

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUANA CAROLINE OLIVEIRA

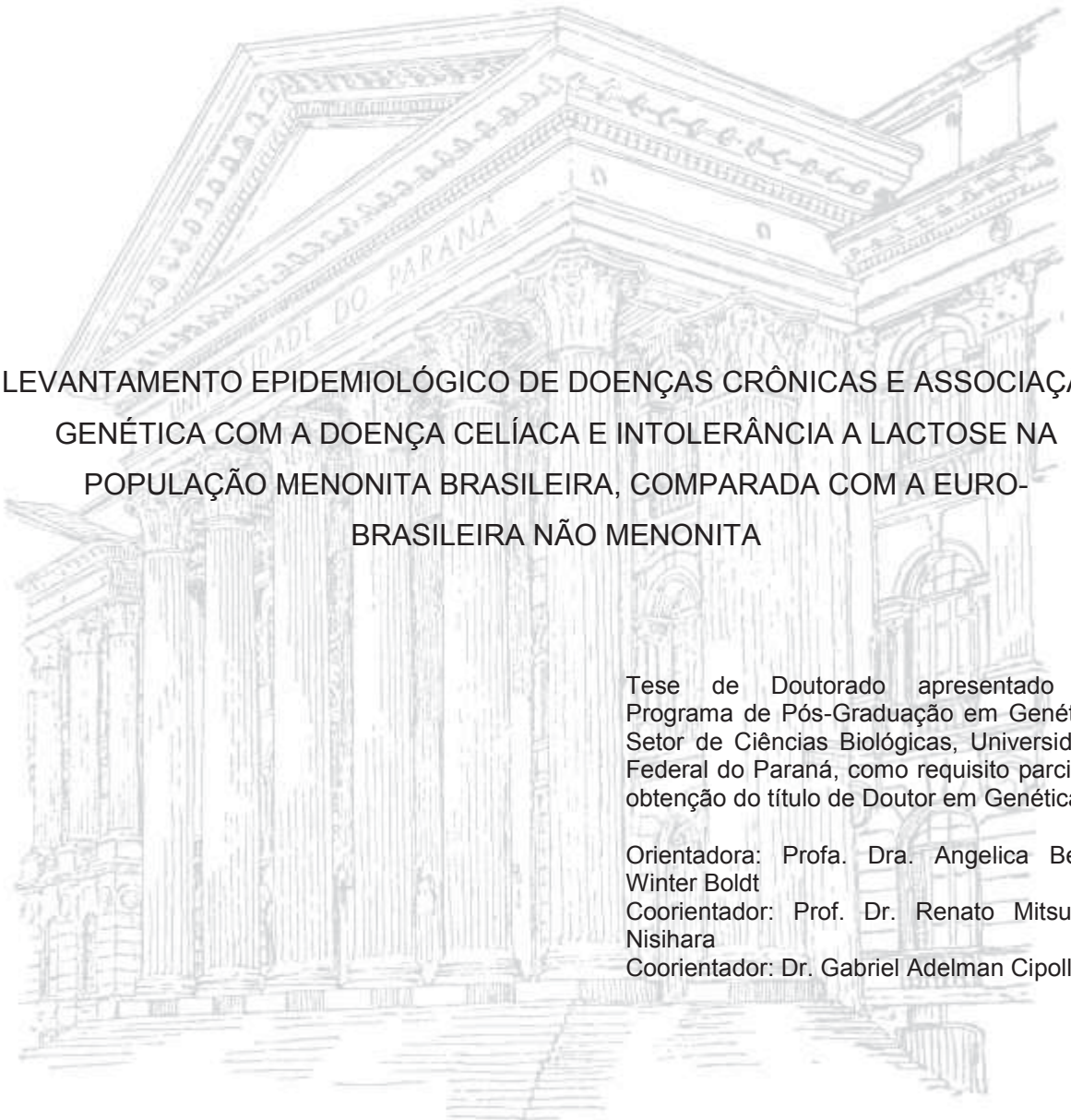


LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DE DOENÇAS CRÔNICAS E ASSOCIAÇÃO
GENÉTICA COM A DOENÇA CELÍACA E INTOLERÂNCIA A LACTOSE NA
POPULAÇÃO MENONITA BRASILEIRA, COMPARADA COM A EURO-
BRASILEIRA NÃO MENONITA

CURITIBA

2020

LUANA CAROLINE OLIVEIRA



LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DE DOENÇAS CRÔNICAS E ASSOCIAÇÃO
GENÉTICA COM A DOENÇA CELÍACA E INTOLERÂNCIA A LACTOSE NA
POPULAÇÃO MENONITA BRASILEIRA, COMPARADA COM A EURO-
BRASILEIRA NÃO MENONITA

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Angelica Beate Winter Boldt

Coorientador: Prof. Dr. Renato Mitsunori Nishihara

Coorientador: Dr. Gabriel Adelman Cipolla

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Oliveira, Luana Caroline

Levantamento epidemiológico de doenças crônicas e associação genética com a doença celíaca e intolerância a lactose na população menonita brasileira, comparada com a euro-brasileira não menonita. / Luana Caroline Oliveira. – Curitiba, 2020.

189 p.: il.

Orientadora: Angelica Beate Winter Boldt

Coorientadores: Renato Mitsunori e Gabriel Adelman Cipolla

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética de populações. 2. Menonitas. 3. Doença celíaca. 4. Intolerância a lactose. 5. Epidemiologia. 6. Efeito fundador. I. Título. II. Boldt, Angelica Beate Winter. III. Nisihara, Renato Mitsunori. IV. Cipolla, Gabriel Adelman. V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 576.58



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LUANA CAROLINE OLIVEIRA** intitulada: **LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DE DOENÇAS CRÔNICAS E ASSOCIAÇÃO GENÉTICA COM A DOENÇA CELÍACA E INTOLERÂNCIA A LACTOSE NA POPULAÇÃO MENONITA BRASILEIRA, COMPARADA COM A EURO-BRASILEIRA NÃO MENONITA**, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 29 de Janeiro de 2020.


GABRIEL ADELMAN CIPOLLA
Presidente da Banca Examinadora


LIANA ALVES DE OLIVEIRA
Avaliador Externo (FACULDADES INTEGRADAS DO BRASIL)


BARBARA DAL MOLIN NETTO
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO)


SOLEDA ZIEMER KUSMA FIDALSKI
Avaliador Externo (DEPARTAMENTO DE SAÚDE COLETIVA)


MARCIA HOLSBACH BELTRAME
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Dedico esse trabalho aos meus pais, Deonilda e Luiz Carlos,
e a minha irmã Camila.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem recorri em todos os momentos de incertezas, angústias e medo, mas também de alegrias e realizações.

A minha família. Meus pais, meus alicerces. Obrigada pelo amor e apoio incondicional, vocês são meu exemplo diário de fé, persistência, honestidade, dedicação e amor. Em especial a você mãe, por cada conselho, pelo carinho, paciência, cuidado e abraço. E a minha irmã e ao meu cunhado, pela amizade e momentos de descontração, além de todo o carinho e palavra de incentivo. Amo vocês!

A minha orientadora Angelica, palavras não serão suficientes pra expressar a gratidão que tenho por todo o aprendizado, confiança e amizade que desenvolvemos nesses anos. Obrigada por ter me confiado iniciar esse trabalho tão lindo pelo qual tenho muito amor.

Aos meus coorientadores. Ao Renato por todo o aprendizado, sugestões e disponibilidade sempre que recorreremos. Ao Gabriel, que com todas as minhas dúvidas e vontade de sempre querer fazer mais, sempre esteve ao meu lado com ideias, discussões e total apoio.

A todos os integrantes do Laboratório de Genética Humana Molecular (LGMH). Esse laboratório que se tornou a minha segunda casa nos últimos 7 anos, e que com ele conquistei grandes amizades. Agradeço a todos os professores por todos os ensinamentos, discussões e contribuições. E aos amigos: Hellen, Tamyres, Gabriela, Wilian, Verónica, Leonardo, Luciana, Sara, Ticiane obrigada por todo o incentivo e motivação, pelas infinitas conversas, risadas e momentos de descontração, além da mão de obra em todos os multirões de processamento após cada coleta, o qual sempre movido de muito bom humor e música. Sinto-me profundamente lisonjeada de participar desse grupo de pesquisa!

Aos meus estagiários foi uma honra ter coorientado cada um de vocês, obrigada por também terem me ensinado tanto.

A Priscila, minha mentora de coletas. Obrigada toda a ajuda com o preparo de soluções, nas inúmeras coletas e viagens pra Witmarsum que fizemos, e pelas aulas de química.

A todos os participantes das colônias Menonitas, as associações de moradores e as igrejas Menonitas, pelo envolvimento e acolhida. Em especial a oma Ana Epp, a

Elfriede Claassen e Erica Pauls que sempre nos receberam com tanto amor e carinho em suas casas, e a Heidi Wall pela imensa ajuda nas coletas em Colônia Nova.

A Solange e a todos os participantes da ACELPAR, que sempre nos receberam com tanto carinho durante as reuniões, sempre interessados e prontos a contribuir com a nossa pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, professores e funcionários, pelo auxílio e aprendizado adquirido nesses anos.

Aos órgãos de fomento Fundação Araucária, CNPq e CAPES pelo financiamento nos projetos de pesquisa. Ao programa da CAPES pelo financiamento de auxílios de bolsa durante o período de doutorado.

*“Nada te perturbe, nada te espante, tudo passa!
Só Deus não passa. A paciência, por fim tudo alcança.”*

