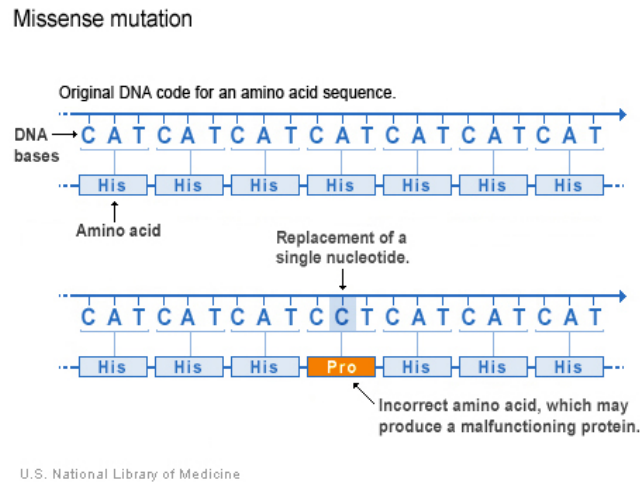


Figura 2. Mutação *missense*

Adaptado de <http://ghr.nlm.nih.gov/handbook/illustrations/mutationtypes?show=missense>

Por outro lado, outros autores, como Hampe (2001), defendem que a proteína truncada tem um poder de ativação do NF-kB cinco vezes superior à *wt* o que se traduz numa ativação inapropriada em presença de bactérias (Hampe et al., 2001). Hugot (2001) também sustenta a hipótese de super-ativação do fator NF-kB (Hugot et al., 2001).

Ahmad e colegas (2002) observaram que a variante *Leu1007fsinsC* reduzia a ativação do NF-kB o que entrava em conflito com os trabalhos prévios do grupo, os quais tinham demonstrado um aumento da ativação do NF-kB em monócitos (Ahmad et al., 2002).

Assim, apesar dos novos conhecimentos continua em debate se estas mutações contribuem para uma perda ou ganho de função (Lees et al., 2011, Lees and Satsangi, 2009).

As três principais variantes identificadas foram associadas com um fenótipo estenosante/penetrante da DC ileal (Hampe et al., 2001, Lees et al., 2011). Esta relação genótipo-fenótipo pode vir a contribuir para terapias mais dirigidas e assim com maior sucesso.

b. TLR

TLR é uma família de PRR, tal como a família NOD, envolvida na imunidade inata contra microrganismos. Estes PRR detectam PAMPs e medeiam a produção de citocinas necessárias ao desenvolvimento da resposta imune (Boland, 2010).

A família TLR é composta por 10 diferentes recetores transmembranares (TLR1-10), que são encontrados quer à superfície das células (TLR1, 2, 4-6) quer em compartimentos intracelulares, como endossomas (TLR3, 7-9) (De Jager et al., 2007, Takeda and Akira, 2005). Podem ser expressos de uma forma constitutiva ou indutiva, ao longo de todo o trato gastrointestinal e numa ampla variedade de células, incluindo as células epiteliais (enterócitos, células de Paneth, células caliciformes e células enteroendócrinas), miofibroblastos sub-epiteliais e células imunes da lâmina própria (monócitos, macrófagos, células dendríticas e TCD4+) (Cario, 2010).

No intestino saudável os TLR2 e TLR4 estão expressos em pequena quantidade, minimizando o reconhecimento da flora habitual mas mantendo um estado basal de ativação. Há mecanismos de inibição que são desligados e mecanismos reguladores

positivos que são ativados para permitir que os TLR sinalizem a ameaça e induzam uma resposta imune. O TLR4 está sobre-expresso no trato gastrointestinal baixo quer na DC quer na CU, maximizando a resposta ao ambiente o que reflete um estado aberrante de ativação (Cario, 2010).

Foram identificadas várias mutações nos genes que codificam os TLR associadas à DII. Os indivíduos com CU e que apresentam os polimorfismos *TLR1-R80T* e *TLR2-R753Q* têm maior risco de pancolite. O polimorfismo *TLR6-S249P* foi associado a uma ligeira diminuição da incidência de proctite na DII (Cario, 2010, Pierik et al., 2006).

TLR4Gly299 e *TLR4Thr399* são mutações *missense*, localizadas no terceiro exão do gene TLR4, cromossoma 9q33.1. O polimorfismo *Asp299Gly* (ou *D299G*), resulta da substituição de uma adenina por uma guanina na posição 896, que se traduz na substituição do aminoácido aspartato da posição 299 por uma glicina. A *Thr399Ile* resulta da substituição de uma citosina por uma timina na posição 1196, pelo que uma treonina é substituída por uma isoleucina (Zhu et al., 2012). Em estudos *in vitro* tanto a *Gly299* como a *Ile399* demonstraram menor resposta a LPS e outros ligandos TLR4, pelo que podem ser variantes causais de DII. Vários estudos associaram estas variantes à CU e à DC, no entanto, a influência deste alelo na função biológica e patogénese da DII não está bem esclarecida, uma vez que o TLR4 se encontra numa região de LD (Cario, 2010, De Jager et al., 2007). Alguns estudos identificaram o polimorfismo *D299G* como preditor de fenótipo estenosante na DC, apenas na ausência das mutações do NOD2/CARD15 (Brand et al., 2005, Cario, 2010).

Um polimorfismo identificado no TLR5 (TLR5-stop) que conduz à perda de 75% da função do TLR5 reduz a resposta imune à flagelina, pelo que demonstrou ser protetor na DC. Pelo contrário, a perda completa da função do TLR5 resultou em colite espontânea em ratinhos, devido à resposta aberrante do TLR4 à alteração da flora comensal (Cario, 2010, Gewirtz et al., 2006).

Os SNPs *1237T/C* e *2848 A/G* identificados no TLR9 foram associados às variantes da DC no NOD2/CARD15, IL23R e DLG5 (Cario, 2010, Torok et al., 2009).

O grupo de De Jager (2007) identificou ainda um polimorfismo no TIRAP (*TIR domain-containing adapter protein*) associado à DII. Este gene codifica uma proteína

com um papel chave como molécula adaptadora na junção de várias vias de sinalização, incluindo TLR4, ao qual se liga intracelularmente. No entanto, a associação encontrada, embora significativa, tem um efeito modesto no risco de DII pelo que o grupo defende a necessidade de estudos mais alargados (De Jager et al., 2007).

ii. Manutenção da integridade da barreira epitelial

O epitélio intestinal desempenha um papel chave como barreira do trato gastrointestinal. Existe o consenso que a permeabilidade intestinal modificada é característica fundamental dos indivíduos com DII, bem como dos seus familiares em primeiro grau (Khor et al., 2011). A interface luminal é constituída por uma camada simples de células epiteliais seladas por junções apertadas e junções de adesão. Esta camada forma uma barreira seletiva que permite a absorção de nutrientes e limita a entrada de material estranho proveniente do conteúdo luminal. Vários estudos demonstraram que o complexo das junções apertadas é alvo das bactérias a fim de aumentar a permeabilidade epitelial nas infeções intestinais agudas (Rosenstiel et al., 2009).

O epitélio intestinal é uma monocamada constituída por quatro diferentes tipos de células epiteliais: células colunares, células de Paneth, células caliciformes e células neuroendócrinas, todas derivadas de células estaminais totipotentes (Gersemann et al., 2012, Leedham et al., 2005).

As células colunares são as mais abundantes no epitélio intestinal e são cobertas pelo glicocálice, formando uma camada pegajosa que previne a invasão da mucosa pelos microrganismos do lúmen (Figura 3). Além disso, as células colunares produzem vários péptidos antimicrobianos denominados defensinas, que são pequenos péptidos catiónicos com atividade antimicrobiana de largo espectro contra bactérias *Gram-positivas* e *Gram-negativas*, fungos, vírus e protozoários. As defensinas atuam abrindo poros nas membranas microbianas o que leva à rotura das bactérias (Gersemann et al., 2012, Papo and Shai, 2003, Roda et al., 2010, Zasloff, 2002, Zhao et al., 1996).

As defensinas podem ser divididas em α e β , sendo as β -defensinas HBD1-3 principalmente produzidas pelas células colunares e as α -defensinas HD5 e HD6 originadas a partir das células de Paneth. As células caliciformes também secretam defensinas, bem como mucinas, que são moléculas estruturais da camada protetora de

muco, negativamente carregada. Assim, o epitélio intestinal está recoberto por uma camada de defensinas catiónicas fixas à camada de muco negativamente carregada, formando a barreira inata do trato gastrointestinal (Ayabe et al., 2000, Frye et al., 2000, Gersemann et al., 2012, Meyer-Hoffert et al., 2008, Ouellette, 2004, Shirazi et al., 2000, Zhao et al., 1996).

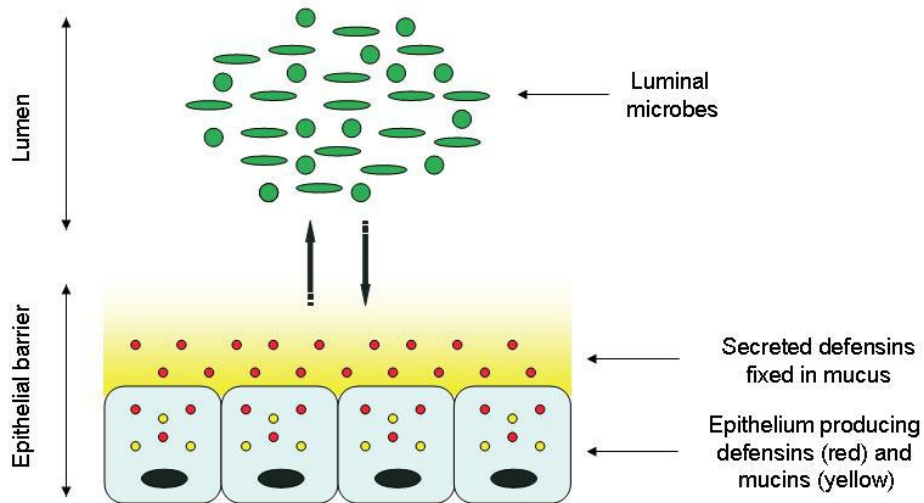


Figura 3. Barreira intestinal intacta em indivíduos saudáveis

Adaptado de Gersemann, 2012

A camada de muco normal é surpreendentemente pobre em bactérias devido às defensinas, mucinas e outros péptidos antimicrobianos. No entanto, na DII a camada de muco apresenta um elevado número de bactérias, algumas das quais conseguem aderir e invadir o epitélio (Gersemann et al., 2009).

Por outro lado a espessura da camada de muco, que normalmente varia entre 100-300 μ m, é mais fina, desregular e parcialmente desnudada na CU, ao contrário da DC. Embora não esteja completamente esclarecido se essas mudanças no muco são eventos primários ou secundários às infeções, pensa-se que se devem a defeitos na diferenciação das células caliciformes, uma vez que são as células colónicas maiores produtoras de muco (Gersemann et al., 2009).

Na DII existe uma desregulação dos péptidos antimicrobianos, uma vez que a produção de α -defensinas está diminuída na DC ileal, as β -defensinas estão diminuídas na DC colónica e a camada de muco é deficiente na CU. Este conjunto de defeitos na barreira

causa inflamação devido à invasão bacteriana na mucosa, ativando então a imunidade adaptativa (Gersemann et al., 2012).

a. *TCF-4*

O gene *TCF-4*, localizado no cromossoma 10q25.3, também denominado *TCF7L2* (*transcription factor 7-like 2*), codifica um fator de transcrição da via de sinalização Wnt, responsável pela diferenciação das células de Paneth e pela expressão das α -defensinas HD-5 e HD-6 (Koslowski et al., 2009).

Modelos animais demonstraram que a redução da expressão de TCF-4 estava associada à diminuição das α -defensinas produzidas pelas células de Paneth, no intestino delgado de indivíduos com DC (Koslowski et al., 2009).

Koslowski e colegas (2009) identificaram vários SNPs no gene que codifica o TCF-4, um dos quais, reference SNP (rs) 3814570 na região do promotor, apresentava uma forte associação à DC ileal e não à DC colónica nem à CU (Koslowski et al., 2009).

O grupo de Gersmann (2003) e o grupo de Wehkamp (2004) encontraram associação deste polimorfismo à mutação *frameshift* de NOD2/CARD15, no entanto, Koslowski e colegas não observaram essa associação (Gersemann et al., 2011, Gersemann et al., 2012, Koslowski et al., 2009, Wehkamp et al., 2005).

O defeito nas células de Paneth, mediado pelo Wnt, leva à ausência de α -defensinas na DC ileal, o que pode ser um fator primário na patogénese de DC ileal (Figura 4).

Este pressuposto é apoiado pelo facto

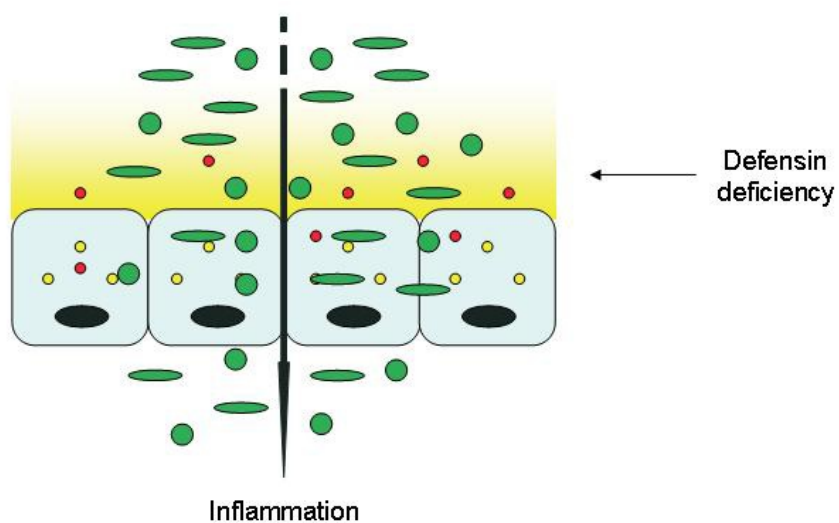


Figura 4. Defeitos na barreira intestinal inata na DC

Adaptado de Gersmann, 2012

de que outras moléculas associadas às células de Paneth, como a ATG16L1, estão geneticamente deficientes na DC (Gersemann et al., 2012).

b. PPAR- γ

O recetor proliferador-ativador de peroxissomas γ (PPAR- γ) é um recetor nuclear, que segundo alguns autores desempenha um papel na génese da CU e da DC (Gersemann et al., 2012, Peyrin-Biroulet et al., 2010, Yamamoto-Furusho et al., 2011, Zhang et al., 2012).