Santa Tereza D'Ávila

RESUMO

Os menonitas pertencem a população anabatista, isolada geneticamente por aproximadamente 5 séculos. No Brasil, esse grupo chegou na década de 1930 fundando algumas colônias. Populações isoladas como a dos menonitas apresentam pouca variabilidade genético-ambiental, sendo excelente modelo para estudar doenças complexas. As doenças complexas resultam da combinação de fatores genéticos, ambientais e estilos de vida, e não possuem um padrão claro de herança, como na herança mendeliana. A doença celíaca (DC) é uma doença autoimune complexa do intestino delgado, desencadeada pelo glúten. A intolerância a lactose (IL) decorre principalmente de hipolactasia primária, devido à expressão reduzida do gene da lactase na infância. Ambas as condições compartilham sintomas, dificultando o diagnóstico. Neste trabalho, realizou-se o levantamento epidemiológico de doenças complexas nas comunidades menonitas sul-brasileiras e avaliou-se as associações genéticas com a DC e IL, comparativamente a outras populações. Para o levantamento (capítulo I), acrescentou-se perguntas ao questionário da Pesquisa Nacional de Saúde 2013, entrevistando 614 menonitas. Para o estudo da DC (capítulo II), realizou-se o rastreamento sorológico para anticorpos IgA anti-transglutaminase tecidual e IgA anti-peptídeo gliadina deamidada, em 576 menonitas. A tipagem genética de *HLA-DQ2* e *HLA-DQ8* foi realizada em 391 menonitas. Para o estudo da IL (capítulo III), 495 menonitas foram genotipados para o polimorfismo *-13910*C>T-LCT* (rs4988235). Por fim, para o estudo de uma nova variante associada a IL (capítulo IV), foi realizada a genotipagem dos polimorfismos *rs140433552-LCT* e *-13910*C>T-LCT*, em 43 pacientes IL e 79 controles, todos euro-brasileiros não-menonitas. Verificou-se que o perfil biométrico e a prevalência de certas doenças crônicas diferiu entre as colônias e com relação a outras populações. Rotas migratórias, hábitos alimentares, escolaridade e taxas de miscigenação também diferiram entre as colônias. A soroprevalência da DC nos menonitas foi de 1:30 (3,36%, IC95%=2,15-4,57%) e de DC confirmado por biópsia, 1:55 (1,85%, IC95%=0,64-3,06%), muito superior à maior prevalência global (1:100). A frequência de portadores do HLA-DQ2.5 foi maior em menonitas, do que nos demais euro-brasileiros ($P=7 \times 10^{-6}$). Já a frequência de portadores HLA-DQ8, foi maior que nos belgas, ancestrais dos menonitas ($P=1,8 \times 10^{-6}$) e também maior que nos euro-brasileiros ($P=6,5 \times 10^{-6}$). Este resultado favorece a hipótese de efeito fundador para explicar a alta prevalência da DC nos menonitas. O genótipo *13910*C/C*, altamente associado à IL, apresentou frequência de 10,5%, contrastando com a alta prevalência de menonitas que relataram sintomas de IL (36,5% ou 138/378). Esse mesmo genótipo foi mais comum entre os indivíduos com diagnóstico prévio de IL do que em indivíduos assintomáticos (OR=5,38 [IC95%=1,21-23,90, $P=0,045$]). Associações com o polimorfismo *rs140433552*CA>del* e IL foram encontradas apenas em conjunto com *-13910*C>T*. Indivíduos homocigotos para o haplótipo C-CA e indivíduos C-CA+/C parecem ser mais suscetíveis a IL (OR=3,33 [IC95%=1,32-8,35], $P=0,011$; OR=3,93 [IC95%=1,61-9,61], $P=0,003$, respectivamente). Um efeito protetor foi observado em indivíduos homocigotos para o haplótipo T-CA (OR=0,04 [IC95%=0,002-0,70], $P=8 \times 10^{-4}$). Esses resultados sugerem que a variante *rs140433552*CA>del* de *LCT* não está independentemente associada a IL. Este trabalho foi pioneiro em avaliar epidemiologicamente a população menonita sul-brasileira. Nossos resultados destacam a relevância deste estudo para as políticas públicas de saúde, especialmente para a DC.

Palavras-chaves: menonitas, epidemiologia, doença celíaca, intolerância a lactose, efeito fundador.

ABSTRACT

The Mennonites belong to the Anabaptist population, isolated genetically for approximately 5 centuries. In Brazil, this group arrived in the 1930s founding some colonies. Isolated populations such as those of the Mennonites have little genetic-environmental variability, being an excellent model for studying complex diseases. Complex diseases result from the combination of genetic, environmental and lifestyle factors, and do not have a clear pattern of inheritance, as in Mendelian inheritance. Celiac disease (CD) is an autoimmune and complex disease of the small intestine, triggered by gluten. Lactose intolerance (LI) results mainly from primary hypolactasia, due to reduced expression of the lactase gene. Both conditions share symptoms, making diagnosis difficult. In this work, an epidemiological survey of complex diseases was carried out in the Southern Brazilian Mennonite communities and the genetic associations with CD and LI were evaluated and compared to other populations. For the epidemiological survey (chapter I), questions were added to the questionnaire of the National Health Survey 2013, interviewing 614 Mennonites. For the study of CD (chapter II), serological screening was performed for anti-tissue transglutaminase IgA and anti-deamidated gliadin peptide IgA antibodies, in 576 mennonites. Genetic typing of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 was performed in 391 mennonites. For the study of LI (chapter III), 495 mennonites were genotyped for the $-13910^*C>T$ -LCT polymorphism (rs4988235). Finally, for the study of a new variant in LI (chapter IV), genotyping of $rs140433552$ -LCT and $-13910^*C>T$ -LCT polymorphisms was performed in 43 LI patients and 79 controls, all non-Mennonite Euro-Brazilians. It was found that the biometric profile and the prevalence of certain chronic diseases, differed between colonies and in relation to other populations. Migratory routes, eating habits, schooling and admixture rates also differed between colonies. The seroprevalence of CD in Mennonites was 1:30 (3.36%, 95% CI = 2.15-4.57%) and of CD confirmed by biopsy, 1:55 (1.85%, 95% CI = 0.64-3.06%), much higher than the highest global prevalence (1:100). The frequency of *HLA-DQ2.5* carriers was higher in Mennonites, than in Brazilians ($P = 7 \times 10^{-6}$). The frequency of *HLA-DQ8* carriers, on the other hand, was higher than in Belgians, ancestors of the Mennonites ($P = 1.8 \times 10^{-6}$), and also higher than in Euro-Brazilians ($P = 6.5 \times 10^{-6}$). This result supports the hypothesis of founder effect to explain the high prevalence of CD in Mennonites. The $-13910^*C/C$ genotype, highly associated with LI, had a frequency of 10.5%, contrasting with the high prevalence of mennonites who reported symptoms of LI (36.5% or 138/378). This same genotype was more common among individuals with a previous diagnosis of LI, than in asymptomatic individuals (OR = 5.38 [95% CI = 1.21-23.90, $P = 0.045$]). Associations with the $rs140433552^*CA>del$ and LI polymorphism were found only together with $-13910^*C>T$. Homozygous individuals for the C-CA haplotype and C-CA+/C individuals appear to be more susceptible to LI (OR = 3.33 [95% CI = 1.32-8.35], $P = 0.011$; OR = 3.93 [95% CI = 1.61-9.61], $P = 0.003$, respectively). A protective effect was observed in individuals homozygous for the T-CA haplotype (OR = 0.04 [95% CI = 0.002-0.70], $P = 8 \times 10^{-4}$). These results suggest that the LCT $rs140433552^*CA>del$ variant is not independently associated with LI. This was a pioneer epidemiological evaluation of the Southern Brazilian Mennonite population. Our results highlight the relevance of this study for public health policies, especially for CD.

Keywords: mennonites, epidemiology, celiac disease, lactose intolerance, founder effect.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: EVENTOS DA GARGALO DE GARRAFA DA POPULAÇÃO MENONITA	29
FIGURA 2: MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA CELÍACA	34
FIGURA 3: UMA COMPARAÇÃO ENTRE A CLASSIFICAÇÃO DE MARSH PARA DC	36
FIGURA 4: SOROPREVALÊNCIA MUNDIAL DA DOENÇA CELÍACA.....	39
FIGURA 5: PREVALÊNCIA MUNDIAL DA DOENÇA CELÍACA COM DIAGNÓSTICO POR BIÓPSIA	40
FIGURA 6: PATOGÊNESE DA DOENÇA CELÍACA.....	42
FIGURA 7: MOLÉCULAS DE HLA ASSOCIADAS A DOENÇA CELÍACA.....	44
FIGURA 8: ASPECTOS CLÍNICOS DA HIPOLACTASIA PRIMÁRIA	49
FIGURA 9: MAPA COM INTERPOLAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE NO VELHO MUNDO, DE ACORDO COM DADOS DA LITERATURA.	52
FIGURA 10: HEREDOGRAMA DE UMA FAMÍLIA MENONITA COM MÚLTIPLOS CASOS DE CÂNCER.....	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ASSOCIAÇÕES GENÉTICAS A DOENÇAS E CARACTERÍSTICAS COMPLEXAS EM POPULAÇÕES EUROPEIAS GENETICAMENTE ISOLADAS....	24
TABELA 2: DOENÇAS GENÉTICAS ESTUDADAS NA POPULAÇÃO MENONITA GERMÂNICA-HOLANDESA ATÉ 2006.	31
TABELA 3: PREVALÊNCIA COMBINADA DA DC DE ACORDO COM A LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA	38
TABELA 4: DADOS DEMOGRÁFICOS DA POPULAÇÃO MENONITA	60
TABELA 5: ROTAS MIGRATÓRIAS DOS ASCENDENTES DOS MENONITAS.....	62
TABELA 6:HÁBITOS ALIMENTARES DA POPULAÇÃO MENONITA.....	63
TABELA 7: EXPOSIÇÃO AMBIENTAL DA POPULAÇÃO MENONITAS A MUTÁGENOS	64
TABELA 8: PREVALÊNCIA DE DOENÇAS COMPLEXAS E AGREGAÇÃO FAMILIAR EM COMUNIDADE MENONITAS	65

LISTA DE SIGLAS

3'UTR	Região 3' não traduzida
5'UTR	Região 5' não traduzida
ATCB11	ATP-binding cassette subfamily B member 11
ALMS1	ALMS1 centrosome and basal body associated protein
ALOX5AP	Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein
ALPL	Alkaline phosphatase
AT	Ataxia telangiectasia
ATM	Ataxia-telangiectasia mutated gene
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BR	Brasil
CACNA1F	Calcium-channel, voltage-dependent, alpha 1F-subunit
CCR5	Receptor 5 cisteína-cisteína de quimiocinas
CD28	Antigen CD28
CDKAL1	CDK5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CHI3L1	Chitinase 3-like-1
CHI3L1	Chitinase 3-like 1
CN	China
CON	Colônia Nova
CWB	Curitiba
CTLA4	Cytotoxic T lymphocyte-associated 4
CWI	Colônia Witmarsum
CYP17	Cytochrome P450 family 17 subfamily A polypeptide 1
DC	Doença Celíaca
DE	Alemanha
DGP	Peptídeos de gliadina deaminada
DGUOK	Deoxyguanosine kinase
DISC1	Disrupted in schizophrenia 1
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo Trifosfatado
DORT	Distúrbios Osteomusculares Relacionados ao Trabalho
DRD2	Dopamine receptor 2
EMA	Antiendomíio
ESCO2	Establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 2
ESPGHAN	Sociedade Europeia de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica
FTO	FTO alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase
g	Gramas
G6PC2	Glucose-6-phosphatase catalytic 2
GBA	Glucosidase beta acid
GDF5	Growth/differentiation factor 5
GWAS	Estudo de associação ampla do genoma
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HLA	Antígenos Leucocitários Humanos
HNPCC	Câncer de cólon não-polipomatoso hereditário
HSD11B2	11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II
ICOS	Inducible T cell costimulator
IFN-γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A

IgG	Imunoglobulina G
IL	Intolerância a Lactose
IL18RAP	Interleukin 18 receptor accessory protein
IMC	Índice de massa corporal
IRAK3	Interleukin 1-receptor-associated kinase 3
KITLG	KIT ligand
LCT	Lactase
LIE	Linfócitos intra-epiteliais
LOXL1	Lysyl oxidase-like 1
MC1R	Melanocortin receptor 1
MCM6	Minichromosome maintenance 6
MIC-A	Major histocompatibility complex class-I chain related gene A
miRNA	micro RNA
MLH1	DNA mismatch repair protein MLH1
MTRNR2	Ribosomal RNA, mitochondrial 16S
MYBPC3	Myosin-binding protein C cardiac
NK	Natural killer cell
NK-G2D	Killer cell lectin-like receptor, subfamily K, member 1
NPSR1	Neuropeptide S receptor 1
OCA2	OCA2 melanosomal transmembrane protein
OR	Odds Ratio (Razão de Chance)
PAM	Pressão arterial média
PCR-SSP	Reação em Cadeia da Polimerase com iniciadores Sequência Específicos
PFKP	Phosphofructokinase, platelet-type
PNS	Pesquisa Nacional de Saúde
PPG	Parante de primeiro grau
ppm	Partes por milhão
PQBP1	Polyglutamine-binding protein 1
PR	Paraná
PSG	Parente de segundo grau
PY	Paraguai
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	Ácido Ribonucleico mensageiro
RS	Rio Grande do Sul
RU	Rússia
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
RYR1	Ryanodine receptor 1
SH2B3	SH2 adaptor protein 3
SII	Síndrome do intestino irritável
SLC24A4	Solute carrier family 24 member 4,
SLC4A1	Solute carrier family 4 (anion exchanger) member 1
SNP	Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TBX22	T-box 22 ZAP70 - Zeta-chain-associated protein kinase 70
TGA	Anti transglutaminase tecidual
TGIF	Transforming growth factor-beta-induced factor
TSNAX	Translin-associated factor X
tTG	Transglutaminase
TYR	Tyrosinase
UQCC	Ubiquinol-cytochrome C reductase complex chaperone 1
USF1	Upstream transcription factor 1

ZBTB38
ZMPSTE24

Zinc finger- and BTB domain-containing protein 38
Zinc metalloproteinase Ste24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	POPULAÇÕES ISOLADAS	21
2.2	POPULAÇÃO MENONITA	26
2.3	DOENÇA CELÍACA	33
2.3.1	<i>Aspectos clínicos</i>	33
2.3.2	<i>Diagnóstico</i>	34
2.3.3	<i>Tratamento</i>	36
2.3.4	<i>Epidemiologia</i>	37
2.3.5	<i>Fisiopatologia</i>	41
2.3.6	<i>Fatores genéticos</i>	42
2.4	INTOLERÂNCIA A LACTOSE	46
2.4.1	<i>Hipolactasias e persistência da lactase</i>	46
2.4.2	<i>Aspectos clínicos</i>	48
2.4.3	<i>Diagnóstico</i>	50
2.4.4	<i>Tratamento</i>	51
2.4.5	<i>Epidemiologia</i>	51
2.4.6	<i>Regulação da Lactase</i>	52
3	JUSTIFICATIVA	54
4	OBJETIVOS	56
4.1	OBJETIVO GERAL	56
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
5	CAPÍTULO I	57
5.1	MATERIAIS E MÉTODOS	57
5.1.1	<i>Levantamento epidemiológico</i>	57
5.1.2	<i>Análise estatística</i>	59
5.2	RESULTADOS	59
5.2.1	<i>Dados demográficos</i>	59
5.2.2	<i>Ancestralidade menonita</i>	60
5.2.3	<i>Hábitos alimentares</i>	62
5.2.4	<i>Exposição ambiental a mutágenos</i>	63
5.2.5	<i>Doenças e agregação familiar</i>	64
5.3	DISCUSSÃO	68
5.3.1	<i>Diferenças entre as comunidades</i>	68

5.3.2	<i>Diferenças entre os menonitas e outras populações</i>	70
6	CAPÍTULO II	74
6.1	ABSTRACT	74
6.2	INTRODUCTION	75
6.3	MATERIAL AND METHODS	76
6.3.1	<i>Ethics</i>	76
6.3.2	<i>Patient and public involvement</i>	76
6.3.3	<i>Epidemiological Study</i>	77
6.3.4	<i>Serological screening</i>	78
6.3.5	<i>HLA-DQ2.5/DQ8 genetic screening</i>	78
6.3.6	<i>Statistical and bioinformatic analysis</i>	79
6.3.7	<i>Results</i>	80
6.4	DISCUSSION	82
6.5	REFERENCE	92
7	CAPÍTULO III	97
7.1	ABSTRACT	97
7.2	INTRODUCTION	98
7.3	MATERIAL AND METHODS	99
7.3.1	<i>Ethics Statement</i>	99
7.3.2	<i>Research Participants</i>	99
7.3.3	<i>-13910*C>T genotyping</i>	99
7.3.4	<i>Statistical analysis</i>	100
7.4	RESULTS	100
7.5	DISCUSSION	101
7.6	REFERENCES	103
8	CAPÍTULO IV	104
8.1	ABSTRACT	104
8.2	INTRODUCTION	105
8.3	MATERIAL AND METHODS	106
8.3.1	<i>Research participants</i>	106
8.3.2	<i>LCT genotyping</i>	106
8.3.3	<i>Statistical and bioinformatic analysis</i>	107
8.4	RESULTS	107
8.5	DISCUSSION	108
8.6	REFERENCES	111
9	CONCLUSÕES	113
10	REFERÊNCIAS	115

11 APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO EM COMUNIDADES MENONITAS	141
APÊNDICE B - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO EM COMUNIDADES MENONITAS	144
APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA DOENÇA CELÍACA.....	147
APÊNDICE D - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA DOENÇA CELÍACA.....	151
APÊNDICE E - QUESTIONÁRIO DE AVERIGUAÇÃO DE DOENÇAS GASTROINTESTINAIS E CONTROLES.....	155
APÊNDICE F - QUESTIONÁRIO DO LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DAS COMUNIDADES MENONITAS.....	162

1 INTRODUÇÃO

Os menonitas fazem parte de um grupo Anabatista cristão, que surgiu na Europa no século XVI. Devido a questões religiosas, culturais e de valores, como o pacifismo, eles passaram a constituir grupos fechados. Em decorrência de epidemias e perseguições, desde a sua origem os menonitas passaram por três principais “gargalos de garrafa”, nos quais o número de indivíduos da população ancestral foi reduzido drasticamente. Em busca de liberdade, migraram para diversos países, entre eles o Brasil. No Brasil passaram a viver na região onde atualmente estão localizados os bairros do Xaxim, Boqueirão e Água Verde/Vila Guaíra na cidade de Curitiba-PR (CWB), e fundaram também as Colônias de Witmarsum (CWI), no Estado do Paraná e a Colônia Nova (CON), no Estado do Rio Grande do Sul (PAULS JUNIOR., 1980). Apesar dos casamentos terem sido aleatórios dentro das colônias menonitas, aproximadamente cinco séculos de isolamento favoreceram a consanguinidade entre as famílias. Populações isoladas, como as dos menonitas, apresentam pouca variabilidade genética e ambiental, oferecendo um excelente modelo para estudos de fenótipos e doenças complexas.

Doenças de etiologia complexa são resultantes da combinação do efeito de muitas variantes gênicas, que aumentam ou diminuem a susceptibilidade ao seu desenvolvimento, com os fatores ambientais, que iniciam, aceleram, intensificam ou conferem proteção contra o seu progresso. Doenças gastrointestinais como a doença celíaca (DC) e a intolerância à lactose (IL) são exemplos de doenças complexas. No entanto, diferente da DC a IL tem uma mutação de efeito muito forte, quase determinante assemelhando-se a um padrão de herança autossômico dominante. A doença celíaca (DC) é uma doença autoimune crônica que acomete o intestino delgado, ativada principalmente por peptídeos do glúten (proteína presente no trigo, centeio e cevada). Os sintomas podem ser intestinais e/ou extra-intestinais, e indivíduos afetados podem ser completamente assintomáticos, no início da doença. A soroprevalência (sorologia positiva para DC) global da DC é de 1,4%, enquanto que a prevalência global de DC, quando confirmada por biópsia, é de 0,7%. Quando não diagnosticada precocemente pode levar ao desenvolvimento de linfoma intestinal, anemia, osteoporose, infertilidade e outras doenças autoimunes (GREEN; LEBWOHL; GREYWOODE, 2015; KOTZE, 2009). A intolerância a lactose (IL) decorre com maior frequência de hipolactasia primária, devido à redução da expressão do gene da

lactase após a infância, essa redução é geneticamente programada na maior parte das populações humanas, com exceção das que apresentam cultura pastoril milenar. Dentre os principais sintomas estão inchaço, flatulência e dor abdominal, além da diarreia e de outros sintomas como dores de cabeça e musculares, letargia, entre outros (HARRINGTON; MAYBERRY, 2008; MATTHEWS *et al.*, 2005).

Assim sendo, este trabalho tem por objetivo realizar um levantamento genético-epidemiológico de doenças complexas e de fatores de risco e avaliar a associação genética com a doença celíaca e a intolerância a lactose nas comunidades menonitas de Curitiba, Witmarsum (PR) e Colônia Nova (RS), comparando os resultados com os da população brasileira não menonita e de populações europeias ancestrais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 POPULAÇÕES ISOLADAS

Populações geneticamente isoladas são subgrupos populacionais que permaneceram reprodutivamente separados da população circundante, por muitas gerações. Por serem descendentes de um número limitado de indivíduos fundadores e terem permanecido isoladas, a ocorrência de algumas doenças hereditárias pode ser muito maior entre os indivíduos dessas comunidades (ARCOS-BURGOS; MUENKE, 2002; HATZIKOTOULAS; GILLY; ZEGGINI, 2014; PELTONEN; PALOTIE; LANGE, 2000).

Em comparação com populações não isoladas, os isolados populacionais geralmente apresentam uma diversidade genética reduzida devido ao efeito fundador (ocorre quando um pequeno grupo de indivíduos de uma população maior se separa para estabelecer uma colônia), a fatores evolutivos como por exemplo a deriva genética (modificações aleatoriamente das frequências alélicas ao longo do tempo), somado ao isolamento genético (KRISTIANSSON; NAUKKARINEN; PELTONEN, 2008; PELTONEN; PALOTIE; LANGE, 2000). Além disso, os indivíduos dessas populações geralmente compartilham ambientes mais uniformes, tanto em relação a fatores ambientais como culturais, diminuindo as fontes de variação não-genéticas que contribuem para características complexas. Em muitos casos, os registros genealógicos são bem mantidos, o que pode facilitar a determinação das relações de parentesco e a estimativa de parâmetros populacionais como a miscigenação, por exemplo. Todas essas características contribuem para que essas populações geneticamente isoladas sejam interessantes para estudos populacionais e genéticos, não apenas no estudo de doenças raras, mas também em estudos que visam uma melhor compreensão da fisiopatologia de doenças comuns (ARCOS-BURGOS; MUENKE, 2002).

Diversos estudos em populações isoladas identificaram com sucesso genes e variantes associadas a características mendelianas e complexas (TABELA 1) (KRISTIANSSON; NAUKKARINEN; PELTONEN, 2008; PELTONEN; JALANKO; VARILO, 1999; SIDORE *et al.*, 2015). Na Islândia, mais de 50% da população adulta forneceu informações médicas e genéticas à empresa deCODE, para serem usadas em pesquisas genéticas. Ao longo das gerações a deriva genética reduziu a quantidade de variação dentro dessa população em relação ao resto da Europa,

(HELGASON *et al.*, 2003). Isso permitiu a identificação por meio de ligação e, mais recentemente, por estudos de associação ampla do genoma (GWAS), de um número impressionante de variantes que contribuem para o desenvolvimento de doenças comuns/complexas. Entre essas, estão os loci associados ao infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral (*ALOX5AP* ou *Arachidonate 5-lipoxygenase-activating protein* e a região cromossômica 9p21) (HELGADOTTIR *et al.*, 2004, 2007), diabetes tipo 2 (*TCF7L2* e *CDKAL1*) (GRANT *et al.*, 2006; STEINTHORSDOTTIR *et al.*, 2007), fibrilação atrial (4q25) (GUDBJARTSSON *et al.*, 2007) e câncer de próstata (2p15 e Xp11.22) (GUDMUNDSSON *et al.*, 2008). Além de genes cujas variantes contribuem para o desenvolvimento de doenças, a investigação da população islandesa revelou genes que contribuem para várias características complexas, como a estatura de adultos (vários loci, incluindo *ZBTB38* ou *Zinc finger- and BTB domain-containing protein 38*) (GUDBJARTSSON *et al.*, 2008), bem como para a pigmentação da pele e do cabelo (*SLC24A4* ou *Solute carrier family 24 member 4*, *KITLG* ou *KIT ligand*, *TYR* ou *Tyrosinase*, *OCA2* ou *OCA2 melanosomal transmembrane protein*, *MC1R* ou *Melanocortin receptor* e 6p25.3) (SULEM *et al.*, 2007, 2008).