O PPAR- γ é responsável pela expressão das β -defensinas, HBD1, atuando como fator anti-microbiano. Uma vez que a expressão das β -defensinas se encontra reduzida na DC colónica, os investigadores procuraram uma justificação no PPAR- γ . Além disso, estudos em ratinhos com mutações no PPAR- γ apresentavam capacidade bactericida reduzida contra *Candida albicans*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli* (Gersemann et al., 2012).

Foi identificada uma mutação *missense* no codão 12, em que uma citosina é substituída por uma guanina, o que se traduz na alteração do aminoácido prolina por uma alanina (Zhang et al., 2012).

No entanto, ao contrário dos estudos já referidos, Zhang e colegas (2012) não observaram nenhuma ligação deste polimorfismo com a CU nem com a DC e atribuem a associação encontrada pelos outros grupos ao baixo número de casos dos seus estudos (Zhang et al., 2012).

c. Hath1, KLF4 e mucinas

Hath1 e KLF4 são dois fatores de transcrição essenciais na diferenciação das células caliciformes, altamente induzidos na mucosa colónica saudável. No entanto, encontram-se sub-expressos na CU, ao contrário da DC, o que conduz a um menor número de células caliciforme e de mucinas (Gersemann et al., 2009).

Na CU, a menor indução dos fatores Hath1 e KLF4 manifesta-se em defeitos na maturação e migração das células caliciformes para a superfície das criptas, uma vez

que na parte média e base das criptas o número de células caliciformes é semelhante à DC, estando a diferença confinada à parte superior das criptas (Gersemann et al., 2009).

As células caliciformes secretam os componentes do muco intestinal como fosfolípidos, IgA e mucinas, estando estas últimas proteínas filamentosas presentes na interface de muitos epitélios com os seus ambientes extracelulares. As mucinas são divididas em duas categorias, umas estão ancoradas à membrana formando o glicocálise, e as outras são as mucinas secretoras, que formam a camada de muco (Moehle et al., 2006).

Alguns autores defendem que a expressão intestinal da maior parte das mucinas está diminuída na DII, sobretudo na CU, o que aumenta a permeabilidade da barreira intestinal e poderá levar à conclusão que todas as mucinas têm um papel protetor

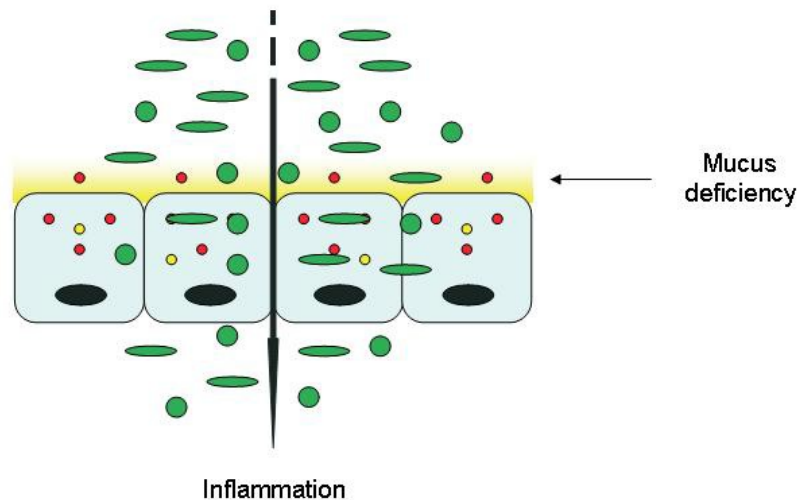


Figura 5. Defeitos na barreira intestinal inata na CU

Adaptado de Gersemann, 2012

intestinal (Figura 5) (Gersemann et al., 2012, Moehle et al., 2006). No entanto, Moehle e colegas (2006) estudaram todas as mucinas e apenas provaram o caráter protetor a nível intestinal da MUC2, que é a principal mucina expressa no intestino. Na verdade, estudos em ratinhos sem o gene *MUC2* apresentavam ausência completa de células caliciformes e desenvolveram CU espontânea (Moehle et al., 2006, Rosenstiel et al., 2009, Van Der Sluis et al., 2006).

Foram identificados polimorfismos nos genes que codificam as mucinas, quer na DC quer na CU, no entanto, uma vez que não há consenso quanto à expressão das mucinas na DII aguardam-se novos estudos de confirmação (Buisine et al., 1999, Moehle et al., 2006, Shirazi et al., 2000).

Embora a quantidade de defensinas produzida na CU seja suficiente estas não são retidas pela camada deficiente de muco, permitindo a entrada de bactérias através do epitélio, o que induz inflamação (Gersemann et al., 2012).

d. ECM1

O gene *ECM1*, localizado no cromossoma 1q21.2 (braço longo do cromossoma 1, região 2, banda 1, sub-banda 2), codifica a glicoproteína extracelular da matriz proteica 1, expressa nos epitélios, bem como ao longo do intestino. Esta glicoproteína interage com a membrana basal, inibindo a atividade proteolítica da metaloprotease 9 da matriz (MMP9) e ativando, fortemente, o factor NF-kB, fundamental como imunorregulador (Matsuda et al., 2003, Thompson and Lees, 2011).

A principal função da proteína ECM1 consiste em ser uma “super-cola biológica” que se liga a elementos chave da substância dérmica, regulando a bioatividade de muitos componentes da matriz ou influenciando indiretamente a sinalização das respostas do estroma (Chan et al., 2007).

Fisher (2008) identificou 2 mutações *missense* associadas à CU no gene *ECM1*. A mutação *T130M* consiste, a nível nucleotídeo, na substituição de uma citosina por uma timina, o que se traduz, a nível proteico, na substituição do aminoácido triptofano da posição 130 por uma metionina (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). A outra mutação, *G290S*, consiste na substituição de um guanina por uma adenina, o que se traduz na alteração de uma glicina na posição 290 por uma serina (Fisher et al., 2008).

A maior parte das mutações neste gene estão associadas à lipoidoproteinose, ou doença de Urbach-Wiethe, caracterizada por uma diminuição generalizada da espessura da pele, mucosas e de algumas vísceras (Fisher et al., 2008).

A expressão do *ECM1* é influenciada pela via de transdução de sinal Wnt/ β -catenina, A sua desregulação foi relacionada com a patogénese de tumores nas glândulas mamárias, cólon e outros tecidos, incluindo a pele. Além disso, foi observada a sobre-expressão do gene em metástases o que indica um papel importante nas interações epitélio-estroma (Chan et al., 2007).

Anderson (2009) provou que as mutações no gene *ECMI* apenas conferem suscetibilidade para a CU e não para a DC (Anderson et al., 2009, Thompson and Lees, 2011).

e. HNF4A

O gene *HNF4A*, localizado no cromossoma 20q13, codifica o fator de transcrição nuclear de hepatócitos, que regula os vários componentes dos três principais tipos das junções célula-célula: junções aderentes, junções apertadas e desmossomas. Estas junções são fundamentais quer na organização do epitélio quer no desempenho da sua função de barreira. Além disso, o *HNF4A* tem um papel fundamental no desenvolvimento embrionário do trato gastrointestinal dos mamíferos (Barrett et al., 2009)

Investigadores geraram ratinhos deficientes no gene *HNF4A*, o que se traduziu em mortalidade neonatal precoce. Ao observarem o cólon desses ratinhos constataram uma redução no número das células epiteliais e das células caliciformes, o que se traduziu também na maturação defeituosa dos grânulos de muco (Barrett et al., 2009, Thompson and Lees, 2011).

Ahn (2008), após observar uma menor expressão de *HNF4A* em doentes com DII, desenvolveu um modelo de ratos com sub-expressão de *HNF4A*, tendo constatado um aumento da permeabilidade intestinal nesses ratos (Ahn et al., 2008). Pelo contrário, Noble e colegas (2008), defendem que o gene *HNF4A* está sobre-expresso na CU. Segundo Thompson (2011) é normal que o recetor esteja induzido no cólon inflamado na tentativa de promover a integridade da mucosa e relaciona os resultados anteriores de Ahn com um baixo número de casos controlos (Noble et al., 2008, Thompson and Lees, 2011).

O SNP rs6017342 identificada por Barret e colegas como aumentando o risco para CU, consiste no alelo de risco citosina, localizado perto de uma região não codificante, pelo que não se traduz em alteração da sequência proteica. Este grupo não encontrou associação com a DC, ao contrário de outros investigadores como Ahn (2008) (Barrett et al., 2009, Thompson and Lees, 2011).

A identificação deste polimorfismo na CU vem sublinhar a importância da quebra na barreira epitelial na patogênese da doença.

f. CDH1

O gene *CDH1*, localizado no cromossoma 16q22, codifica a E-caderina, uma glicoproteína transmembranar, componente fundamental das junções de adesão e promotora chave da adesão no epitélio intestinal (Barrett et al., 2009).

As junções de adesão e as junções apertadas formam o complexo de junção apical (CJA), principal responsável pela função de barreira intestinal. Segundo alguns autores, o aumento da permeabilidade na mucosa, observada nos doentes com DII, deve-se a defeitos nesse complexo (Thompson and Lees, 2011).

A expressão da E-caderina sofre mudanças compensatórias, uma vez que é necessário uma sub-expressão nas áreas ulceradas, a fim de permitir a migração de células que vão recobrir as zonas com perda epitelial, processo facilitado pela diminuição da adesão celular (Dogan et al., 1995, Thompson and Lees, 2011). Por outro lado, uma sobre expressão promove a estabilidade do epitélio (Dogan et al., 1995). Daqui se subentende o papel fundamental da E-caderina na reparação do epitélio após dano da mucosa (Barrett et al., 2009). Karayiannakis e colegas (1998) observaram diminuição da expressão de E-caderina nos pacientes com CU ativa, nas margens das áreas ulceradas (Barrett et al., 2009, Karayiannakis et al., 1998).

Alguns estudos apontam para uma cooperação entre o *CDH1* e o *HNF4A* para a manutenção da integridade da barreira epitelial do intestino, o que foi observado em ratinhos *Knockout* sem o gene *HNF4A*, que não eram capazes de expressar E-caderina. Outras experiências demonstraram que a quantidade e capacidade de ligação do *HNF4A* desempenha um papel importante nos contatos célula-célula dependentes da E-caderina. Além disso, ambos influenciam a expressão de outros genes como a *APOA4*, que codifica uma proteína anti-inflamatória inibidora da colite experimental (Thompson and Lees, 2011).

A ligação entre a E-caderina e a colite foi observada em estudos com ratinhos quiméricos, que apresentavam sub-expressão da proteína, os quais desenvolveram colite, apesar de possuírem um sistema imune intacto (Thompson and Lees, 2011).

A atividade da E-caderina pode ser perturbada por microorganismos, como a *Candida albicans* e *Bacteroides fragilis*, pois têm capacidade de clivar a proteína, perturbando as junções aderentes que suportam a barreira epitelial (Thompson and Lees, 2011).

A mutação neste gene associada à CU foi identificada por Barret e colegas como SNP rs1728785, consiste na substituição de uma adenina por uma guanina (alelo de risco) num intrão, pelo que não altera a sequência proteica (Barrett et al., 2009) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>). Este grupo não encontrou associação com a DC. Pelo contrário, um estudo *in vitro* do Canadá verificou que a presença de DC com a mutação no gene CDH1 conduziu à obtenção da proteína E-caderina truncada, que se acumulava no citoplasma destabilizando a arquitetura epitelial (Barrett et al., 2009, Khor et al., 2011, Muise et al., 2009, Thompson and Lees, 2011).

Barret e colegas identificaram a E-caderina como a primeira correlação genética entre CU e cancro colo-rectal, o qual é uma complicação tardia da CU, em função da extensão e duração da doença (Barrett et al., 2009).

g. *LAMBI*

O gene *LAMBI*, localizado no cromossoma 7q31, codifica a sub-unidade $\beta 1$, uma cadeia leve, segundo Barret (2009) presente nas lamininas 1, 2 e 10. As lamininas, heterotrímeros, são as glicoproteínas mais abundantes na membrana basal do intestino e são secretadas, localmente, por células epiteliais, células parenquimatosas e células fibroblásticas. Têm como função formar a lâmina basal, ancorando a monocamada epitelial, e promover a diferenciação dos enterócitos humanos (Barrett et al., 2009, Bouatrouss et al., 2000, Schmehl et al., 2000). As lamininas interagem com as integrinas para criar um sistema de adesão celular no epitélio intestinal (Thompson and Lees, 2011).

Schmehl e colegas (2000) observaram tecidos colónicos de doentes com UC tendo constado défice de laminina apenas nos tecidos inflamados, na CU ativa. Além disso, apresentavam acumulação de colagénio tipo IV e V o que, juntamente com a ausência de laminina, conduziu à alteração da estrutura tridimensional da membrana basal do epitélio colónico (Barrett et al., 2009, Schmehl et al., 2000, Thompson and Lees, 2011).