A população da Finlândia é outra população geneticamente isolada, na qual já foram identificados genes para 35 doenças monogênicas que são mais frequentes nesta, do que em outras populações (PELTONEN; JALANKO; VARILO, 1999). Heredogramas extensos dessa população foram utilizados com sucesso em um estudo de hiperlipidemia combinada familiar, no qual identificou-se variantes do gene *USF1* (*Upstream transcription factor 1*) como fator de risco (PAJUKANTA *et al.*, 2004). Essa associação foi posteriormente replicada em outras populações, assim como evidências da significância funcional das variantes genéticas e sua associação com doenças cardiovasculares e dislipidemia, ao nível populacional (KOMULAINEN *et al.*, 2006; NAUKKARINEN *et al.*, 2005; REINER *et al.*, 2007).

Em um estudo genômico realizado na Sardenha, cuja população também é considerada geneticamente isolada, identificaram-se 76000 variantes com frequência superior a 5%, embora raras em outros lugares (<0,5% em outras populações do *1000 Genomes Project*). Avaliou-se a associação dessas variantes aos níveis circulantes de lipídios e de cinco biomarcadores inflamatórios. Quatorze loci, incluindo dois novos loci principais, foram observados associados aos níveis lipídicos e 19, incluindo dois loci novos, aos dos marcadores inflamatórios. Essas associações não foram observadas nas análises baseadas em dados do projeto *1000 Genomes*, o que

destaca as vantagens do sequenciamento em larga escala em populações isoladas, para revelar genes cujos produtos estão modulando o metabolismo e a resposta imunológica (SIDORE *et al.*, 2015).

Estudos com Huteritas, anabatistas que vivem no norte dos Estados Unidos e no oeste do Canadá, têm auxiliado a esclarecer os componentes genéticos da propensão a asma e características relacionadas. O gene *CHI3L1* (*Chitinase 3-like 1*) foi identificado como um gene de susceptibilidade à asma nessa população. Esse achado foi replicado em duas coortes populacionais de ascendência europeia (OBER *et al.*, 2008). A comparação de Huteritas com Amish, outro grupo anabatista geneticamente isolado que têm contribuído a descoberta de muitas variantes monogênicas, também tem permitido a identificação de fatores ambientais cruciais para o desenvolvimento da asma (OBER *et al.*, 2017).

TABELA 1: ASSOCIAÇÕES GENÉTICAS A DOENÇAS E CARACTERÍSTICAS COMPLEXAS EM POPULAÇÕES EUROPEIAS GENETICAMENTE ISOLADAS

Doenças complexas a características	Gene/ locus	População/ isolado	Referência
Distúrbios afetivos	Vários loci	Norte da Suécia	Venken <i>et al.</i> , (2005)
Asma	<i>IRAK-M</i>	Sardenha	Balaci <i>et al.</i> , (2007)
Asma	<i>CHI3L1</i>	Huteritas	Ober <i>et al.</i> , (2008)
Asma	<i>NPSR1</i>	Finlândia	Laitinen, (2004)
Fibrilação atrial	4q25	Islândia	Gudbjartsson <i>et al.</i> , (2007)
Transtorno Bipolar	5q31-34	Antioquia (Colombia), Vale Central da Costa Rica	Herzberg <i>et al.</i> , (2006)
Densidade mineral óssea	Vários loci	Islândia	Styrkarsdottir <i>et al.</i> , (2008)
Câncer de mama	5p12, 2q35, 16q12	Islândia	Stacey <i>et al.</i> , (2007, 2008)
Infarto do miocárdio	9p21	Islândia	Helgadóttir <i>et al.</i> , (2007, 2008)
Doença cardíaca coronária	8p22	Canadenses franceses	Engert <i>et al.</i> , (2008)
Doença de Crohn	Vários loci	Canadenses franceses	Raelson <i>et al.</i> , (2007)
Níveis de glicose em jejum	locus <i>G6PC2/ ABCB11</i>	Finlândia, Sardenha	Chen <i>et al.</i> , (2008)
Glaucoma de estrofiação	<i>LOXL1</i>	Islândia	Thorleifsson <i>et al.</i> , (2007)
Altura	Vários loci	Islândia	Gudbjartsson <i>et al.</i> , (2008)
Altura	locus <i>GDF5/ UQCC</i>	Finlândia, Sardenha, Amish	Sanna <i>et al.</i> , (2008)
Dependência de nicotina e doenças relacionadas ao tabagismo	15q24	Islândia	Thorgeirsson <i>et al.</i> , (2008)
Obesidade	<i>FTO, PFKF</i>	Sardenha	Scuteri <i>et al.</i> , (2007)
Mal de Parkinson	<i>GBA</i>	Judeus Ashkenazi	Gan-Or <i>et al.</i> , (2008)
Pigmentação	Vários loci	Islândia	Sulem <i>et al.</i> , (2007, 2008)
Câncer de próstata	Xp11.22, 2p15, 17q	Islândia	Gudmundsson <i>et al.</i> , (2007, 2008)
Distúrbios do espectro psicótico e bipolar	locus <i>TSNAX/ DISC1</i>	Finlândia	Palo <i>et al.</i> , (2007)
Psicose	<i>TGIF</i>	Vale Central da Costa Rica	Chavarría-Siles <i>et al.</i> , (2007)

Doenças complexas a características	Gene/ locus	População/ isolado	Referência
Esquizofrenia	<i>DRD2</i>	Basco	Parsons <i>et al.</i> , (2007)
Diabete tipo 2	<i>CDKAL1</i>	Islândia	Steinthorsdottir <i>et al.</i> , (2007)
Hiperlipidemia combinada familiar	<i>USF1</i>	Finlândia	Pajukanta <i>et al.</i> , (2004)
Lipídios e marcadores inflamatórios	Vários loci	Sardenha	Sidore <i>et al.</i> , (2015)

FONTE: Modificado de KRISTIANSSON; NAUKKARINEN; PELTONEN, (2008).

LEGENDA: *ABCB11* - ATP-binding cassette subfamily B member 11; *CDKAL1* - CDK5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1; *CHI3L1* - Chitinase 3-like-1; *DISC1* - Disrupted in schizoprenia 1; *DRD2* - Dopamine receptor 2; *FTO* - FTO alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase; *G6PC2* - Glucose-6-phosphatase catalytic 2; *GBA* - Glucosidase beta acid; *GDF5* - Growth/differentiation factor 5; *IRAK3* - interleukin 1-receptor-associated kinase 3; *LOXL1* - Lysyl oxidase-like 1; *NPSR1* - Neuropeptide S receptor 1; *PFKP* - Phosphofructokinase, platelet-type; *TGIF* - Transforming growth factor-beta-induced factor; *TSNAX* - Translin-associated factor X; *UQCC* - Ubiquinol-cytochrome C reductase complex chaperone 1.

2.2 POPULAÇÃO MENONITA

Menonitas, Huteritas e Amish são grupos pacifistas que derivam do movimento Anabatista, que surgiu na Europa no século XVI, logo após a reforma protestante. Desde a sua origem, os menonitas mantêm tradições alemãs, como a língua (incluindo o alemão oficial e, variantes do baixo alemão), a culinária, a agricultura e a criação de gado leiteiro, assim como a crença no batismo adulto (responsável pelo termo “anabatista”, “batizar de novo”) e o pacifismo, opondo-se ao serviço militar obrigatório. O batismo como adulto e o pacifismo radical também motivaram a perseguição pela maioria dos países europeus, levando-os a sucessivas migrações. Os menonitas compõem dois grandes grupos: os suíços-alemães, que atualmente vivem no estado da Pensilvânia (Estados Unidos) e em Ontário (Canadá), e os holandeses-alemães, que vivem na América Latina e no oeste do Canadá (PENNER; GERLACH; QUIRING, 1984).

O movimento Anabatista iniciou na Suíça em 1525 e se alastrou rapidamente por toda a Europa, especialmente nos territórios do Império Alemão. Ainda no século XVI, este movimento passou a ser usado para representar a revolta popular contra o clero e a nobreza, motivando guerras civis. De fato, os únicos grupos que persistem até a atualidade, são os que se opuseram a estas revoltas, assumindo o pacifismo irrestrito. Devido a perseguição político-religiosa, muitos anabatistas fugiram para o território dos Países Baixos. No período de 1536 a 1561, o reformador anabatista holandês Menno Simons passou a liderá-los, razão que levou os seus seguidores a serem apelidados, na época, de “menonitas”. Pouco depois, outros grupos anabatistas também surgiram e foram chamados segundo seu líder, como os Huteritas (Jacob Hutter) e os Amish (Jacob Amman, um ex-menonita) (MELTON *et al.*, 2006). Contudo e especialmente sob o domínio de Carlos V, a tolerância religiosa nos Países Baixos cedeu a perseguições com punições extremamente severas, razão por um número aproximado de 2500 mártires. Neste período, os menonitas encontraram local de refúgio no delta do rio Vístula, em Danzig, na Prússia (atualmente Gdansk, na Polônia). Por 200 anos, o ambiente nesta região foi de tolerância religiosa e prosperidade econômica, embora os menonitas fossem considerados “não cidadãos” (sem os mesmos direitos dos habitantes, embora com os mesmos deveres). Em meados do século XVIII, as restrições territoriais à crescente população e o aumento da militarização os levaram a procurar terras em outros lugares (ORTON *et al.*, 2008;

PENNER; GERLACH; QUIRING, 1984). Com interesse de reassentar terras recentemente conquistadas no sul da Ucrânia, a imperatriz Catarina II, os convidou para viverem no sul da Rússia, garantindo liberdade religiosa (PAULS JR, 1980). Cerca de 2000 pessoas (aproximadamente 423 famílias) emigraram de 1788 até 1868 em diversas levas para a Ucrânia, posteriormente ocupando grande parte do império russo (apenas 4 colônias de Danzig não apresentaram emigrantes). Na Rússia, desfrutaram de aproximadamente um século de grande prosperidade, fundando quatro colônias mães (Chortitza, Molotschna, Am Trakt e Alt Samara) e diversas colônias filhas, chegando a cerca de 45000 indivíduos no fim do século XIX e 80000 indivíduos no início do século XX (cada família tinha em média, 6 filhos -- dados de GLOBAL ANABAPTIST MENNONITE ENCYCLOPEDIA ONLINE, 2015).

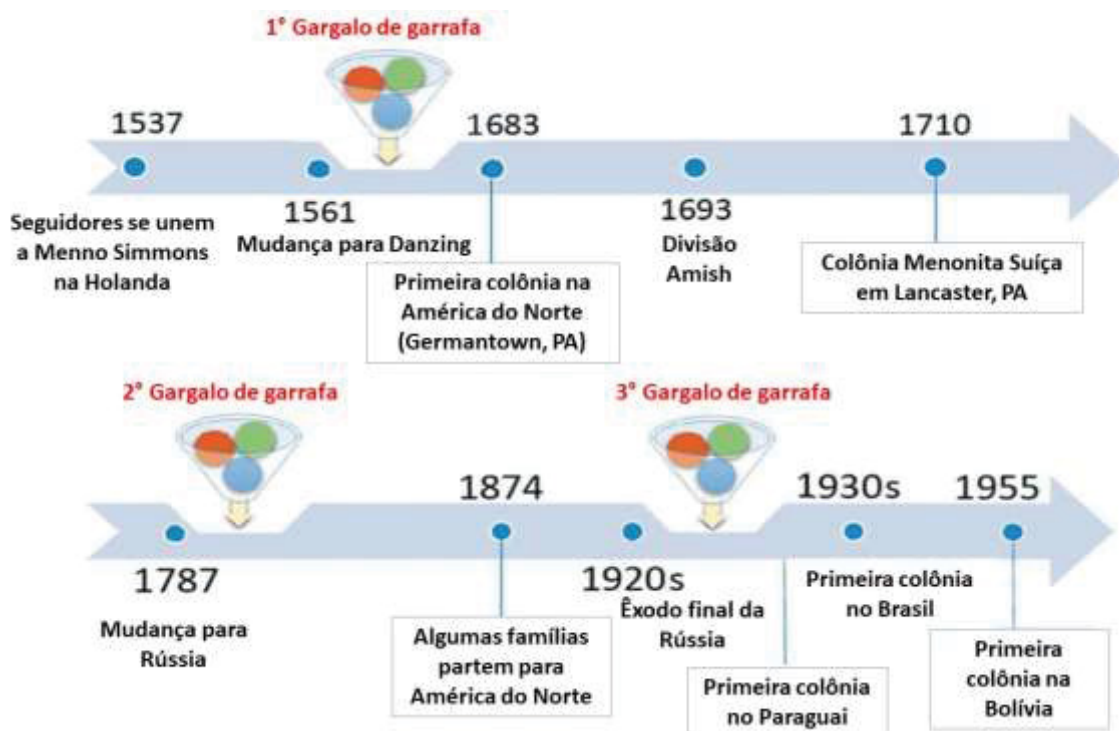
Após a revolução bolchevique de 1917, na Rússia, e mortandade subsequente devido à anarquia, guerra civil (colônias menonitas eram facilmente saqueadas devido a sua conduta pacifista), fome, epidemia de tifo, perseguição religiosa e política, muitos tentaram fugir. Apenas cerca de ¼ da população menonita conseguiu escapar do país, inicialmente 5000 pessoas para o Canadá (1922-1925), 2800 pessoas para o Paraguai (1930-1937) e 1200 pessoas para o Brasil (1930). Grande parte dos demais desapareceram em campos de concentração na Sibéria. Algumas famílias conseguiram escapar ilegalmente da Sibéria, atravessando a fronteira com a China. A fuga se deu pelo rio Amur congelado, em meio a um inverno extremamente rigoroso. Na China, passaram por diversas privações até conseguirem emigrar para a Alemanha, e de lá ao Brasil ou ao Paraguai (PAULS JR, 1980).

Na América do Sul, especialmente no Paraguai (deserto do Chaco) e mais tarde na Bolívia (ao redor de Santa Cruz de la Sierra), os menonitas fundaram numerosas colônias. No Brasil, aproximadamente 1.200 menonitas (200 famílias) chegaram ao estado de Santa Catarina em 1930, fundando a Colônia Krauel, que era composta por três núcleos: Waldheim, Gnadental e Witmarsum. Nos anos iniciais, dificuldades com relação ao manejo da terra e problemas na colheita de batata doce, milho e mandioca, motivaram a emigração de algumas famílias para outras regiões do Brasil. Já em 1931, vários menonitas passaram a viver nas regiões rurais onde atualmente estão localizados os bairros do Xaxim, Boqueirão e Água Verde, na cidade de Curitiba (PR). Nesta cidade, encontra-se atualmente o maior grupo de menonitas no Brasil, dos quais vários descendem de famílias que emigraram da Alemanha até o Paraguai, estabelecendo-se inicialmente no deserto do Chaco, vindo mais tarde a morar no

Brasil. Em 1949, diversas famílias, principalmente da Colônia Krauel, foram para o estado do Rio Grande do Sul, onde fundaram a Colônia Nova, nas proximidades da cidade de Bagé, atual município de Aceguá (RS). Em 1951, 74 famílias (455 pessoas) menonitas adquiriram a Fazenda Cancela, no município de Palmeira (PR), onde fundaram a Colônia Witmarsum (PAULS JR, 1980). De acordo com dados da prefeitura de Palmeira e de Aceguá, em ambas as colônias vivem aproximadamente 1.500 indivíduos (PAULS JR, 1980).

Ao longo de sua história, os menonitas passaram por três principais “gargalos de garrafa” (FIGURA 1), nos quais o número de indivíduos da população ancestral foi reduzido drasticamente em decorrência de desastres naturais. Sabe-se que um único gargalo de garrafa pode resultar em grave perda de diversidade, com consequente aumento de homozigose e desequilíbrio de ligação, devido ao efeito elevado da deriva genética que o acompanha e ao efeito fundador, no qual poucos ancestrais contribuem para formar a maior parte dos membros da geração seguinte (ARCOS-BURGOS; MUENKE, 2002). Além disso, apesar dos casamentos terem sido aleatórios dentro das colônias menonitas, aproximadamente cinco séculos de isolamento favoreceram a consanguinidade entre as famílias (LOPES *et al.*, 2016). Os casamentos consanguíneos contribuem para o aumento da homozigose por autozigose (origem comum do gene), acima do nível previsto pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg e para a expressão de determinados fenótipos recessivos devido ao compartilhamento de alelos, dentro das famílias (HOU *et al.*, 2017; PARDO-SECO *et al.*, 2016; TOSCANINI *et al.*, 2016).

FIGURA 1: EVENTOS DA GARGALO DE GARRAFA DA POPULAÇÃO MENONITA



FONTE: Adaptado de LOPES *et al.*, (2016)

Populações isoladas, como as dos menonitas, oferecem um excelente modelo para estudos com doenças complexas, devido a homoziguidade e a pouca variabilidade genética e ambiental.

Diversos estudos com relação à frequência de polimorfismos, têm sido realizados em menonitas (TABELA 2). Boldt e colaboradores (2009) analisaram a distribuição de alelos da região codificadora do gene do receptor 5 cisteína-cisteína de quimiocinas (*CCR5*) em cinco populações da América do Sul, incluindo menonitas da Colônia Witmarsum. Eles encontraram dois novos alelos não sinônimos em Ameríndios e uma alta frequência de *CCR5***D32* (variante associada à resistência inata ao vírus HIV de imunodeficiência adquirida) na população de euro-brasileiros. A frequência de *D32* na amostra de menonitas euro-brasileiros, foi duas vezes maior (14,2%), se comparada com a amostra de euro-brasileiros não Menonitas (9,3%), porém parecida com a frequência encontrada no norte europeu (14,0%). A frequência de *p.L55Q*, outro polimorfismo com provável origem europeia, foi três vezes maior em menonitas, comparado aos não-menonitas euro-brasileiros. Indicando que um efeito fundador ou gargalo de garrafa associado à deriva genética aleatória provavelmente causou o aumento das frequências alélicas *D32* e *L55Q* nessa população.

Boschmann e colaboradores (2016) realizaram outro estudo na mesma comunidade menonita. Eles investigaram a frequência dos polimorfismos *LCT**-13910 C>T e *LCT**-14010 G>C, variantes associadas à persistência da lactase em europeus e populações africanas, respectivamente, em um subgrupo de amostras de euro-brasileiros do Sul do Brasil e em menonitas. Observou-se que apenas 12% dos menonitas apresentam o genótipo *LCT**-13910 C/C, marcador para hipolactasia primária, comparado a 45% dos euro-brasileiros. Logo, a persistência da lactase chega a 88% na população menonita brasileira, comparado a somente 55% dos euro-brasileiros não-menonitas. Por sua vez, a variante *LCT**-14010 G>C, não foi observada entre os euro-brasileiros do Sul do Brasil e em Menonitas.

Nakamura e colaboradores (2014) estudaram a mutação c.6200C>A (p.A2067D) no gene *ATM* (*Ataxia-telangiectasia mutated*), que ocorre com frequência alta em populações menonitas do Canadá, México, América Central, norte da Alemanha e Holanda. Estes autores acompanharam dez indivíduos portadores desta mutação, que exibiam uma variante fenotípica de ataxia-telangiectasia (AT), caracterizada por distonia de início precoce e ataxia leve de início tardio (SAUNDERS-PULLMAN *et al.*, 2012). Diversos deles desenvolveram câncer e em sequência, reações adversas à radioterapia e/ou quimioterapia.

Na província Manitoba do Canadá, foram relatados casos de câncer de cólon não-polipomatoso hereditário (HNPCC), ou Síndrome de Lynch, em diversas famílias menonitas. Em todas essas famílias, foi observada a presença da mutação p.Trp714X no gene *MLH1* (*DNA mismatch repair protein MLH1*). O compartilhamento desta mutação por famílias não diretamente relacionadas levou-os a sugerir um possível efeito fundador. O gene mutado nestas famílias apresentou uma penetrância de 40 a 60%, com idade média de diagnóstico de HNPCC, por volta dos 40 anos (ORTON *et al.*, 2008).

Além destes, há muitos outros estudos genéticos realizados na população menonita, tais como a anemia de Fanconi (DE VRIES *et al.*, 2012), deficiência do fator intrínseco gástrico (FERRAND *et al.*, 2014), o risco de esclerose múltipla (LAUER, 2006), Síndrome de Alström (COLLIN *et al.*, 2002), Síndrome de depleção mitocondrial hepatocerebral (TADIBOYINA *et al.*, 2005), entre outras doenças hereditárias (JAWORSKI *et al.*, 1988).

TABELA 2: DOENÇAS GENÉTICAS ESTUDADAS NA POPULAÇÃO MENONITA GERMÂNICA-HOLANDESA ATÉ 2006.