A mutação neste gene associada à CU foi confirmada por Barret e colegas, após sugestão de um estudo GWAS Norte-Americano prévio. O SNP identificado como rs886774 consiste na substituição de uma adenina por uma guanina conduzindo à sub-expressão de lamininas na CU. Este grupo não encontrou associação com a DC. No entanto, estudos prévios associaram déficit da laminina-2 e aumento das lamininas-1 e 5 nas criptas ileais, na DC (Bouatrouss et al., 2000). Segundo Francoeur (2004) a alteração da expressão das lamininas deve-se à ação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e o IFN- γ (Francoeur et al., 2004).

h. GNA12

O gene *GNA12*, presente no cromossoma 7p22, codifica a proteína G α 12, uma GTPase associada à membrana implicada na ligação entre as junções apertadas (*tight junctions*, TJ) e as células epiteliais (Anderson et al., 2011, Sabath et al., 2008).

As proteínas G são uma família de proteínas de ligação ao nucleótido guanina com várias funções conhecidas, nomeadamente ser intermediárias de hormonas, neurotransmissores ou estímulos sensoriais, através da ligação do seu recetor transmembranar a vários efetores como enzimas e canais. As proteínas desta família são heterotriméricas, ou seja, são constituídas por três sub-unidades, α , β , γ , sendo a sub-unidade α fundamental para determinar as suas propriedades (Offermanns, 2001).

A família da G α 12/13 regula a formação de fibras de stresse e desempenha outras funções celulares cruciais em diferentes vias. Vários estudos descreveram as sub-unidades G α , incluindo a G α 12, localizadas no epitélio celular das TJ, implicando-as na regulação da função de barreira e na formação das TJ (Sabath et al., 2008).

Sabath e colegas (2008) apresentam a G α 12 como uma reguladora negativa da formação das TJ, uma vez que quando ativada conduz à destabilização da estrutura e funções das TJ (Sabath et al., 2008).

Os estudos de Sabath e colegas (2008) referem que a ativação da proteína G α 12 conduz à perda de todos os aspetos da seletividade paracelular, nomeadamente em relação às cargas (catiões sobre aniões), quanto à seletividade para os iões mais hidratados e, por último, em relação ao tamanho perde a seletividade para pequenos catiões inorgânicos.

Estas alterações induzem à abertura de grandes poros hidratados não seletivos (Sabath et al., 2008).

Anderson e colegas (2011) identificaram o SNP rs798502 num intrão do gene *GNAI2* associado à CU, sendo a adenina o alelo de risco. Mais uma vez se confirma a ligação entre a desregulação da barreira epitelial e a patogénese da CU (Anderson et al., 2011, Khor et al., 2011).

iii. Autofagia

A autofagia é um processo que recicla os componentes do conteúdo celular (organelos, corpos apoptóticos, entre outros), entregando-os em vesículas aos lisossomas. (Cadwell et al., 2008, Levine and Kroemer, 2008). Desempenha ainda a importante função de contribuir para a resistência a infeções através da remoção intracelular de microrganismos, pelo que exerce um papel chave na homeostasia celular e tecidual (Khor et al., 2011).

Os genes ligados à autofagia que apresentam risco aumentado de DC são o *ATG16L1*, *ATG5*, *IRGM*.

Estudos científicos referem que o NOD2, estimulado pelo MDP, ativa a autofagia. No entanto, as células epiteliais e dendríticas que contém as variantes de NOD2 e *ATGM16L1* associadas à DC apresentam defeitos na autofagia bacteriana (Khor et al., 2011). Nas células dendríticas, esses defeitos estão relacionados com a incapacidade de apresentação de antígenos exógenos às células T CD4⁺. Estes resultados demonstram a ligação entre NOD2, *ATG16L1* e autofagia, o que afeta a comunicação com a imunidade adaptativa, sugerindo que os polimorfismos genéticos afetam, simultaneamente, ambas as vias. (Cooney et al., 2010, Khor et al., 2011).

a. *ATG16L1* e *ATG5*

O gene *ATG16L1* (*autophagy-related protein 16-1*), localizado no cromossoma 2q37.1 codifica a proteína da autofagia *ATG16L1* envolvida, como o seu nome indica, na autofagia (Lee, 2011). Esta proteína é responsável pela formação do fagossoma e correta localização intracelular da maquinaria fagocitária (Cadwell et al., 2008).

Tanto a proteína ATG16L1 como a ATG5, outra proteína essencial para a autofagia, são seletivamente importantes para a biologia das células de Paneth. Estas células são especializadas na secreção de grânulos contendo péptidos antimicrobianos e outras proteínas que alteram o meio intestinal (Cadwell et al., 2008, Ouellette, 2006).

O polimorfismo rs 2241880 encontrado neste gene, que aumenta a suscetibilidade para a DC representa uma mutação *missense*, em que uma adenina é substituída por uma guanina, o que se traduz na alteração do aminoácido treonina da posição 300 por uma alanina (*T300A*). Hampe e colegas (2007) verificaram que a frequência do alelo G (guanina) deste SNP em indivíduos com CU era idêntica à dos controles, pelo que excluíram associação com CU (Hampe et al., 2007). O domínio da proteína alterado pela mutação faz parte do fagossoma mas desconhece-se o mecanismo concreto que conduz à suscetibilidade para a DC (Cadwell et al., 2008).

Apesar da expressão ubiquitária deste gene, os polimorfismos limitam-se ao intestino, provavelmente relacionados com o aumento da carga microbiana nesse local (Khor et al., 2011)

Cadwell e colegas (2008) manipularam geneticamente ratinhos a fim de apresentarem hipomorfismo (mutação que reduz mas não anula a expressão de um gene) do gene *ATG16L1*. As células de Paneth provenientes desses ratos apresentavam aberrações semelhantes às encontradas nos indivíduos com DC e com a variante *T300A* do gene *ATG16L1*, ou seja, defeitos no tamanho dos grânulos, no seu número, localização (ausentes nas microvilosidades) e diminuição da secreção de péptidos antimicrobianos endógenos. No entanto, surpreendentemente, revelaram sobre-expressão de genes envolvidos na regulação da resposta ao dano celular, entre os quais reagentes de fase aguda e duas adipocitocinas, leptina e adiponectina, que também se encontravam aumentadas em pacientes com DC (Cadwell et al., 2008, Yamamoto et al., 2005). Os ratinhos manipulados com deleção de ATG5 apresentavam aberrações nas células de Paneth semelhantes às dos ratinhos com hipomorfismo de *ATG16L1*, sem alterações noutras células epiteliais. É interessante verificar que estes ratinhos com o hipomorfismo de *ATG16L1*, com flora intestinal intacta, não apresentavam à partida defeitos nas células de Paneth, tendo aparecido após serem infetados com norovírus, o que demonstra a importância da relação hospedeiro-microrganismo na patogénese da DII (Cadwell et al., 2008).

b. IRGM

O gene *IRGM* (*immunity-related GTPase family member, M*), localizado no cromossoma 5q33.1 codifica uma proteína da autofagia com um papel importante na imunidade inata contra patógenos intracelulares como *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* aderente-invasiva (*adherent-invasive Escherichia coli, AIEC*) associada à DC. Embora o mecanismo da regulação deste gene não esteja completamente esclarecido, sabe-se que a eficiência do processo de autofagia depende de um limiar crítico de *IRGM* (Brest et al., 2011)

O SNP rs 10065172 do gene *IRGM*, associado ao risco aumentado para a DC, consiste numa deleção não causativa, uma vez que não altera a sequência proteica, pelo que a substituição de uma citosina por uma timina não conduz à alteração no aminoácido leucina na posição 313. No entanto, a variante *c.313T*, com o alelo timina, apresenta risco aumentado para a DC e a variante *c.313C* é protetora. Brest e colegas (2011) observaram que a expressão de *IRGM* é influenciada por uma família de micro-RNAs (mi-RNA), miR-196 (Brest et al., 2011).

Os mi-RNA são uma classe de pequenos RNAs endógenos, com um papel chave na regulação da expressão genética em plantas e animais. Atuam como silenciadores pós-transcricionais, inibindo a tradução de RNAs mensageiros-alvo. A expressão anómala dos mi-RNA tem sido associada com diferentes patologias (Ricarte Filho and Kimura, 2006).

O miR-196 está sobre expresso no epitélio intestinal inflamado na DC o que induz a diminuição da variante protetora de *IRGM*, *c.313C* mas não da variante de risco, *c.313T*. Na experiência do grupo de Brest (2011) observaram que essa desregulação na expressão de *IRGM* afeta a eficácia do processo de autofagia para controlo da replicação celular da AIEC associada à DC (Brest et al., 2011, Khor et al., 2011).

5. Imunidade Adaptativa

i. Via de sinalização da IL-23 na diferenciação dos linfócitos Th17

Diversos estudos associaram variantes de genes pertencentes à via da IL-23 com aumento de suscetibilidade para a DC e para a CU, tais como o recetor da interleucina

23 (IL-23R), a IL-12B, a tirosina-quinase 2 (TYK2), a Janus quinase 2 (JAK2), o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3), o recetor tipo 6 ligado às quimiocinas CC (CCR6) e o ligando indutor e co-estimulador das células T (ICOS-L) (Lee, 2011).

A interleucina 23 é uma importante citocina no desenvolvimento e manutenção das células Th17 (Lee, 2011). É uma proteína heterodimérica constituída por duas sub-unidades, a p40, partilhada com a IL-12, e a p19 (Figura 6). É produzida principalmente pelas células dendríticas, monócitos e macrófagos e atua através do complexo do recetor heterodimérico, que consiste na subunidade única do recetor da interleucina-23, IL-23R, e uma subunidade compartilhada com o recetor da IL-12, IL-12R β (Di Meglio and Nestle, 2010).

A atividade pró-inflamatória da IL-23 traduz-se no desenvolvimento das células inflamatórias T CD4+, Th17, caracterizadas pela produção de IL-17, IL-6 e TNF- α , associadas à inflamação dos tecidos. Além do efeito sobre as células T, a IL-23 também atua na imunidade inata, induzindo a produção de citocinas inflamatórias, como a IL-1, IL-6, TNF- α pelos monócitos e macrófagos (Hue et al., 2006). Segundo alguns autores o papel da IL-23 é dispensável nas primeiras fases de diferenciação das células Th17 a partir de células T *naïve*, no entanto, é fundamental para a fase final de diferenciação e manutenção (Bettelli et al., 2008, Di Meglio et al., 2011).

A ligação da IL-23 ao seu recetor ativa a via de sinalização JAK-STAT, através da fosforilação do JAK2 seguida da homodimerização do STAT3. O homodímero-STAT3 dirige-se, então, para o núcleo onde exerce os seus efeitos na transcrição de vários genes (Van Limbergen et al., 2009).

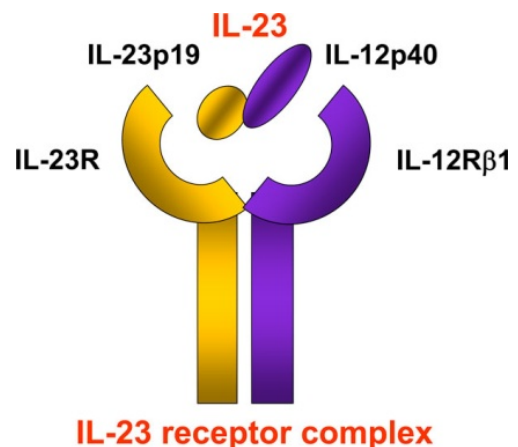


Figura 6. Esquema representativo da estrutura do complexo IL23/IL23R

*Adaptado de
Di Meglio and Nestle, 2010*

A expressão aumentada de IL-23 e Th17 na DC já foi demonstrada por vários estudos (Fujino et al., 2003, Holta et al., 2008, Van Limbergen et al., 2009).

a. IL-23R

O gene que codifica o recetor da interleucina, IL-23R, localiza-se no cromossoma 1p31. A IL23R foi inicialmente associada à DC, tendo-se mais tarde concluído que também estava associada à suscetibilidade para a CU (Thompson and Lees, 2011).

De entre os vários polimorfismos identificados relacionados com a DC, o que apresenta mais forte associação (rs11209026) é um polimorfismo protetor, no exão 9, que codifica uma região transmembranar da IL-23R (Duerr et al., 2006, Tremelling et al., 2007, Van Wanrooij et al., 2012). A variante obtida, *Arg381Gln (ou R381Q)*, consiste numa mutação *missense*, uma vez que uma guanina é substituída por uma adenina, o que se traduz na alteração do aminoácido arginina da posição 381 por uma glutamina (Di Meglio et al., 2011, Duerr et al., 2006) (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP). O alelo protetor A (adenina) causa *splicing* alternativo, movendo o codão stop, o que se traduz na eliminação do domínio transmembranar da proteína. A proteína solúvel resultante, denominada delta-9, liga-se à IL-23, retirando-a de circulação e inibindo o desenvolvimento e a função das células Th17, que são patogénicas na DII. Uma vez que esta variante confere uma forte proteção contra a DC estão a ser desenvolvidos estudos a fim de usar a proteína delta-9 como arma terapêutica (Lees et al., 2011, Yu, 2010).

Di Meglio (2011) e colegas relataram que a variante protetora não tem efeito na quantidade e atividade das células Th17 mas sim na função efetora, uma vez que observaram diminuição da produção da citocina pró-inflamatória IL-17A pelas células Th17 com o alelo A, após estimulação pela IL-23.

De entre os oito polimorfismos da IL23R testados por Tremelling (2007), todos apresentaram associação significativa com a DC e alguns com a CU. Tremelling confirmou que a variante protetora Arg380Gln apresenta maior associação com a DC, e o alelo *wt*, G, apresenta risco aumentado de DC. O SNP com maior risco associado à DC foi o rs10889677, localizado na região não codificante 3'UTR (*untranslated region*) em que uma citosina é substituída por uma adenina (Tremelling et al., 2007). Van Wanrooij (2012) e colegas demonstraram que o alelo de risco aumenta os níveis de

IL-23R mRNA e da proteína, o que pode estar associado à perda de capacidade de ligação dos microRNAs regulatórios *Let7e* e *Let7f*, explicando assim as diferenças observadas (Van Wanrooij et al., 2012, Zwiers et al., 2012).

Segundo Tremelling (2007), o polimorfismo com associação mais significativa à CU é o rs1004819, localizado num intrão, sendo o alelo de risco uma timina, seguido do rs10889677, em que uma citosina é substituída por uma adenina, que é o alelo de risco. A associação entre o alelo A da mutação *Arg380Gln* e a CU foi marginal, embora seja protetora não tem grande significado estatístico. Os resultados de Tremelling são semelhantes aos resultados de outros grupos, como Duerr e colegas (Duerr et al., 2006).

b. JAK2 e STAT3

O gene *JAK2*, localizado no cromossoma 9p24 codifica o recetor proximal da IL-23, Janus quinase 2, componente importante da via de sinalização de numerosas citocinas (Lee, 2011, Polgar et al., 2012).

A via JAK-STAT está envolvida na patogénese quer da DC, quer da CU. Esta via desempenha um papel fundamental na transmissão de sinal desde os recetores localizados à superfície da célula até ao núcleo, onde modifica a transcrição de vários genes. JAK2 e STAT3 desempenham um papel fundamental na sinalização da IL23R e o STAT tem ainda um papel chave na maturação das células T CD4⁺ *naïve* até Th17, que conduzem à inflamação na DII. Além disso, têm um papel crítico nas vias de transdução de sinal de várias citocinas como a IL6, 10, 17, 21, 22 e IL23 (Abraham and Cho, 2009, Anderson et al., 2009, Polgar et al., 2012, Yang et al., 2007).

Polgar (2012) estudou o polimorfismo rs10758669, alelo de risco C, já descrito por outros investigadores. No seu estudo não observou relevância estatística que sugerisse suscetibilidade para a DC nem para a CU (Polgar et al., 2012). Estes resultados vão de encontro às observações do grupo de Ferguson (2010) (Ferguson et al., 2010).

Anderson (2009) investigou o mesmo SNP, tendo observado associação significativa com a DC e com a CU (Anderson et al., 2009). Num estudo seguinte, Anderson (2011) confirmou a suscetibilidade desta variante para a CU e para a DC (Anderson et al., 2011).

Barret (2009) estudou outro polimorfismo, rs10974914, cujo alelo de risco é uma guanina, o qual aumenta a suscetibilidade quer para a DC quer para a CU (Barrett et al., 2009).

Quanto ao gene STAT3, localiza-se no cromossoma 17q21 e codifica o transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3). Este fator de transcrição é fosforilado pelo JAK2, sendo um importante componente da cascata de sinalização de várias citocinas, como já foi referido (Lee, 2011).

Polgar (2012) estudou o polimorfismo rs744166, com o alelo de risco T (timina), tendo encontrado uma forte associação com CU nos indivíduos homocigóticos para o alelo T. Este SNP não demonstrou significado estatístico na DC. Estes resultados vão ao encontro das observações de Franke (2008). (Franke et al., 2008a, Polgar et al., 2012).

Sato e colegas identificaram um polimorfismo apenas associado à DC, rs2293152 (Sato et al., 2009)

Ao avaliar os resultados do seu estudo do ponto de vista das interações genéticas, Polgar (2012) concluiu que alelos de risco identificados no gene JAK2 (rs10758669) e STAT3 (rs744166) contribuem para a suscetibilidade para a DC quando combinados. Por outro lado, as variantes de JAK2 mostram uma tendência para a CU quando combinadas com o STAT3 *wt*. Estas observações põem a tónica na importância das interações genéticas para compreender o desenvolvimento da DII. (Polgar et al., 2012).

c. *CCR6*

O gene *CCR6*, localizado no cromossoma 6q27, codifica um recetor tipo 6 ligado às quimiocinas CC, acoplado à proteína G (*CCR6*) (Lee, 2011).

As quimiocinas são citocinas quimiotáticas de baixo peso molecular, sendo CC a subfamília que apresenta os 2 resíduos de cisteína adjacentes. Os recetores das quimiocinas pertencem à grande família dos recetores acoplados à proteína G e reconhecem quase exclusivamente apenas uma subfamília. A maior parte das quimiocinas desta família ativa monócitos, linfócitos, eosinófilos e basófilos, desempenhando um papel importante na inflamação crónica e processos alérgicos (Guerreiro et al., 2011).

O CCR6 é o único recetor conhecido da quimiocina CCL20, também denominada *macrophage inflammatory protein 3a* (MIP-3a), que se expressa em linfócitos T e B, células dendríticas imaturas, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e células NK. A quimiocina CCL20 é produzida por macrófagos ativados, células dendríticas e células endoteliais e leva à chamada de cálcio e à quimiotaxia (Guerreiro et al., 2011). As células epiteliais colónicas secretam CCL20 em resposta à IL-17, a fim de recrutar células Th17 (Lee et al., 2008, Van Limbergen et al., 2009).

Aquando da inflamação epitelial esta proteína desempenha um papel essencial na migração de células dendríticas e células T especificamente para os tecidos (Polgar et al., 2012, Vanbervliet et al., 2002). Também contribui para a diferenciação das células B (Van Limbergen et al., 2009).

Polgar (2012) estudou o polimorfismo rs2301436 tendo concluído que aumenta a suscetibilidade para a CU e não para a DC, apenas nos indivíduos homocigóticos para o alelo A (adenina) (Polgar et al., 2012).

Anderson (2009) estudou o SNP rs7749278, cujo alelo de risco é uma timina, tendo encontrado associação com a DC e não com a CU (Anderson et al., 2009).

d. ICOSLG

O gene *ICOSLG*, localizado no cromossoma 21q22, codifica o ligando indutor e co-estimulador das células T (ICOS) (Anderson et al., 2009). Esta é uma molécula co-estimuladora expressa nas células epiteliais do intestino e outros tecidos, com um papel importante na apresentação de antígenos e na regulação de linfócitos T da mucosa (Nakazawa et al., 2004, Van Limbergen et al., 2009).

Na ativação das células T *naïve* são necessários dois sinais para o funcionamento ótimo das APC. O primeiro é providenciado pelo reconhecimento específico do antígeno através da interação do complexo major de histocompatibilidade (MHC) com o recetor das células T, (TCR-CD3). O segundo é um sinal conduzido por moléculas co-estimuladoras expressas nas APC. A ausência deste estímulo pode conduzir à falta de resposta ou, inclusivamente, à apoptose. O ICOS é um co-estimulador, membro da família CD28, rapidamente induzido nas células T após ligação entre as células T e as APC, levando à proliferação das células T e à hipersecreção das citocinas IL-4, IL-10 e

IFN- γ , e à hipossecreção de IL-2. O ICOS é sobre expresso nas células Th2 e sub-expresso nas Th1 de ratinhos. O ligando do ICOS, ICOSLG (também chamado de B7h, B7RP-1, LICOS, B7-H2) é constitutivamente expresso nas células B e nos monócitos e é induzido nas células não-linfóides pela citocina inflamatória TNF- α (Lenschow et al., 1996, Sato et al., 2004).

Sato e colegas (2004) pesquisaram a presença de ICOSLG na mucosa intestinal de doentes com DII, tendo concluído que estava sobre expresso nas células B e nos macrófagos da mucosa inflamada (Sato et al., 2004).

Anderson (2009) estudou o polimorfismo rs762421, cujo alelo de risco é uma guanina, o qual aumenta a suscetibilidade para a DC mas não apresenta associação significativa com a CU (Anderson et al., 2009). Num estudo seguinte, Anderson (2011) identificou outro polimorfismo no gene *ICOSLG*, rs2838519, cujo alelo de risco também é uma guanina, mas esta variável aumenta a suscetibilidade para CU e para DC (Anderson et al., 2011)

e. TYK2

O gene *TYK2*, localizado no cromossoma 19p13, codifica a tirosina quinase 2, importante componente da via de sinalização da IL-23 e da sinalização de outras citocinas (Lee, 2011).

As tirosinas quinases são responsáveis pela fosforilação e modelação da atividade enzimática. Consoante a sua organização celular estão divididas em moléculas recetoras e não-recetoras, estas últimas com localização citoplasmática. *TYK2* é uma tirosina quinase não-recetora, que pertence à família da Janus quinase (JAK) (Avila, 2010).

A maior parte das citocinas transduzem os seus sinais através das quinases da família JAK, que estão constitutivamente associadas a recetores de citocinas. Nos mamíferos foram descritas quatro proteínas JAK: JAK 1, JAK2, JAK3 e *TYK2*. Quando as citocinas se ligam ao seu recetor específico na superfície da célula, os recetores JAK associados são ativados e fosforilam quer os recetores das citocinas quer os recetores JAK vizinhos e também os STAT que entretanto se ligaram. O STAT dimeriza após fosforilação o que lhe permite translocar-se para o núcleo, onde ativa diferentes genes (Minegishi et al., 2006).

O TYK2 localiza-se na subunidade $\beta 1$ do recetor da IL-12, IL12RB1, e na gp130 do recetor da IL-6, IL6R. Quando a IL-23 se ligar ao seu recetor, composto pelo IL23R e IL12RB1, JAK é induzido no IL23R e TYK2 é induzido no IL12RB1, o que resulta na indução, fosforilação, homodimerização e translocação para o núcleo do STAT. Este, por ação da IL-23, induz a produção de IL-17, citocina pró-inflamatória das células NK e células T NK, TCD4+ e TCD8+. Esta cascata de sinalização desempenha também um papel importante na diferenciação das células CD4+ *naïve* em células Th17, que produzem IL-17A, IL-17F e IL-22, envolvidas na primeira linha de defesa através do controlo da resposta imune (Sato et al., 2009).

Sato e colegas (2009) estudaram 2 SNPs que aumentam a suscetibilidade para a DC, rs280519, homozigóticos AA e rs2304256, homozigóticos CC. O grupo de Sato designou estes dois SNP como haplotipo 1 (Hap1) e observaram que aumentava o risco de DC. Além disso, o diplotipo 1, homozigóticos Hap1/ Hap1, ainda predispunha mais para a DC. Ao analisar as interações genéticas entre o polimorfismo identificado do STAT3, rs2293152 com o genótipo CC, que aumenta de forma independente a DC, e o diplotipo Hap1/Hap1, o risco para DC é exponenciado. Estes polimorfismos afetam a eficiência de via da IL-23/IL23R, pelo que se pensa que conduz à perpetuação da inflamação intestinal, resultando no despoletar ou no desenvolvimento de DC. A combinação destes SNP pode vir a ser um biomarcador para identificar indivíduos com alto risco de desenvolver DC e futuramente, um alvo terapêutico (Sato et al., 2009).

ii. Orquestração da resposta imune secundária

a. *IL-10 e IL10R*

O gene da *IL-10* localiza-se no cromossoma 1q32.1 e codifica a IL-10, uma citocina imunossupressora. A IL-10 atua através das vias de sinalização mediadas pelo STAT3 e MAPK para desenvolver mecanismos anti-inflamatórios supressores de citocinas (Franke et al., 2008b).

A IL-10 restringe respostas imunitárias excessivas. É libertada por uma grande variedade de células, tendo efeitos pleotrópicos sobre células T, B, mieloides, entre outras. Quando libertada pelas células Th2 inibe a secreção das citocinas Th1, tal como a IL-2 e o IFN- γ . Além disso, limita a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias como a IL-12 e o TNF- α (Glocker et al., 2009).

O grupo de Franke (2008) identificou vários SNP no gene *IL-10*, sendo o rs3024505 o que obteve maior significado estatístico (Franke et al., 2008b).

Franke e colegas observaram que ratinhos sem o gene *IL-10* desenvolviam colite espontânea, provavelmente devido à falta de regulação anti-inflamatória face à flora comensal. Além disso, a administração de IL-10 a indivíduos com CU tem demonstrado efeitos clínicos positivos. Assim, defendem que defeitos na função da IL-10 têm um papel central na patogênese da CU, sem associação com a DC (Franke et al., 2008b).

O recetor da IL-10, IL10R, é formado por duas moléculas α , IL10R1, e duas moléculas β , IL10R2. Embora a IL10R1 seja específica da IL10, a IL10R2 é partilhada com vários recetores de citocinas, como IL22R e IL26R. A junção deste heterotetrâmero conduz à ativação de recetores associados à Janus tirosina quinase, JAK1 e TIK2, que resulta na fosforilação do STAT3 e induz os genes dependentes do STAT3. Ratinhos com deficiência na IL-10 ou na IL10R2 apresentaram enterocolite grave, o que demonstra o papel fundamental da IL-10 no controlo da inflamação intestinal (Glocker et al., 2009).

O gene *IL10RA* codifica a proteína IL10R1 e o gene *IL10RB* a proteína IL10R2. Glocker e colegas (2009) identificaram três mutações homozigóticas, uma no gene *IL10RB* e duas no gene *IL10RA* (Glocker et al., 2009).

No *IL10RB* identificaram uma mutação *nonsense*, *c.G477A*, *p.Trp159X* (ou *W159X*), em que uma guanina é substituída por uma adenina no nucleótido 477, o que se traduz a nível proteico pela substituição de um triptofano da posição 159 por um codão stop prematuro (Glocker et al., 2009).