Doença	Gene	Variantes^{1,2}	Alteração na proteína	Grupo/País	Referência
Síndrome de Alaström	ALMS1	Desconhecido	Desconhecido	Não informado	Collin <i>et al.</i> , (2002)
Síndrome de excesso aparente de mineralocorticóides	HSD11B2	c.680C>T	Pro277Leu	Não informado	Wilson <i>et al.</i> , (1998)
Ataxia-telangiectasia	ATM	c.5932G>T	Glu1978X	Não informado	Campbell <i>et al.</i> , (2003)
Fenda palatina com anquiloglossia	TBX22	c.354G>T	Gly118Cys	Manitoba - Canadá	Braybrook <i>et al.</i> , (2001)
Displasia cleidocranial	CBFA1	c.598A>G	Thr200Ala	Não informado	Zhou <i>et al.</i> , (1999)
Hiperplasia adrenal congênita	CYP17	c.1434_1437dupCATC	Pro482HisfsX27	Canadá	Kagimoto <i>et al.</i> , (1989)
Cegueira noturna estacionária congênita	CACNA1F	c.3166dupC	Leu1056ProfsX11	Canadá	Bech-Hansen <i>et al.</i> , (1998)
Fibrose cística	CFTR	Desconhecido	Desconhecido	Chortitza - Canadá	Jaworski <i>et al.</i> , (1988, 1989)
Cardiomiopatia hipertrofica familiar	MYBPC3	c.2373-237insG	Trp791fs	Não informado	Niimura <i>et al.</i> , (1998)
Grupo sanguíneo Froese	SLC4A1	c.1438G>A	Glu480Lys	Não informado	McManus <i>et al.</i> , (2000)
Síndrome de depleção mitocondrial hepatocerebral	DGUOK	c.763G>T	Asp255Tyr	Chortitza - Canadá	Tadiboyina <i>et al.</i> , (2005)
Câncer de cólon não polipomatoso hereditário	MLH1	c.2141G>A	Trp714X	Não informado	Orton <i>et al.</i> , (2008)
Hipofosfatasia (perinatal) infantil	ALPL	c.1001G>A	Gly334Asp	Canadá	Greenberg <i>et al.</i> , (1993)
Hipofosfatasia juvenil/adulta	ALPL	c.[1001G>A]+[571G>]	[Gly334Asp]+[Glu191Lys]	Canadá	Greenberg <i>et al.</i> , (1993)
Síndrome de Leigh	MT-RNR2	m.3197T>C		Não informado	Huntsman <i>et al.</i> , (2005)
Hipertermia maligna	RYR1	c.1840C>T	Arg614Cys	Manitoba - Canadá	Serfas <i>et al.</i> , (1996)
Síndrome de Renpenning	PQBP1	c.640_641insC	Arg214ProfsX13	Não informado	Lenski <i>et al.</i> , (2004)
Dermopatia restritiva	ZMPSTE24	c.54dupT	Ile191TyrX28	Não informado	Moulson <i>et al.</i> , (2005)
Focomelia de Roberts/SC	ESCO2	Desconhecido	Desconhecido	Não informado	Vega <i>et al.</i> , (2005)
Imunodeficiência combinada severa	ZAP70	c.1624-11G>A	K540_K541insLEQ	Não informado	Arpaia <i>et al.</i> , (1994)

FONTE: Adaptado de ORTON *et al.* (2008).

LEGENDA: ¹. Utilizando nomenclatura padronizada, onde o primeiro nucleotídeo (+1) corresponde ao A do ATG e o primeiro códon de iniciação é o ATG. ² Designações da nomenclatura podem ter mudado a partir da publicação original. ALMS1 - *ALMS1 centrosome and basal body associated protein*; ALPL - *alkaline phosphatase*;

ATM - Ataxia-telangiectasia mutated gene; *CACNA1F* - Calcium-channel, voltage-dependent, alpha 1F-subunit; *CFTR* - Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; *CYP17* - Cytochrome P450 family 17 subfamily A polypeptide 1; *DGUOK* - deoxyguanosine kinase; *HSD11B2* - 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II; *ESCO2* - Establishment of sister chromatid cohesion N-acetyltransferase 2; *MLH1* (DNA mismatch repair protein *MLH1*); *MTRNR2* - ribosomal RNA, mitochondrial 16S; *MYBPC3* - Myosin-binding protein C, cardiac; *PQBP1* - Polyglutamine-binding protein 1; *RUNX2* - Runt-related transcription factor 2; *RYR1* - ryanodine receptor 1; *SLC4A1* - Solute carrier family 4 (anion exchanger) member 1; *TBX22* - T-box 22; *ZAP70* - Zeta-chain-associated protein kinase 70; *ZMPSTE24* - Zinc metalloproteinase *Ste24*.

2.3 DOENÇA CELÍACA

2.3.1 Aspectos clínicos

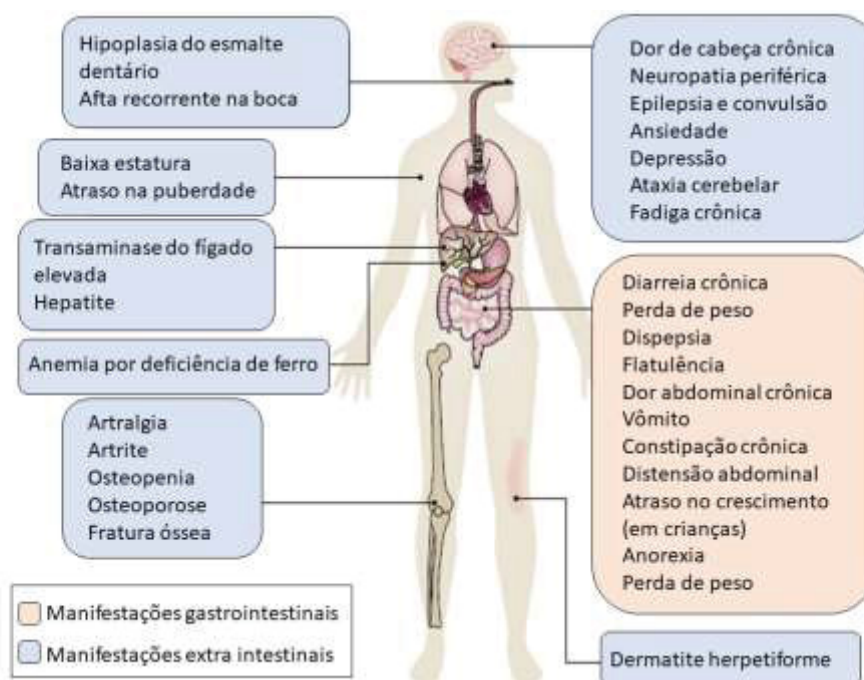
As manifestações clínicas da DC variam entre os pacientes de acordo com a idade do paciente, sua duração, extensão e presença de sintomas intestinais e/ou extra-intestinais, podendo ser subdividida nas formas clássica, não clássica e assintomática (FIGURA 2) (HUSBY *et al.*, 2012).

A forma clássica ocorre entre 6 e 18 meses de vida e os sintomas mais comuns são os gastrointestinais como: diarreia ou constipação crônica, perda de peso, inchaço abdominal, flatulência e dor abdominal crônica (FASANO; CATASSI, 2001; GUANDALINI; ASSIRI, 2014; HUSBY *et al.*, 2012). A forma não clássica é diagnosticada em crianças ou adultos os quais possuem manifestações extra-intestinais como: dermatite herpetiforme, anemia ferropriva, baixa estatura, osteoporose, hipoplasia do esmalte dentário, hepatite crônica (FASANO; CATASSI, 2001; GREEN; CELLIER, 2007; GUANDALINI; ASSIRI, 2014). É importante ressaltar que os sintomas extra-intestinais compreendem uma proporção substancial das manifestações clínicas da DC. A dermatite herpetiforme (caracterizada por bolhas de prurido, principalmente nos cotovelos, joelhos, nádegas e couro cabeludo), está presente em até 10% dos adultos com DC, sendo considerada a manifestação extra-intestinal mais bem caracterizada (COLLIN *et al.*, 2017). Osteoporose e anemia também são comuns entre os adultos. A prevalência de anemia em celíacos é de aproximadamente 12% a 20% (GREEN *et al.*, 2001; HARPER *et al.*, 2007). O grau de osteoporose varia de acordo com a idade e, com o status da menopausa entre as mulheres, no entanto tem sido observado em até 50% de homens e 40% de mulheres com DC (MEYER *et al.*, 2001).

A DC também pode ser assintomática em alguns indivíduos. Nestes casos, os pacientes não apresentam nenhum sintoma, porém possuem lesões graves na mucosa intestinal (FASANO; CATASSI, 2001; GREEN; CELLIER, 2007; GUANDALINI; ASSIRI, 2014). A identificação desses indivíduos geralmente ocorre por triagem ativa em grupos de risco (por exemplo, nos familiares de pacientes e em pacientes com distúrbios autoimunes, como diabetes mellitus tipo 1) (HUSBY *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2015). Logo, o diagnóstico e tratamento precoce desses indivíduos diminui a incidência de complicações (KOTZE *et al.*, 2001; PITTSCHIELER;

GENTILI; NIEDERHOFER, 2003). Osteoporose, esterilidade, distúrbios neurológicos e psiquiátricos, adenocarcinoma do intestino delgado, linfoma e carcinoma do esôfago, são exemplos de complicações que podem ocorrer devido ao diagnóstico tardio ou a não conformidade com a dieta isenta de glúten (GREEN; LEBWOHL; GREYWOODE, 2015; KOTZE, 2009).

FIGURA 2: MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA CELÍACA



FONTE: Adaptado de LINDFORS *et al.*, (2019)

2.3.2 Diagnóstico

De acordo com a Sociedade Europeia de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica (ESPGHAN), a base para o diagnóstico da DC compreende os testes sorológicos e a determinação da morfologia da mucosa do intestino delgado por biópsia jejunal. Também é recomendada a genotipagem dos alelos do HLA de classe II (DQ2.5 e DQ8) (RUBIO-TAPIA *et al.*, 2013).

Três marcadores sorológicos são utilizados para auxiliar o diagnóstico da DC, são eles: uma forma anti-deaminada de peptídeos da gliadina, o IgA transglutaminase anti-tecido (tTG) e o IgA antiendomísio (EmA). O EmA também é utilizado para monitorar pacientes que estão seguindo uma dieta livre de glúten. Os anticorpos anti-gliadina foram os primeiros marcadores sorológicos para DC a serem utilizados na prática clínica. Embora a sua detecção tenha alta sensibilidade para identificar a

doença, resultados falso-positivos para a DC foram observados em indivíduos com esofagite, colite ulcerativa, fibrose cística, Síndrome de Down, gastrite, doença de Crohn, condições que também elevam os níveis séricos de anticorpos anti-gliadina (HILL *et al.*, 2005). Sendo assim, a especificidade do teste de anticorpos anti-gliadina, que usa peptídeos nativos de gliadina como antígeno, não é considerada alta o bastante para definir o diagnóstico. Como alternativa a este teste, desenvolveu-se outro que utiliza peptídeos de gliadina deaminada (DGP) como antígenos, para detectar anticorpos específicos (HOERTER *et al.*, 2017; KORPONAY-SZABÓ *et al.*, 2003; LEWIS; SCOTT, 2010). Esse teste pode ajudar a reconhecer alguns pacientes com DC, que não são detectados pelos testes estabelecidos de EmA e tTG. No entanto, os testes para anticorpos anti-DGP ainda não são de uso comum na prática clínica.

Os testes sorológicos considerados mais precisos para a DC detectam anticorpos IgA para peptídeos EmA e tTG. Ambos têm as mais altas especificidades (97 e 100%, respectivamente) e sensibilidades (90 e 98%, respectivamente) (CHOU *et al.*, 2017; GIERSIEN *et al.*, 2012; LEWIS; SCOTT, 2006). O EmA é uma ótima fonte de monitoramento dos pacientes, pois esse teste se torna rapidamente negativo quando o paciente com DC inicia a dieta livre de glúten (HARRIS *et al.*, 2012). Quando os pacientes são deficientes para IgA, recomenda-se testes para os mesmos antígenos, porém para anticorpos do isotipo IgG. O IgG-DGP é mais sensível e específico que o IgG-tTG e, por esse motivo, é o teste preferido em pacientes com deficiência de IgA (LEFFLER; SCHUPPAN, 2010). Além disso, o DGP é mais sensível que o tTG em crianças com menos de 2 anos (revisado por CASTILLO; THEETHIRA; LEFFLER, 2014).

As características histológicas do intestino delgado em indivíduos com DC apresentam gravidade e extensão variável. Alterações na mucosa intestinal podem ser encontradas em outras enteropatias. Biópsias devem ser retiradas preferivelmente durante a endoscopia superior do bulbo (pelo menos uma biópsia) e da segunda ou terceira porção do duodeno (pelo menos quatro biópsias) (HARRIS *et al.*, 2012).