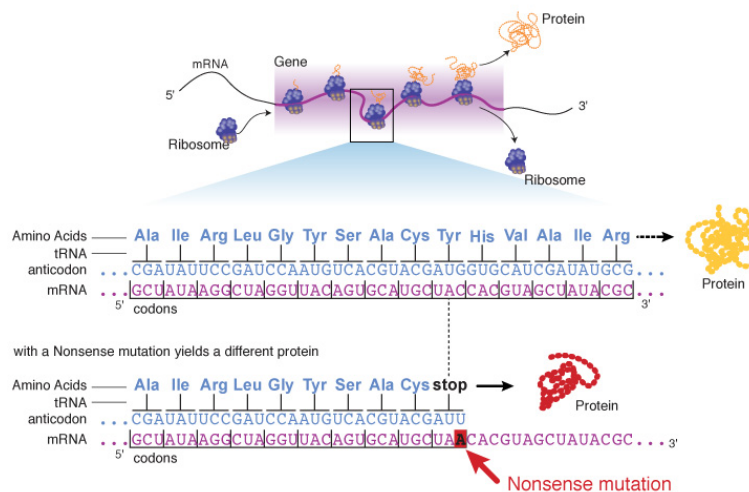


Figura 7. Mutação *nonsense*

Adaptado de <http://www.genome.gov/glossary/index.cfm?id=138>

Uma mutação *nonsense* (Figura 7) consiste na substituição de um único par de bases, que conduz ao aparecimento de um codão stop prematuro ficando a proteína mais curta e sem atividade (Biesecker).

No gene *IL10RA* identificaram duas mutações *missense*, a *c.G421A, p.Gly141Arg*, em que uma guanina é substituída por uma adenina no nucleótido 421, que se traduz em termos proteicos na substituição do aminoácido glicina na posição 141 por uma arginina; e a *c.C325T, p.Thr84I*, em que a citosina do nucleótido 325 é substituída por uma timina, o que se traduz na alteração do aminoácido treonina 84 por uma isoleucina (Glocker et al., 2009).

As três mutações apresentadas pelo grupo de Glocker podem ser encontradas em crianças com enterocolite severa, manifestada no primeiro ano de vida. O fenótipo comum em indivíduos com deficiências nos *IL10R1* e *IL10R2* é a presença de DII severa (Glocker et al., 2009).

Glocker e colegas (2009) observaram que as variantes do recetor da IL-10 encontradas conduziram à ativação indevida e prolongada das células mononucleares expostas a partículas bacterianas, o que se traduziu no aumento do efluxo de citocinas inflamatórias, como o $\text{TNF-}\alpha$, com conseqüente dano na mucosa. O transplante alogénico de células estaminais levado a cabo pelo grupo de Glocker conduziu à remissão da DII, mostrando-se uma abordagem muito promissora (Glocker et al., 2009).

b. IL12B

O gene que codifica a IL12B localiza-se no cromossoma 5q33, codifica a subunidade p40 partilhada pela IL-12 e IL-23 (Lee, 2011).

A IL-12 é um heterodímero constituído pela IL-12p35 (codificada pelo gene *IL-12A*) e pela IL-12p40 (codificada pelo gene *IL-12B*) (Van Wanrooij et al., 2012).

A IL-12 é produzida pelas APC, células fagocíticas e células B em resposta a infeções e favorece a maturação das células T CD4+ naïve em células pró-inflamatórias Th1, as quais secretam IFN- γ . Além disso, tem a capacidade de estimular a produção de linfócitos T citotóxicos e de células NK, bem como induzir a sua atividade citotóxica,

ao mesmo tempo que suprime a diferenciação das células Th2 (Van Wanrooij et al., 2012).

Segundo Murphy (2003), embora a IL-12 favoreça a resposta das células Th1 e a produção de IFN- γ numa fase inicial da resposta imune, numa fase tardia da inflamação desempenha um papel imuno-regulador quando a IL-23 estimula a inflamação (Murphy et al., 2003).

Embora a IL-23 seja a citocina chave na regulação do processo inflamatório, estudos em ratinhos modificados sem o gene da IL-23 demonstraram um aumento da produção de IL-12 pelas células dendríticas do intestino em resposta à ausência do efeito regulatório da IL-23, o que demonstra a sua interligação (Siegmond and Zeitz, 2011).

Anderson (2011) e colegas identificaram polimorfismos no gene *IL12B* associados à DC e à CU, o rs6871626 e o rs6556416, ambos com o alelo de risco adenina (Anderson et al., 2011, Lee, 2011).

Noutro estudo, Anderson (2009) identificou o SNP rs10045431, com o alelo de risco citosina, que aumenta a suscetibilidade para a CU e DC (Anderson et al., 2009, Thompson and Lees, 2011, Van Wanrooij et al., 2012).

Dois estudos independentes, Fisher (2008) e Franke (2008) estudaram o SNP rs6887695, com o alelo de risco C, associado à DC e CU (Fisher et al., 2008, Franke et al., 2008a, Van Wanrooij et al., 2012).

Apesar dos polimorfismos identificados, Van Wanrooij (2012) afirma que o papel das variações genéticas continua por esclarecer, pelo que defende a necessidade de novos estudos (Van Wanrooij et al., 2012).

c. Região HLA

A região do complexo major de histocompatibilidade (MHC) designada nos humanos por antígeno humano leucocitário (HLA) localiza-se no cromossoma 6p21.3 e é a área com maior associação à DII. Além do NOD2/CARD15, esta é a única região associada a características fenotípicas comprovadas, nomeadamente quanto à localização da doença (Ahmad et al., 2006, Thompson and Lees, 2011).

A região do HLA está dividida em 3 partes, as chamadas regiões clássicas englobam a classe I e classe II, e existe ainda uma classe III. A região HLA contém 224 genes, entre os quais estão os genes altamente polimórficos das classes I e II essenciais ao funcionamento correto dos leucócitos (Yap et al., 2004).

Existem três tipos de moléculas do HLA da classe II, a classe mais estudada, HLA-DP, -DQ e -DR. A nomenclatura das moléculas do HLA é composta por um conjunto de letras que sumariza o nome da molécula, da cadeia, o número do gene que a codifica, um asterisco indica que se trata de uma molécula e número do alelo. Assim, *HLA-DRB1*0104* corresponde ao alelo 0104 no primeiro gene da cadeia β de uma molécula de HLA-DR (Stokkers et al., 1999).

Os genes do HLA codificam glicoproteínas da superfície celular que apresentam péptidos modificados aos recetores das células T. As moléculas da classe I expressam-se em todas as células nucleadas e são constituídas por uma cadeia leve (codificada por três genes altamente polimórficos, *HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*) ligada à β 2-microglobulina e apresentam os péptidos às células CD8⁺. As moléculas da classe II apenas se expressam em células imunitárias especializadas e são constituídas por cadeias α e β . De entre os genes que codificam as cadeias α da classe II o DA e DQA são altamente polimórficos, enquanto que o DRA é invariável. As cadeias β são codificadas pelos genes polimórficos *DP β 1*, *DQ β 1* e *DR β 1*. A duplicação de genes levou ao aparecimento de novos genes, *DR β 3*, 4 e 5, que são expressos juntamente com DR α em baixos níveis à superfície das células. As moléculas da classe II apresentam os péptidos às células T CD4⁺ (Ahmad et al., 2006, Yap et al., 2004).

O mecanismo através do qual os genes clássicos do HLA exercem influência na DII não está completamente esclarecido. No entanto, pensa-se que está relacionado com os polimorfismos em regiões localizadas no sulco de ligação que interage com as cadeias laterais ou resíduos de ancoragem dos péptidos. Assim, diferentes moléculas de HLA ligam-se a diferentes péptidos dentro de uma proteína ou ligam-se ao mesmo péptido com diferentes afinidades (Yap et al., 2004). Polimorfismos fora dos locais de ligação aos péptidos podem alterar a ligação às células T ou a expressão da molécula de HLA (Stokkers et al., 1999).

A maior parte dos estudos associa a DII a genes das classes I e II, especialmente desta última. De notar que embora a região HLA se relacione com a CU e com a DC, a maior parte das associações são diferentes para cada uma das patologias, embora algumas sejam comuns (Yap et al., 2004).

Apesar dos inúmeros estudos acerca do complexo HLA, também denominado IBD3, existem muitas dúvidas em relação a esta região do genoma e os estudos não são conclusivos. Os investigadores pensam que se deve ao forte LD presente entre muitos genes do HLA, aos inúmeros polimorfismos que apresenta e à grande densidade genética desta região (Ahmad et al., 2006).

1. TNF

O gene *TNF*, pertence à classe III do HLA, codifica uma citocina pró-inflamatória que se encontra aumentada na mucosa, soro e fezes na DII. Vários polimorfismos foram identificados na região do promotor do gene TNF, no entanto os estudos não produziram dados consistentes (Ahmad et al., 2006, Yap et al., 2004).

Vários estudos associaram os homocigóticos *TNF-857CC* com risco aumentado para DC e CU. No entanto, os estudos diferem quanto à presença concomitante de variantes do gene NOD2/CARD15, uns defendem que o *TNF-857CC* apenas tem relevância na ausência destas variantes e outros apenas na presença das variantes (Ahmad et al., 2006, O'callaghan et al., 2003, Van Heel et al., 2004).

Outro estudo observou que o alelo protetor *-857T* está em LD com o DRB1*0301, o qual segundo alguns investigadores é um alelo protetor para a DC (Ahmad et al., 2006, Ahmad et al., 2003).

Na região do promotor do *TNF* foram identificados vários polimorfismos, uns relacionados com a DC e outros com a CU. Relativamente à DC foi associada ao *TNF-1031C*, *TNF-863A* e *TNF-308A* (Ahmad et al., 2006, Levine et al., 2005, Negoro et al., 1999). Quanto ao *TNF-308A* parece estar especificamente presente na DC colónica (Ahmad et al., 2002, Ahmad et al., 2006, Ferreira et al., 2005, Louis et al., 2000). Alguns estudos também associaram o *TNF-308A* à CU (Ahmad et al., 2006, Bouma et al., 1996, Sashio et al., 2002).

2. MIC

Os genes *MIC*, são uma família de genes não clássicos relacionada com HLA classe-I, composta por sete membros *MICA*, *MICB*, *MICC*, *MICD*, *MICE*, *MICF*, *MICG*. Localizam-se na região do HLA, entre a classe I e III. Os genes *MICA* e *MICB* não apresentam péptidos e são expressos sobretudo na superfície basolateral das células do epitélio gastrointestinal, mas também em fibroblastos, células dendríticas e endoteliais. As proteínas MIC ligam-se ao recetor NKG2D, expresso nas células NK, CD8⁺αβ e macrófagos, levando à ativação da imunidade inata e adaptativa. A expressão das MIC é regulada pelas proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*, HSP) e está aumentada em resposta ao stresse celular, como infeção viral ou bacteriana (Yap et al., 2004) (Ahmad et al., 2006).

Investigadores levantaram a hipótese que os polimorfismos nas MIC induzem a ativação do sistema imune contribuindo desta forma para a inflamação descontrolada característica da DII. Estudos verificaram que a expressão de *MICA* está aumentada nas biópsias colónicas dos indivíduos com DC, no entanto, o estudo dos polimorfismos do gene *MICA* e dos outros genes *MIC* não foram conclusivos (Ahmad et al., 2006, Yap et al., 2004). Um estudo Japonês associou o *MICA-A6* à CU, no entanto parece estar também ligado ao alelo adjacente *B*52*. Investigadores Britânicos associaram o *MICA*010* em LD com o *B*1501* à DC com atingimento perianal, no entanto, este resultado necessita de confirmação (Ahmad et al., 2002, Ahmad et al., 2006, Seki et al., 2001).

3. HSP

Os genes que codificam as HSP localizam-se na classe III do HLA. As HSP expressam-se constitutivamente e em resposta a agentes promotores de stresse. Ligam-se a proteínas e péptidos desenrolados, atuando como chaperonas na sua síntese, enrolamento, montagem, translocação e degradação, quer seja durante o processo celular normal quer seja em resposta ao stresse. Um estudo Japonês associou um polimorfismo na HSP70-2, *A1267G*, à DC, no entanto estudos posteriores não foram capazes de confirmar esta associação (Yap et al., 2004).

III. CONCLUSÃO

O conhecimento atual dos *loci* de susceptibilidade da DII não esclareceu completamente os mecanismos que conduzem à patogênese da doença (Lee, 2011).

Na realidade, a análise genótipo-fenótipo na DII não tem tido progressos significativos. Além da associação do NOD2 com a DC ileal estenosante/penetrante só alguns polimorfismos como os da região HLA foram capazes de identificar características fenotípicas, tal como a associação entre o HLA-DRB1*0103 e a CU extensa e severa (Lees et al., 2011).

Assim, não é de estranhar que, apesar dos progressos na identificação dos *loci* de susceptibilidade para a DII, estes desenvolvimentos tenham resultado num reduzido número de aplicações clínicas novas. É necessário continuar a investigar se a presença de determinados polimorfismos condiciona a resposta a diferentes terapêuticas, o que poderá resultar na seleção da terapêutica apropriada para o doente de acordo com o seu perfil genético (Lee, 2011). Na verdade, já são usados estudos genéticos para predizer a sensibilidade à terapêutica da DII, como a 6-mercaptopurina, e podem vir a ser úteis na previsão da resposta às terapias biológicas (Khor et al., 2011).

Os polimorfismos genéticos identificados têm um efeito individual modesto na predisposição para a DII, pelo que é fundamental elucidar a forma como essas variáveis se relacionam, as interações gene-gene, e conseqüentemente como influenciam a resposta inflamatória (Polgar et al., 2012). O efeito modesto pode também estar relacionado com a importância de certos fatores ambientais para o desenvolvimento da DII, tais como nutrição, hábitos de higiene, colonização com certos microrganismos despoletadores. Na verdade, evidências epidemiológicas defendem que fatores ambientais estão envolvidos na iniciação ou perpetuação de doenças crónicas e que as variáveis epigenéticas podem ser a peça que falta no puzzle que liga o genoma humano, ambiente e desenvolvimento de fenótipos. Um exemplo já referido é o dos ratinhos com o polimorfismo *ATG16L1* mantidos em ambiente *germ-free* não desenvolverem colite espontânea até serem infetados com um vírus (Renz et al., 2011).

Apesar dos progressos no conhecimento da DII, atualmente, ainda não se consegue dar recomendações específicas às famílias com DII, no que respeita a conselhos genéticos ou ambientais, pelo que se aguardam grandes estudos prospetivos (Nunes et al., 2011).

A descoberta dos polimorfismos associados à DC ou CU, revelou associação das patologias com diferentes mecanismos. Quanto à CU os novos dados apontam para a barreira epitelial e a via da IL10 como as mais promissoras áreas de intervenção (Thompson and Lees, 2011). Já na DC, a inflamação transmural do cólon é causada por defeitos na imunidade inata e no acesso das bactérias às camadas mais profundas da parede intestinal (Parkes, 2012). Assim, é necessário um maior esclarecimento destes mecanismos para atuar precocemente.

Investigadores defendem a importância de aumentar o tamanho das coortes a fim de aumentar o poder de identificação de fenótipos. Em grandes coortes é possível comparar os indivíduos que respondem a uma terapia com os que não respondem, identificando os polimorfismos associados ao fracasso do tratamento o que resulta em terapia personalizada e, por isso, mais eficaz (Lee, 2011).

Os conhecimentos mais recentes da patogénese da DII já foram aplicados nas novas terapias que têm como alvo a autofagia e a via da IL-23, com alguns resultados promissores (Lee, 2011).

Os profundos avanços no conhecimento da DII aumentam a esperança no desenvolvimento de novas terapias mais dirigidas individualmente e no surgimento de estratégias preventivas verdadeiramente eficazes em indivíduos já identificados com risco de DII (Lee, 2011).

IV. BIBLIOGRAFIA

- Abraham, C. & Cho, J. H. 2009. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 361, 2066-78.
- Ahmad, T., *et alii*. 2002. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology*, 122, 854-66.
- Ahmad, T., *et alii*. 2006. Genetics of inflammatory bowel disease: the role of the HLA complex. *World J Gastroenterol*, 12, 3628-35.
- Ahmad, T., *et alii*. 2003. Haplotype-specific linkage disequilibrium patterns define the genetic topography of the human MHC. *Hum Mol Genet*, 12, 647-56.
- Ahn, S. H., *et alii*. 2008. Hepatocyte nuclear factor 4alpha in the intestinal epithelial cells protects against inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*, 14, 908-20.
- Akira, S., *et alii*. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, 783-801.
- Anderson, C. A., *et alii*. 2011. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet*, 43, 246-52.
- Anderson, C. A., *et alii*. 2009. Investigation of Crohn's disease risk loci in ulcerative colitis further defines their molecular relationship. *Gastroenterology*, 136, 523-9 e3.
- Austin, C. P. *Missense Mutation* [Online]. Available: <http://www.genome.gov/glossary/index.cfm?id=127> [Accessed 07-11 2012].
- Avila, C. M. R., N. C. 2010. Proteínas tirosinas quinases: Desafios do desenvolvimento de fármacos para a terapia do cancer. *Revista Virtual de Química*, 2, 59-82.
- Ayabe, T., *et alii*. 2000. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol*, 1, 113-8.
- Azevedo, L. F., *et alii*. 2010. Estimating the prevalence of inflammatory bowel disease in Portugal using a pharmaco-epidemiological approach. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 19, 499-510.
- Barrett, J. C., *et alii*. 2009. Genome-wide association study of ulcerative colitis identifies three new susceptibility loci, including the HNF4A region. *Nat Genet*, 41, 1330-4.
- Baumgart, D. C. & Sandborn, W. J. 2012. Crohn's disease. *Lancet*.

- Beaugerie, L., *et alii*. 2001. Impact of cessation of smoking on the course of ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol*, 96, 2113-6.
- Bentley, E., *et alii*. 2002. How could pathologists improve the initial diagnosis of colitis? Evidence from an international workshop. *J Clin Pathol*, 55, 955-60.
- Berner, J. & Kiaer, T. 1986. Ulcerative colitis and Crohn's disease on the Faroe Islands 1964-83. A retrospective epidemiological survey. *Scand J Gastroenterol*, 21, 188-92.
- Bettelli, E., *et alii*. 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature*, 453, 1051-7.
- Biesecker, L. G. *Nonsense Mutation* [Online]. Available: <http://www.genome.gov/glossary/index.cfm?id=138> [Accessed 2012-08-22 2012].
- Birrenbach, T. & Bocker, U. 2004. Inflammatory bowel disease and smoking: a review of epidemiology, pathophysiology, and therapeutic implications. *Inflamm Bowel Dis*, 10, 848-59.
- Boland, C. R. 2010. Chronic inflammation, colorectal cancer and gene polymorphisms. *Dig Dis*, 28, 590-5.
- Bouatrouss, Y., *et alii*. 2000. Altered expression of laminins in Crohn's disease small intestinal mucosa. *Am J Pathol*, 156, 45-50.
- Bouma, G., *et alii*. 1996. Distribution of four polymorphisms in the tumour necrosis factor (TNF) genes in patients with inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol*, 103, 391-6.
- Bousvaros, A., *et alii*. 2007. Differentiating ulcerative colitis from Crohn disease in children and young adults: report of a working group of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and the Crohn's and Colitis Foundation of America. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 44, 653-74.
- Brand, S., *et alii*. 2005. The role of Toll-like receptor 4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and CARD15/NOD2 mutations in the susceptibility and phenotype of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 11, 645-52.
- Brest, P., *et alii*. 2011. A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease. *Nat Genet*, 43, 242-5.

- Buisine, M. P., *et alii*. 1999. Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 5, 24-32.
- Cadwell, K., *et alii*. 2008. A key role for autophagy and the autophagy gene Atg1611 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature*, 456, 259-63.
- Cario, E. 2010. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis*, 16, 1583-97.
- Carter, M. J., *et alii*. 2004. Guidelines for the management of inflammatory bowel disease in adults. *Gut*, 53 Suppl 5, V1-16.
- Chan, I., *et alii*. 2007. The molecular basis of lipoid proteinosis: mutations in extracellular matrix protein 1. *Exp Dermatol*, 16, 881-90.
- Coffman, R. L., *et alii*. 2009. Transforming growth factor beta specifically enhances IgA production by lipopolysaccharide-stimulated murine B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 199. 170: 1039-1044. *J Immunol*, 182, 8-13.
- Collins, F. S. *Polymorphisms* [Online]. Available: <http://www.genome.gov/glossary/index.cfm?id=160> [Accessed 09-22-2012 2012].
- Cong, Y., *et alii*. 2002. Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora. *J Immunol*, 169, 6112-9.
- Cooney, R., *et alii*. 2010. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med*, 16, 90-7.
- Cosnes, J. 2008. Crohn's disease phenotype, prognosis, and long-term complications: what to expect? *Acta Gastroenterol Belg*, 71, 303-7.
- Cosnes, J., *et alii*. 2002a. Effects of appendicectomy on the course of ulcerative colitis. *Gut*, 51, 803-7.
- Cosnes, J., *et alii*. 2002b. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 8, 244-50.
- Cosnes, J., *et alii*. 2011. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*, 140, 1785-94.
- Danese, S. & Fiocchi, C. 2011. Ulcerative colitis. *N Engl J Med*, 365, 1713-25.
- De Jager, P. L., *et alii*. 2007. The role of the Toll receptor pathway in susceptibility to inflammatory bowel diseases. *Genes Immun*, 8, 387-97.

- Di Meglio, P., *et alii*. 2011. The IL23R R381Q gene variant protects against immune-mediated diseases by impairing IL-23-induced Th17 effector response in humans. *PLoS One*, 6, e17160.
- Di Meglio, P. & Nestle, F. O. 2010. The role of IL-23 in the immunopathogenesis of psoriasis. *F1000 Biol Rep*, 2.
- Dogan, A., *et alii*. 1995. E-cadherin expression in intestinal epithelium. *J Clin Pathol*, 48, 143-6.
- Duerr, R. H., *et alii*. 2006. A genome-wide association study identifies IL23R as an inflammatory bowel disease gene. *Science*, 314, 1461-3.
- Duricova, D., *et alii*. 2010. Overall and cause-specific mortality in Crohn's disease: a meta-analysis of population-based studies. *Inflamm Bowel Dis*, 16, 347-53.
- Economou, M., *et alii*. 2004. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am J Gastroenterol*, 99, 2393-404.
- Ferguson, L. R., *et alii*. 2010. Genetic factors in chronic inflammation: single nucleotide polymorphisms in the STAT-JAK pathway, susceptibility to DNA damage and Crohn's disease in a New Zealand population. *Mutat Res*, 690, 108-15.
- Ferreira, A. C., *et alii*. 2005. NOD2/CARD15 and TNFA, but not IL1B and IL1RN, are associated with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 11, 331-9.
- Fireman, Z., *et alii*. 1989. Epidemiology of Crohn's disease in the Jewish population of central Israel, 1970-1980. *Am J Gastroenterol*, 84, 255-8.
- Fisher, S. A., *et alii*. 2008. Genetic determinants of ulcerative colitis include the ECM1 locus and five loci implicated in Crohn's disease. *Nat Genet*, 40, 710-2.
- Francoeur, C., *et alii*. 2004. Proinflammatory cytokines TNF-alpha and IFN-gamma alter laminin expression under an apoptosis-independent mechanism in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 287, G592-8.
- Franke, A., *et alii*. 2008a. Replication of signals from recent studies of Crohn's disease identifies previously unknown disease loci for ulcerative colitis. *Nat Genet*, 40, 713-5.
- Franke, A., *et alii*. 2008b. Sequence variants in IL10, ARPC2 and multiple other loci contribute to ulcerative colitis susceptibility. *Nat Genet*, 40, 1319-23.

- Frisch, M., *et alii*. 2001. Appendectomy and subsequent risk of inflammatory bowel diseases. *Surgery*, 130, 36-43.
- Frye, M., *et alii*. 2000. Differential expression of human alpha- and beta-defensins mRNA in gastrointestinal epithelia. *Eur J Clin Invest*, 30, 695-701.
- Fujino, S., *et alii*. 2003. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut*, 52, 65-70.
- Fuss, I. J., *et alii*. 2004. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest*, 113, 1490-7.
- Gersemann, M., *et alii*. 2009. Differences in goblet cell differentiation between Crohn's disease and ulcerative colitis. *Differentiation*, 77, 84-94.
- Gersemann, M., *et alii*. 2011. From intestinal stem cells to inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 17, 3198-203.
- Gersemann, M., *et alii*. 2012. Innate immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *J Intern Med*, 271, 421-8.
- Gewirtz, A. T., *et alii*. 2006. Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 290, G1157-63.
- Giachino, D., *et alii*. 2004. Analysis of the CARD15 variants R702W, G908R and L1007fs in Italian IBD patients. *Eur J Hum Genet*, 12, 206-12.
- Gilat, T., *et alii*. 1987. Childhood factors in ulcerative colitis and Crohn's disease. An international cooperative study. *Scand J Gastroenterol*, 22, 1009-24.
- Girardin, S. E., *et alii*. 2003. Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem*, 278, 8869-72.
- Glocker, E. O., *et alii*. 2009. Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10 receptor. *N Engl J Med*, 361, 2033-45.
- Guerreiro, R., *et alii*. 2011. [The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions]. *Acta Med Port*, 24 Suppl 4, 967-76.
- Halfvarson, J., *et alii*. 2003. Inflammatory bowel disease in a Swedish twin cohort: a long-term follow-up of concordance and clinical characteristics. *Gastroenterology*, 124, 1767-73.

- Hamon, J. F., *et alii*. 1993. [The risk of extra-colonic extension in Crohn's colitis]. *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)*, 29, 1-10.
- Hampe, J., *et alii*. 2001. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in German and British populations. *Lancet*, 357, 1925-8.
- Hampe, J., *et alii*. 2007. A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat Genet*, 39, 207-11.
- Heller, F., *et alii*. 2005. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*, 129, 550-64.
- Henriksen, M., *et alii*. 2006. Ulcerative colitis and clinical course: results of a 5-year population-based follow-up study (the IBSEN study). *Inflamm Bowel Dis*, 12, 543-50.
- Himmel, M. E., *et alii*. 2012. Regulatory T-cell therapy for inflammatory bowel disease: more questions than answers. *Immunology*, 136, 115-22.
- Hindorff, L. A., *et alii*. 2009. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 9362-7.
- Hoie, O., *et alii*. 2007. Ulcerative colitis: patient characteristics may predict 10-yr disease recurrence in a European-wide population-based cohort. *Am J Gastroenterol*, 102, 1692-701.
- Holtta, V., *et alii*. 2008. IL-23/IL-17 immunity as a hallmark of Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 14, 1175-84.
- Hrdlickova, B., *et alii*. 2011. Celiac disease: moving from genetic associations to causal variants. *Clin Genet*, 80, 203-313.
- Hue, S., *et alii*. 2006. Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med*, 203, 2473-83.
- Hugot, J. P., *et alii*. 2001. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, 599-603.
- Inohara, N., *et alii*. 2003. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J Biol Chem*, 278, 5509-12.