Em 1990, Marsh demonstrou, pela primeira vez, uma sequência progressiva de lesões da mucosa de intestino delgado na DC, classificando-as como:

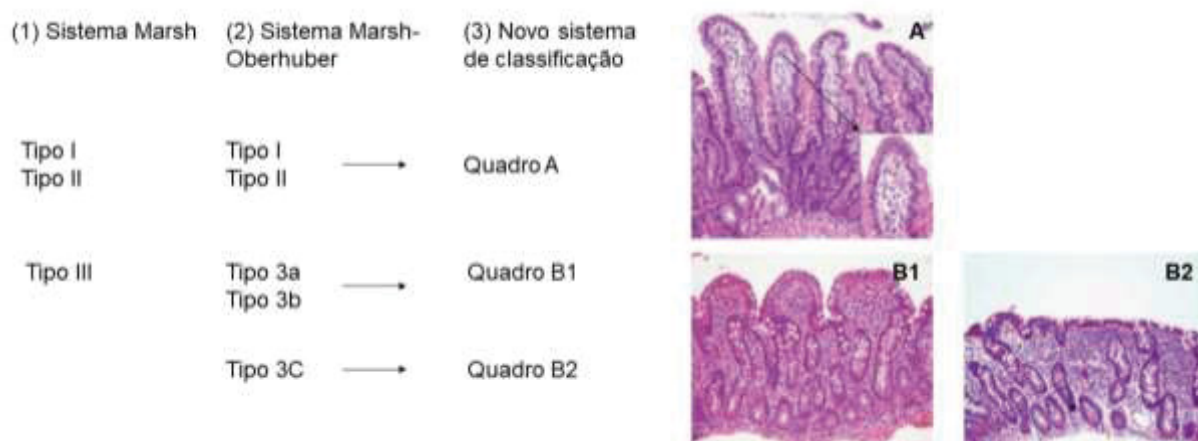
- Marsh 0: mucosa normal sem alterações histológicas;
- Marsh 1: mucosa normal, porém com aumento do infiltrado de linfócitos intra-epiteliais (LIE);

- Marsh 2: hiperplasia das criptas (alargamento) e aumento do número de LIE;
- Marsh 3: atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas e aumento do número de LIE;
- Marsh 4: atrofia total com hipoplasia críptica, considerada possivelmente irreversível e bastante rara (MARSH, 1992; MARSH; CROWE, 1995).

Mais tarde, esse sistema foi adaptado, subdividindo o estágio Marsh 3 em três subestágios (a, b e c) (MARSH, 1992; OBERHUBER; GRANDITSCH; VOGELSANG, 1999).

Já em 2007, um novo sistema foi proposto para classificar as lesões de DC em não atróficas (grau A) e atróficas (grau B) (CORAZZA *et al.*, 2007). O grau A foi caracterizado pelo aumento isolado de LIEs (> 25/100 enterócitos), enquanto o grau B foi dividido em B1, no qual a relação vilosidade/cripta é inferior a 3/1, com vilosidades ainda detectáveis, e B2, nas quais as vilosidades não são mais detectáveis (FIGURA 3) (HAYAT *et al.*, 2002). É importante ressaltar que no Brasil a classificação Marsh é a mais utilizada.

FIGURA 3: UMA COMPARAÇÃO ENTRE A CLASSIFICAÇÃO DE MARSH PARA DC



FONTE: adaptada de GUJRAL, (2012).

Classificação histológica: A, vilosidades normais com infiltração de linfócitos (Marsh 2 ou A); B, lesões e atrofia vilositárias parciais (Marsh 3 ou B1); C, lesões e atrofia vilositárias totais (Marsh 4 ou B2).

2.3.3 Tratamento

A dieta ininterrupta livre de glúten ainda é o único tratamento para a DC. O não cumprimento dessa dieta está associado ao maior risco de linfoma intestinal, anemia, osteoporose, infertilidade e, em longo prazo, outras doenças autoimunes, mesmo se assintomática ou latente (SCHUPPAN, 2000).

Novos tratamentos para a DC têm sido propostos, como drogas que visam corrigir a barreira intestinal epitelial comprometida (o chamado intestino solto) (acetato de larazotida) (KELLY *et al.*, 2013; LEFFLER *et al.*, 2015); pílulas enzimáticas que digerem glúten durante e após a ingestão (latiglutenase) (LÄHDEAHO *et al.*, 2014; SYAGE *et al.*, 2017); drogas que inibem a modificação química do glúten pelo TG2 na mucosa (ZED1227); e anticorpos monoclonais direcionados à IL-15, que visam bloquear o licenciamento de LIEs para matar células epiteliais (AMG 714). Dois medicamentos, acetato de larazotida e latiglutenase, progrediram nos estudos clínicos de fase II. O acetato de larazotida foi eficaz na redução dos sintomas desencadeados pelo glúten (LEFFLER *et al.*, 2015) e a latiglutenase atenuou a lesão induzida pelo glúten (LÄHDEAHO *et al.*, 2014). Além destes medicamentos, uma vacina está em desenvolvimento (Nexvax2). Esta atua através da dessensibilização de três peptídeos imunogênicos do trigo, centeio e cevada, como uma forma de imunoterapia, e atualmente foi aprovada em ensaios clínicos de fase I (GOEL *et al.*, 2017). Essa vacina vem sendo proposta como um futuro agente a fim de restaurar a tolerância ao glúten nos pacientes (BROWN *et al.*, 2011).

2.3.4 Epidemiologia

Por muito tempo, a DC foi considerada como um distúrbio incomum. Acreditava-se que afetava principalmente crianças e era limitada a indivíduos de ascendência europeia (LIONETTI; CATASSI, 2011). A descoberta de testes sorológicos mais sensíveis e específicos possibilitou o diagnóstico mais precoce e permitiu que o maior número de pessoas fossem triadas para DC. Dessa forma, nos últimos anos um número maior de pacientes foi diagnosticado e maior conhecimento sobre a DC foram obtidos pelas pesquisas realizadas em populações distintas. Os estudos iniciais de prevalência na população geral vieram de países europeus (JOHNSTON *et al.*, 1998; MCMILLAN *et al.*, 1996), seguidos por estudos em populações de ascendência predominantemente europeia, como a América do Norte, Austrália e Brasil (FASANO *et al.*, 2003; HOVELL *et al.*, 2001; PARRA-MEDINA *et al.*, 2015), e em outros países do Oriente Médio e na Índia (TABELA 3) (HARIZ *et al.*, 2013; MAKHARIA *et al.*, 2011; SHAMIR *et al.*, 2002).

TABELA 3: PREVALÊNCIA COMBINADA DA DC DE ACORDO COM A LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA

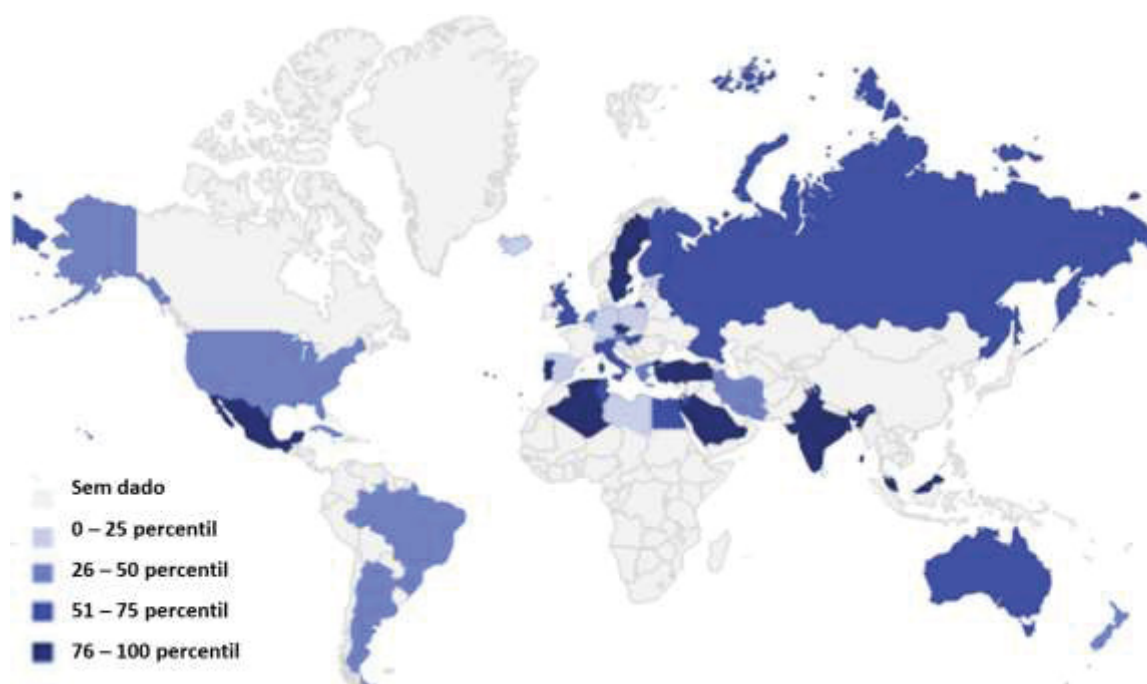
Localização Geográfica	Soroprevalência da DC% (95% IC)	Prevalência comprovada por biópsia da DC% (95% IC)
Continente		
Europa ¹	1,3 (1,1-1,5)	0,8 (0,6-1,1)
Ásia	1,8 (1,0-2,9)	0,6 (0,4-0,8)
América do Sul	1,3 (0,5-2,5)	0,3 (0,1-0,6)
América do Norte	1,4 (0,7-2,2)	0,5
África	1,1 (0,4-2,2)	0,8(0,2-1,7)
Oceania	1,4 (1,1-1,8)	0,5 (0,2-0,9)
Regiões geográficas específicas		
Oriente Médio ²	1,6 (1,2-2,1)	0,6 (0,4-0,8)
Sudeste da Ásia ³	2,6 (0,3-7,2)	0,8 (0,4-1,4)
Norte da África ⁴	1,0 (0,2-2,3)	0,4 (0,2-0,6)

FONTE: Modificado de SINGH *et al.*, (2018).

LEGENDA: DC: doença celíaca. IC: intervalo de confiança ¹ Europa inclui dados da Rússia. ² inclui dados do Irã, Turquia, Arábia Saudita, Israel, Jordânia e Egito. Todos esses países, exceto o Egito, foram incluídos na Ásia. ³ dados da Índia e da Malásia estão inclusos. Os dados de ambos os países estão incluídos na Ásia. ⁴ dados da Tunísia, Líbia, Argélia e Burkina Faso estão inclusos. Todos esses países, juntamente com o Egito, constituem os dados da África.

A soro prevalência global da DC (diagnóstico com base em resultados positivos nos testes transglutaminase e/ou anticorpo anti-endomisio) é de 1,4% (IC95% = 1,1–1,7%) (FIGURA 4). A maior soro prevalência relatada até o momento (5,6%) ocorreu em uma população isolada no oeste do Saara (CATASSI *et al.*, 1999). Em populações consideradas como principais contribuintes para o atual pool genético dos menonitas, as soro prevalências são: 1,22% para holandeses, 1,57% para alemães e 0,86% para belgas (CSIZMADIA *et al.*, 1999; HÄNDEL *et al.*, 2018; VIJGEN *et al.*, 2012). Na América do Sul, a prevalência também varia entre os países. Em um estudo realizado com crianças de cinco cidades da Argentina, foi observada uma soroprevalência de 1,26%; já no Brasil, esta varia entre 0,15-0,36% (ALENCAR *et al.*, 2012a; GANDOLFI *et al.*, 2000; MELO *et al.*, 2006).