- Joo, M. & Odze, R. D. 2010. Rectal sparing and skip lesions in ulcerative colitis: a comparative study of endoscopic and histologic findings in patients who underwent proctocolectomy. *Am J Surg Pathol*, 34, 689-96.
- Karayiannakis, A. J., *et alii*. 1998. Expression of catenins and E-cadherin during epithelial restitution in inflammatory bowel disease. *J Pathol*, 185, 413-8.
- Khor, B., *et alii*. 2011. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature*, 474, 307-17.
- Kobayashi, K., *et alii*. 2001. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc Res Tech*, 53, 241-5.
- Koslowski, M. J., *et alii*. 2009. Genetic variants of Wnt transcription factor TCF-4 (TCF7L2) putative promoter region are associated with small intestinal Crohn's disease. *PLoS One*, 4, e4496.
- Koutroubakis, I. E., *et alii*. 2002. Role of appendicitis and appendectomy in the pathogenesis of ulcerative colitis: a critical review. *Inflamm Bowel Dis*, 8, 277-86.
- Langholz, E., *et alii*. 1994. Course of ulcerative colitis: analysis of changes in disease activity over years. *Gastroenterology*, 107, 3-11.
- Lee, J. M. a. P., M. 2011. 100 Genes for IBD... Whatever Next!? *Inflamm Bowel Dis Monit*, 11, 103-11.
- Lee, J. W., *et alii*. 2008. Differential regulation of chemokines by IL-17 in colonic epithelial cells. *J Immunol*, 181, 6536-45.
- Leedham, S. J., *et alii*. 2005. Intestinal stem cells. *J Cell Mol Med*, 9, 11-24.
- Lees, C. W., *et alii*. 2011. New IBD genetics: common pathways with other diseases. *Gut*, 60, 1739-53.
- Lees, C. W. & Satsangi, J. 2009. Genetics of inflammatory bowel disease: implications for disease pathogenesis and natural history. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 3, 513-34.
- Lennard-Jones, J. E. & Shivananda, S. 1997. Clinical uniformity of inflammatory bowel disease a presentation and during the first year of disease in the north and south of Europe. EC-IBD Study Group. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 9, 353-9.
- Lenschow, D. J., *et alii*. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*, 14, 233-58.

- Levine, A., *et alii*. 2005. A polymorphism in the TNF-alpha promoter gene is associated with pediatric onset and colonic location of Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 100, 407-13.
- Levine, B. & Kroemer, G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132, 27-42.
- Loftus, E. V., Jr. 2004. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology*, 126, 1504-17.
- Louis, E., *et alii*. 2001. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. *Gut*, 49, 777-82.
- Louis, E., *et alii*. 2000. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism in Crohn's disease (CD): influence on disease behaviour? *Clin Exp Immunol*, 119, 64-8.
- Mahid, S. S., *et alii*. 2006. Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Mayo Clin Proc*, 81, 1462-71.
- Manolio, T. A. 2010. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med*, 363, 166-76.
- Matsuda, A., *et alii*. 2003. Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene*, 22, 3307-18.
- Meyer-Hoffert, U., *et alii*. 2008. Secreted enteric antimicrobial activity localises to the mucus surface layer. *Gut*, 57, 764-71.
- Minegishi, Y., *et alii*. 2006. Human tyrosine kinase 2 deficiency reveals its requisite roles in multiple cytokine signals involved in innate and acquired immunity. *Immunity*, 25, 745-55.
- Ministro, P. 2008. Diagnóstico de doença de Crohn e índices de actividade. In: Gedii (ed.) *Doença Inflamatória Intestinal Tópicos de relevância clínica*.
- Moehle, C., *et alii*. 2006. Aberrant intestinal expression and allelic variants of mucin genes associated with inflammatory bowel disease. *J Mol Med (Berl)*, 84, 1055-66.
- Molodecky, N. A., *et alii*. 2012. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology*, 142, 46-54 e42.

- Mottet, C., *et alii*. 2003. Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, 170, 3939-43.
- Moum, B., *et alii*. 1999. Change in the extent of colonoscopic and histological involvement in ulcerative colitis over time. *Am J Gastroenterol*, 94, 1564-9.
- Muise, A. M., *et alii*. 2009. Polymorphisms in E-cadherin (CDH1) result in a mis-localised cytoplasmic protein that is associated with Crohn's disease. *Gut*, 58, 1121-7.
- Munkholm, P., *et alii*. 1995. Disease activity courses in a regional cohort of Crohn's disease patients. *Scand J Gastroenterol*, 30, 699-706.
- Murphy, C. A., *et alii*. 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 198, 1951-7.
- Nakazawa, A., *et alii*. 2004. The expression and function of costimulatory molecules B7H and B7-H1 on colonic epithelial cells. *Gastroenterology*, 126, 1347-57.
- Negoro, K., *et alii*. 1999. Crohn's disease is associated with novel polymorphisms in the 5'-flanking region of the tumor necrosis factor gene. *Gastroenterology*, 117, 1062-8.
- Neuman, M. G. & Nanau, R. M. 2012. Single-nucleotide polymorphisms in inflammatory bowel disease. *Transl Res*, 160, 45-64.
- Nikolaus, S. & Schreiber, S. 2007. Diagnostics of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 133, 1670-89.
- Noble, C. L., *et alii*. 2008. Regional variation in gene expression in the healthy colon is dysregulated in ulcerative colitis. *Gut*, 57, 1398-405.
- Nostrant, T. T., *et alii*. 1987. Histopathology differentiates acute self-limited colitis from ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 92, 318-28.
- Nunes, T., *et alii*. 2011. Familial aggregation in inflammatory bowel disease: is it genes or environment? *World J Gastroenterol*, 17, 2715-22.
- O'callaghan, N. J., *et alii*. 2003. Association of TNF-alpha-857C with inflammatory bowel disease in the Australian population. *Scand J Gastroenterol*, 38, 533-4.
- Offermanns, S. 2001. In vivo functions of heterotrimeric G-proteins: studies in Galpha-deficient mice. *Oncogene*, 20, 1635-42.
- Ogura, Y., *et alii*. 2001. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*, 411, 603-6.

- Ostrander, E. A. *Frameshift Mutation* [Online]. Available: <http://www.genome.gov/glossary/index.cfm?id=68>. [Accessed 07-11 2012].
- Ouellette, A. J. 2004. Defensin-mediated innate immunity in the small intestine. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 18, 405-19.
- Ouellette, A. J. 2006. Paneth cell alpha-defensin synthesis and function. *Curr Top Microbiol Immunol*, 306, 1-25.
- Papo, N. & Shai, Y. 2003. Can we predict biological activity of antimicrobial peptides from their interactions with model phospholipid membranes? *Peptides*, 24, 1693-703.
- Parkes, M. 2012. Evidence from Genetics for a Role of Autophagy and Innate Immunity in IBD Pathogenesis. *Dig Dis*, 30, 330-3.
- Peschard, S., *et alii*. 1998. [Colonic involvement in ileal Crohn's disease]. *Gastroenterol Clin Biol*, 22, 594-600.
- Peyrin-Biroulet, L., *et alii*. 2010. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation is required for maintenance of innate antimicrobial immunity in the colon. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 8772-7.
- Peyrin-Biroulet, L. & Chamailard, M. 2007. NOD2 and defensins: translating innate to adaptive immunity in Crohn's disease. *J Endotoxin Res*, 13, 135-9.
- Pierik, M., *et alii*. 2006. Toll-like receptor-1, -2, and -6 polymorphisms influence disease extension in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*, 12, 1-8.
- Podolsky, D. K. 2002. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*, 347, 417-29.
- Polgar, N., *et alii*. 2012. Investigation of JAK2, STAT3 and CCR6 polymorphisms and their gene-gene interactions in inflammatory bowel disease. *Int J Immunogenet*, 39, 247-52.
- Radford-Smith, G. L., *et alii*. 2002. Protective role of appendectomy on onset and severity of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut*, 51, 808-13.
- Reinisch, W., *et alii*. 2003. An open-label trial of the selective cyclo-oxygenase-2 inhibitor, rofecoxib, in inflammatory bowel disease-associated peripheral arthritis and arthralgia. *Aliment Pharmacol Ther*, 17, 1371-80.
- Renz, H., *et alii*. 2011. Gene-environment interactions in chronic inflammatory disease. *Nat Immunol*, 12, 273-7.

- Ricarte Filho, J. C. & Kimura, E. T. 2006. [MicroRNAs: novel class of gene regulators involved in endocrine function and cancer]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 50, 1102-7.
- Robert, M. E., *et alii*. 2004. Patterns of inflammation in mucosal biopsies of ulcerative colitis: perceived differences in pediatric populations are limited to children younger than 10 years. *Am J Surg Pathol*, 28, 183-9.
- Roda, G., *et alii*. 2010. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol*, 16, 4264-71.
- Rosenstiel, P., *et alii*. 2009. Towards a molecular risk map--recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease. *Semin Immunol*, 21, 334-45.
- Rutgeerts, P., *et alii*. 1994. Appendectomy protects against ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 106, 1251-3.
- Sabath, E., *et alii*. 2008. Galpha12 regulates protein interactions within the MDCK cell tight junction and inhibits tight-junction assembly. *J Cell Sci*, 121, 814-24.
- Sandborn, W. J., *et alii*. 2002. A review of activity indices and efficacy endpoints for clinical trials of medical therapy in adults with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 122, 512-30.
- Sandborn, W. J., *et alii*. 2006. Safety of celecoxib in patients with ulcerative colitis in remission: a randomized, placebo-controlled, pilot study. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 4, 203-11.
- Sartor, R. B. 2006. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 3, 390-407.
- Sashio, H., *et alii*. 2002. Polymorphisms of the TNF gene and the TNF receptor superfamily member 1B gene are associated with susceptibility to ulcerative colitis and Crohn's disease, respectively. *Immunogenetics*, 53, 1020-7.
- Sato, K., *et alii*. 2009. Strong evidence of a combination polymorphism of the tyrosine kinase 2 gene and the signal transducer and activator of transcription 3 gene as a DNA-based biomarker for susceptibility to Crohn's disease in the Japanese population. *J Clin Immunol*, 29, 815-25.
- Sato, T., *et alii*. 2004. Hyperexpression of inducible costimulator and its contribution on lamina propria T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 126, 829-39.

- Schmehl, K., *et alii*. 2000. Deficiency of epithelial basement membrane laminin in ulcerative colitis affected human colonic mucosa. *Int J Colorectal Dis*, 15, 39-48.
- Schumacher, G., *et alii*. 1994. A prospective study of first attacks of inflammatory bowel disease and infectious colitis. Histologic course during the 1st year after presentation. *Scand J Gastroenterol*, 29, 318-32.
- Schwartz, D. A., *et alii*. 2001. Diagnosis and treatment of perianal fistulas in Crohn disease. *Ann Intern Med*, 135, 906-18.
- Seki, S. S., *et alii*. 2001. Stratification analysis of MICA triplet repeat polymorphisms and HLA antigens associated with ulcerative colitis in Japanese. *Tissue Antigens*, 58, 71-6.
- Selby, W. 1997. The natural history of ulcerative colitis. *Baillieres Clin Gastroenterol*, 11, 53-64.
- Shapira, M. & Tamir, A. 1992. Crohn's disease and the Jews. *J Clin Gastroenterol*, 15, 278-80.
- Shirazi, T., *et alii*. 2000. Mucins and inflammatory bowel disease. *Postgrad Med J*, 76, 473-8.
- Siegmund, B. & Zeitz, M. 2011. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 17, 3178-83.
- Silverberg, M. S., *et alii*. 2005. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: Report of a Working Party of the 2005 Montreal World Congress of Gastroenterology. *Can J Gastroenterol*, 19 Suppl A, 5-36.
- Slatkin, M. 2008. Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future. *Nat Rev Genet*, 9, 477-85.
- Solberg, I. C., *et alii*. 2009. Clinical course during the first 10 years of ulcerative colitis: results from a population-based inception cohort (IBSEN Study). *Scand J Gastroenterol*, 44, 431-40.
- Stange, E. F., *et alii*. 2008. European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*, 2, 1-23.
- Stokkers, P. C., *et alii*. 1999. HLA-DR and -DQ phenotypes in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Gut*, 45, 395-401.

- Su, C. G., *et alii*. 2002. Extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am*, 31, 307-27.
- Takeda, K. & Akira, S. 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 17, 1-14.
- Thia, K. T., *et alii*. 2008. An update on the epidemiology of inflammatory bowel disease in Asia. *Am J Gastroenterol*, 103, 3167-82.
- Thompson, A. I. & Lees, C. W. 2011. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 17, 831-48.
- Torok, H. P., *et alii*. 2009. Epistasis between Toll-like receptor-9 polymorphisms and variants in NOD2 and IL23R modulates susceptibility to Crohn's disease. *Am J Gastroenterol*, 104, 1723-33.
- Tremelling, M., *et alii*. 2007. IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 132, 1657-64.
- Turner, D., *et alii*. 2008. Severe paediatric ulcerative colitis: incidence, outcomes and optimal timing for second-line therapy. *Gut*, 57, 331-8.
- Van Assche, G., *et alii*. 2010. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Definitions and diagnosis. *J Crohns Colitis*, 4, 7-27.
- Van Der Sluis, M., *et alii*. 2006. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology*, 131, 117-29.
- Van Heel, D. A., *et alii*. 2004. Inflammatory bowel disease susceptibility loci defined by genome scan meta-analysis of 1952 affected relative pairs. *Hum Mol Genet*, 13, 763-70.
- Van Kruiningen, H. J., *et alii*. 2007. Familial Crohn's disease in Belgium: pedigrees, temporal relationships among cases, and family histories. *J Clin Gastroenterol*, 41, 583-90.
- Van Limbergen, J., *et alii*. 2009. The genetics of Crohn's disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 10, 89-116.
- Van Wanrooij, R. L., *et alii*. 2012. Genetic variations in interleukin-12 related genes in immune-mediated diseases. *J Autoimmun.*

- Vanbervliet, B., *et alii*. 2002. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur J Immunol*, 32, 231-42.
- Vavricka, S. R., *et alii*. 2011. Frequency and risk factors for extraintestinal manifestations in the Swiss inflammatory bowel disease cohort. *Am J Gastroenterol*, 106, 110-9.
- Vermeire, S. 2006. Review article: genetic susceptibility and application of genetic testing in clinical management of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 24 Suppl 3, 2-10.
- Vermeire, S., *et alii*. 2007a. Perianal Crohn's disease: classification and clinical evaluation. *Dig Liver Dis*, 39, 959-62.
- Vermeire, S., *et alii*. 2007b. Review article: Altering the natural history of Crohn's disease--evidence for and against current therapies. *Aliment Pharmacol Ther*, 25, 3-12.
- Washington, K., *et alii*. 2002. Histopathology of ulcerative colitis in initial rectal biopsy in children. *Am J Surg Pathol*, 26, 1441-9.
- Wehkamp, J., *et alii*. 2005. Defensin deficiency, intestinal microbes, and the clinical phenotypes of Crohn's disease. *J Leukoc Biol*, 77, 460-5.
- Yamamoto, K., *et alii*. 2005. Production of adiponectin, an anti-inflammatory protein, in mesenteric adipose tissue in Crohn's disease. *Gut*, 54, 789-96.
- Yamamoto-Furusho, J. K., *et alii*. 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) expression is downregulated in patients with active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*, 17, 680-1.
- Yang, X. O., *et alii*. 2007. STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem*, 282, 9358-63.
- Yap, L. M., *et alii*. 2004. The contribution of HLA genes to IBD susceptibility and phenotype. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 18, 577-96.
- Yu, R. Y. G., G. 2010. 282 The Crohns Disease Protective SNP Rs11209026 Allele 'A' Mediates Alternative Splicing in Human IL23R Transcription. *Gastroenterology*, 138 (5 Suppl.1), S-52-S-53.
- Zasloff, M. 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-95.

- Zhang, Z. F., *et alii*. 2012. Association between the Pro12Ala polymorphism of peroxisome proliferator-activated receptor gamma 2 and inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *PLoS One*, 7, e30551.
- Zhao, C., *et alii*. 1996. Widespread expression of beta-defensin hBD-1 in human secretory glands and epithelial cells. *FEBS Lett*, 396, 319-22.
- Zhou, L., *et alii*. 2007. IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*, 8, 967-74.
- Zhu, L., *et alii*. 2012. Lack of association between TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms and sepsis susceptibility: a meta-analysis. *Gene*, 501, 213-8.
- Zwiers, A., *et alii*. 2012. Cutting edge: a variant of the IL-23R gene associated with inflammatory bowel disease induces loss of microRNA regulation and enhanced protein production. *J Immunol*, 188, 1573-7.

V. ANEXOS

1. ANEXO I

Table 1. Single nucleotide polymorphisms that have been associated with Crohn's disease, ulcerative colitis, or both in genome-wide association studies [10,11].

A: Shared susceptibility loci.				
dbSNP	Chr	Crohn's disease OR (95% CI)	Ulcerative colitis OR (95% CI)	Most likely candidate*
rs11209026	1p31	2.67 (2.37–3.01)	1.72 (1.56–1.90)	<i>IL23R</i>
rs7554511	1q32	1.14 (1.08–1.19)	1.19 (1.14–1.25)	Unknown
rs3024505	1q32	1.18 (1.12–1.25)	1.25 (1.19–1.32)	<i>IL10, IL19</i>
rs7608910	2p16	1.14 (1.09–1.21)	1.18 (1.13–1.23)	Unknown
rs2310173	2q11	1.09 (1.04–1.14)	1.10 (1.05–1.15)	<i>IL1R2</i>
rs3197999	3p21	1.22 (1.16–1.27)	1.20 (1.15–1.25)	<i>MST1</i>
rs6451493	5p13	1.35 (1.28–1.43)	1.08 (1.03–1.13)	<i>PTGER4</i>
rs6556412	5q33	1.15 (1.10–1.20)	1.18 (1.13–1.24)	
rs6871626	5q33	1.18 (1.13–1.23)	1.09 (1.08–1.17)	<i>IL12B</i>
rs9268853	6p21	1.19 (1.13–1.25)	1.42 (1.36–1.49)	<i>HLA-DRB5, HLA-DQA1, HLA-DRB1, HLA-DRA</i>
rs6908425	6p22	1.17 (1.11–1.23)	1.17 (1.11–1.23)	<i>CDKAL1</i>
rs6911490	6q21	1.12 (1.07–1.18)	1.08 (1.03–1.14)	<i>PRDM1</i>
rs10758669	9p24	1.18 (1.13–1.23)	1.16 (1.11–1.21)	<i>JAK2</i>
rs4246905	9q32	1.21 (1.15–1.28)	1.13 (1.07–1.18)	<i>TNFSF8, TNFSF15</i>
rs10781499	9q34	1.20 (1.15–1.26)	1.12 (1.07–1.18)	<i>CARD9</i>
rs12261843	10p11	1.15 (1.10–1.20)	1.06 (1.0–1.11)	<i>CCNY</i>
rs10761659	10q21	1.23 (1.18–1.28)	1.23 (1.18–1.29)	<i>ZNF365</i>
rs6584283	10q24	1.21 (1.16–1.27)	1.20 (1.15–1.25)	<i>NKX2-3</i>
rs2155219	11q13	1.16 (1.11–1.21)	1.11 (1.07–1.16)	Unknown
rs17293632	15q22	1.19 (1.14–1.25)	1.12 (1.07–1.16)	<i>SMAD3</i>
rs12942547	17q21	1.14 (1.09–1.19)	1.08 (1.04–1.13)	<i>STAT3</i>
rs2872507	17q21	1.14 (1.09–1.21)	1.14 (1.10–1.19)	Unknown
rs1893217	18p11	1.25 (1.18–1.32)	1.25 (1.18–1.32)	<i>PTPN2</i>
rs11085735	19p13	1.19 (1.10–1.29)	1.12 (1.03–1.23)	<i>TYK2, ICAM3</i>
rs736289	19q13	1.11 (1.06–1.16)	1.06 (1.02–1.11)	
rs2297441	20q13	1.19 (1.13–1.25)	1.11 (1.05–1.17)	<i>RTEL1, TNFRSF6B</i>
rs1297265	21q11	1.16 (1.10–1.22)	1.10 (1.05–1.15)	
rs2838519	21q22	1.12 (1.06–1.17)	1.26 (1.20–1.32)	<i>ICOSLG</i>
rs2836878	21q22	1.18 (1.13–1.23)	1.13 (1.08–1.17)	
rs181359	22q11	1.21 (1.15–1.28)	1.10 (1.06–1.15)	<i>YDJC</i>
rs2413583	22q13	1.20 (1.13–1.28)	1.23 (1.17–1.29)	<i>MAP3K7IP1</i>
B: Susceptibility loci for ulcerative colitis only.				
dbSNP	Chr	Ulcerative colitis OR (95% CI)		Most likely candidate*
rs734999	1p36	1.05 (1.01–1.10)		<i>TNFRSF14</i>
rs35675666	1p36	1.08 (1.01–1.15)		<i>TNFRSF9, ERFF11</i>
rs7524102	1p36	1.11 (1.05–1.18)		
rs6426833	1p36	1.30 (1.25–1.35)		Unknown
rs1801274	1q23	1.20 (1.16–1.25)		<i>FCGR2A, FCGR2B</i>
rs15 18070	2q33	1.12 (1.07–1.17)		<i>SATB2</i>
rs11676348	2q35	1.06 (1.01–1.10)		<i>IL8RA, IL8RB</i>
rs4676406	2q37	1.14 (1.09–1.18)		Unknown

Table 1. Single nucleotide polymorphisms that have been associated with Crohn's disease, ulcerative colitis, or both in genome-wide association studies [10,11].

rs17388568	4q27	1.12 (1.07–1.17)	<i>IL21, IL2</i>
rs3194051	5p13	1.10 (1.05–1.15)	<i>IL7R</i>
rs267939	5p15	1.10 (1.05–1.15)	<i>DAP</i>
rs11739663	5p15	1.14 (1.09–1.20)	Unknown
rs254560	5q31	1.09 (1.04–1.14)	
rs943072	6p21	1.15 (1.07–1.24)	
rs6920220	6q23	1.14 (1.08–1.20)	
rs4510766	7q22	1.20 (1.15–1.26)	<i>LAMB1</i>
rs798502	7p22	1.13 (1.07–1.18)	<i>GNA12</i>
rs907611	11q15	1.08 (1.03–1.14)	<i>LSP1</i>
rs678170	11q23	1.09 (1.04–1.14)	Unknown
rs7117768	11q24	1.07 (1.02–1.13)	<i>ETS1</i>
rs7134599	12q14	1.20 (1.15–1.25)	<i>IFNG, IL26</i>
rs17085007	13q12	1.15 (1.08–1.21)	
rs941823	13q13	1.11 (1.05–1.17)	
rs1728785	16q22	1.15 (1.10–1.21)	<i>CDH1, ZFP90</i>
rs16940202	16q24	1.15 (1.09–1.22)	
rs6017342	20q13	1.17 (1.12–1.22)	<i>HNF4A</i>
rs5771069	22q13	1.09 (1.02–1.18)	<i>IL17REL</i>
C: Susceptibility loci for Crohn's disease only.			
dbSNP	Chr	Crohn's disease OR (95% CI)	Most likely candidate*
rs2476601	1p13	1.26 (1.17–1.37)	<i>PTPN22</i>
rs2797685	1p36	1.05 (1.01–1.10)	<i>VAMP3</i>
rs3180018	1q22	1.13 (1.06–1.19)	<i>SCAMP3, MUC1</i>
rs4656940	1q23	1.15 (1.09–1.21)	<i>CD244, ITLN1</i>
rs7517810	1q24	1.22 (1.16–1.28)	
rs1998598	1q31	1.04 (1.00–1.09)	<i>DENND1B</i>
rs10495903	2p21	1.14 (1.09–1.20)	<i>THADA</i>
rs13428812	2p23	1.06 (1.03–1.10)	<i>DNMT3A</i>
rs780093	2p23	1.15 (1.10–1.21)	<i>GCKR</i>
rs2058660	2q12	1.19 (1.14–1.26)	<i>IL18RAP</i>
rs6738825	2q33	1.06 (1.02–1.11)	<i>PLCL1</i>
rs7423615	2q37	1.12 (1.07–1.18)	<i>SP140</i>
rs3792109	2q37	1.34 (1.29–1.40)	<i>ATG16L1</i>
rs13073817	3p24	1.08 (1.03–1.13)	
rs7702331	5q13	1.12 (1.07–1.17)	<i>TMEM174</i>
rs2549794	5q15	1.05 (1.02–1.09)	<i>ERAP2, LRAP</i>
rs11167764	5q31	1.06 (1.02–1.11)	<i>NDVIP1</i>
rs12521868	5q31	1.23 (1.18–1.28)	<i>SLC22A4, SLC22A5</i>
rs7714584	5q33	1.37 (1.28–1.47)	<i>IRGM</i>
rs359457	5q35	1.08 (1.04–1.12)	<i>CPEB4</i>
rs17309827	6p25	1.10 (1.05–1.16)	<i>C6orf85</i>
rs1847472	6q15	1.07 (1.03–1.11)	<i>BACH2</i>
rs212388	6q25	1.10 (1.05–1.14)	<i>TAGAP</i>

Table 1. Single nucleotide polymorphisms that have been associated with Crohn's disease, ulcerative colitis, or both in genome-wide association studies [10,11].

rs415890	6q27	1.17 (1.12–1.22)	CCR6
rs1456896	7p12	1.14 (1.09–1.20)	IKZF1
rs4871611	8q24	1.17 (1.12–1.23)	
rs6651252	8q24	1.23 (1.17–1.30)	
rs12722489	10p15	1.11 (1.05–1.16)	IL2RA
rs1819658	10q21	1.19 (1.13–1.25)	UBE2D1
rs1250550	10q22	1.19 (1.15–1.23)	ZMIZ1
rs102275	11q12	1.08 (1.04–1.12)	FADS1
rs694739	11q13	1.10 (1.05–1.16)	PRDX5, ESRRA
rs11564258	12q12	1.74 (1.55–1.95)	MUC19, LRRK2
rs2062305	13q14	1.10 (1.05–1.15)	TNFSF11 (5.9)
rs3764147	13q14	1.17 (1.12–1.23)	C13orf3
rs4902642	14q24	1.07 (1.11–1.04)	ZFP36L1
rs8005161	14q35	1.23 (1.16–1.31)	GALC, GPR65
rs151181	16p11	1.07 (1.03–1.12)	APOB48R, IL27, SULT1A2, SULT1A1, SH2B1, EIF3C
rs2076756	16q12	1.53 (1.46–1.60)	NOD2
rs3091315	17q12	1.20 (1.14–1.26)	CCL2, CCL7
rs740495	19p13	1.16 (1.10–1.21)	GPX4, SBNO2
rs281379	19q13	1.07 (1.04–1.11)	FUT2, RASIP1
rs713875	22q12	1.08 (1.04–1.13)	MTMR3

*Most likely candidate: gene in linkage disequilibrium with associated SNP that is thought to be most likely to harbor the causal variant. If left blank, this indicates that there are no genes in the immediate vicinity of the associated SNP.
Chr: Chromosomal position; CI: confidence interval; dbSNP: single-nucleotide polymorphism identity; OR: odds ratio.

Adaptado de Lee 2011