FIGURA 4: SOROPREVALÊNCIA MUNDIAL DA DOENÇA CELÍACA

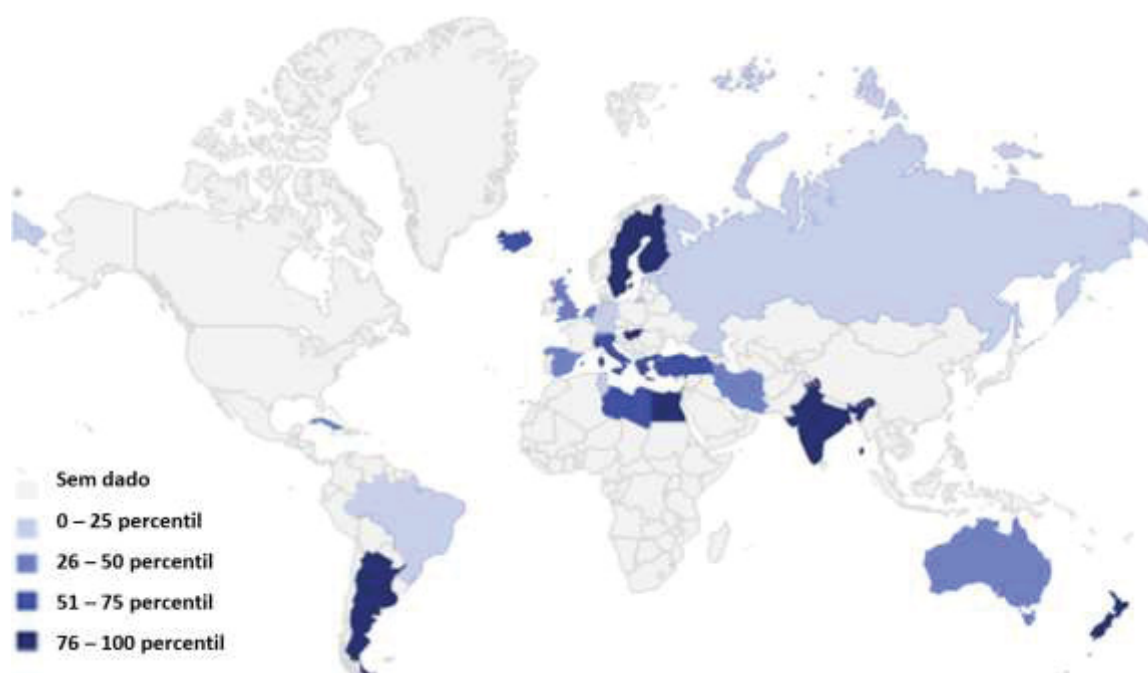


FONTE: Adaptado de SINGH *et al.*, (2018).

NOTA: Os valores de prevalência foram estratificados em 4 grupos de percentis. Os percentil mais baixo - prevalência igual ou abaixo de 0,8%; percentil mais alto - prevalência igual ou acima de 2,1%.

Por outro lado, a prevalência global de DC confirmada por biópsia intestinal é de 0,7% (IC95% = 0,5-0,9%), com a maior prevalência na Europa (0,8%) e Oceania (0,8%) e a menor prevalência na América do Sul (0,4%) (FIGURA 5). A maior prevalência observada é na Suécia (2,58%), seguida pela Finlândia, com prevalência de 2,13% (MYLÉUS *et al.*, 2009; VILPPULA *et al.*, 2008). Já na Alemanha, esta é de apenas 0,3% (KRATZER, 2013), e na Itália e Holanda, de 0,7% e 0,6%, respectivamente (BURGER *et al.*, 2014; MUSTALAHTI *et al.*, 2010). No Brasil foi observada uma prevalência de 0,24% (1:417) em Curitiba e 0,35% (1:286) em São Paulo (ALENCAR *et al.*, 2012a; PEREIRA, 2006).

FIGURA 5: PREVALÊNCIA MUNDIAL DA DOENÇA CELÍACA COM DIAGNÓSTICO POR BIÓPSIA



FONTE: Adaptado de (SINGH, 2018).

NOTA: Os valores de prevalência foram estratificados em 4 grupos de percentis. Os percentil mais baixo - prevalência igual ou abaixo de 0,4%; percentil mais alto - prevalência igual ou acima de 0,9%.

Além de variar entre os países, a DC é mais comum em mulheres, e varia dependendo do genótipo *HLA-DQB1* e *HLA-DQA1*, da presença de outras doenças autoimunes e da existência de familiares com DC (CICLITIRA *et al.*, 2005; HÖGBERG *et al.*, 2003; MEARIN, 2015; PARRA-MEDINA *et al.*, 2015; UTIYAMA *et al.*, 2007). A proporção sexual é de 2-3 mulheres: 1 homem, contudo essa diferença ocorre apenas para casos diagnosticados na idade adulta (BARDELLA *et al.*, 2005). Singh e colaboradores (2015) verificaram que 7,5% dos parentes de primeiro grau (PPGs) de indivíduos afetados e 2,3% dos de segundo grau (PSGs) possuem DC. A prevalência combinada de DC foi mais alta em irmãos (8,9%), seguida de filhos (7,9%) e pais (3,0%). Filhas e irmãs tiveram prevalência significativamente maior de DC do que irmãos, mães e pais. Os PPGs femininos apresentaram maior prevalência de DC, quando comparados aos PPGs masculinos. Além disso, a prevalência combinada de DC nos PPGs variou de acordo com sua localização geográfica, sendo a mais alta, na América do Norte.

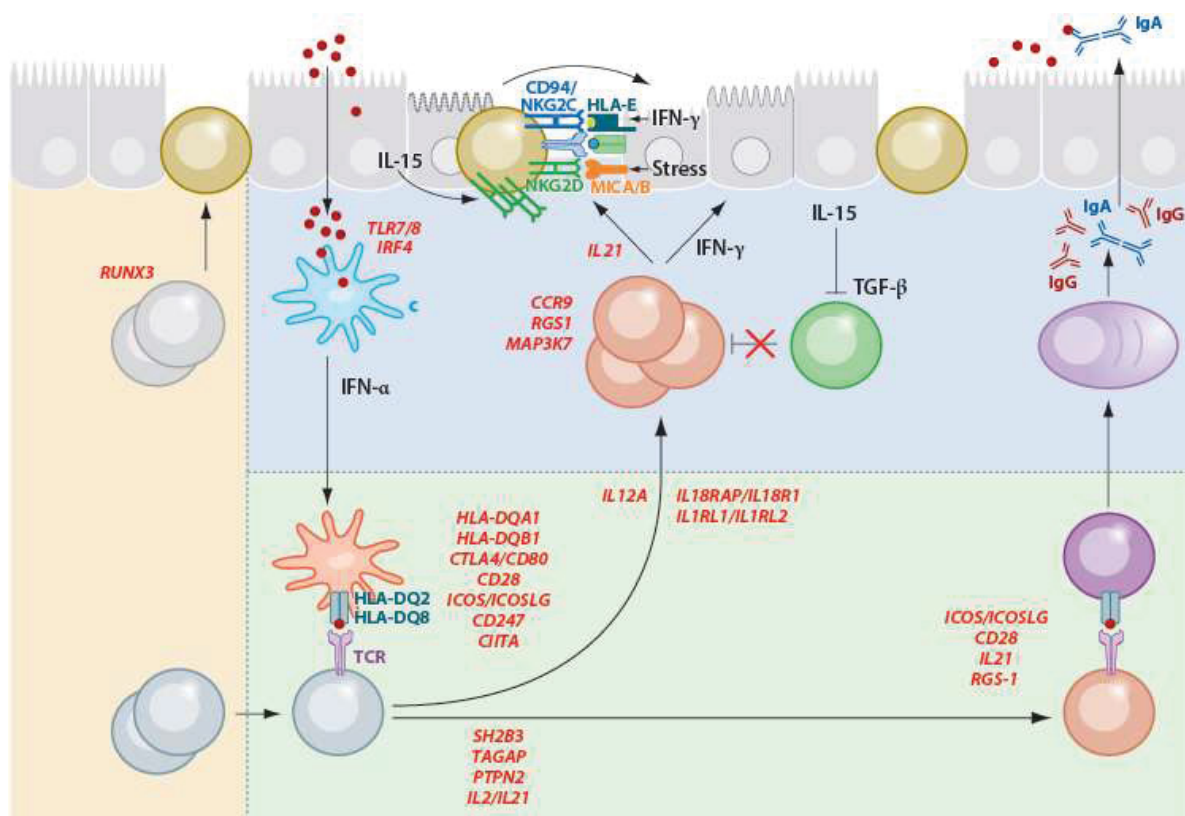
2.3.5 Fisiopatologia

Assim como em outras doenças complexas, há uma interação entre fatores ambientais, genéticos e imunológicos na DC. O glúten, principal fator ambiental que desencadeia a DC, é uma proteína rica em glutamina e prolina, sendo que a fração solúvel do glúten, que contém a maior parte dos componentes tóxicos, é a gliadina (GREEN; CELLIER, 2007). Os peptídeos ricos em prolina são particularmente resistentes à proteólise por enzimas digestivas, de modo que grandes peptídeos imunogênicos permanecem não digeridos no lúmen intestinal, podendo entrar em contato com células imunológicas residentes no intestino (SHAN *et al.*, 2002).

Após a passagem dessas proteínas pela lâmina própria, elas são deaminadas pela Transglutaminase 2 (tTG). Essa enzima multifuncional e abundantemente expressa em muitos tecidos, com localização intra e extracelular, converte resíduos de glutamina em resíduos de glutamato, carregados negativamente. Esta modificação aumenta a afinidade do peptídeo pela fenda apresentadora de antígeno dos heterodímeros de HLA-DQ2.5 ou HLA-DQ8 (revisado por ABADIE *et al.*, 2011; HENDERSON *et al.*, 2007, BERGSENG *et al.*, 2005). Como consequência, as células dendríticas HLA-DQ2/8 podem ativar eletivamente células T CD4+ específicas para glúten.

O reconhecimento dos peptídeos do glúten por células T CD4+ desencadeia respostas imunológicas, com a expressão de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e IL-21) (BODD *et al.*, 2010; CICERONE; NENNA; PONTONE, 2015; NILSEN *et al.*, 1995). Estas citocinas afetam as células epiteliais e os linfócitos intraepiteliais ativados (LIEs), os quais matam as células epiteliais, causando a atrofia das vilosidades (WITHOFF *et al.*, 2016). Os peptídeos da gliadina também ativam a resposta imunológica inata no epitélio intestinal. Esta é caracterizada por um aumento da expressão de IL-15 nos enterócitos, ativando linfócitos intra-epiteliais que expressam o receptor NK-G2D (*Killer cell lectin-like receptor, subfamily K, member 1*), um marcador de células NK (*natural killer*). As células NK ativadas tornam-se citotóxicas e matam enterócitos que expressam MIC-A (*Major histocompatibility complex class-I chain related gene A*), um antígeno de superfície celular induzido pelo estresse, como por exemplo, por uma infecção (CASTILLO; THEETHIRA; LEFFLER, 2014; DU PRÉ; SOLLID, 2015; MALAMUT *et al.*, 2010; MERESSE *et al.*, 2004) (FIGURA 6).

FIGURA 6: PATOGÊNESE DA DOENÇA CELÍACA



FONTE: Adaptado de Abadia *et al.* (2001).

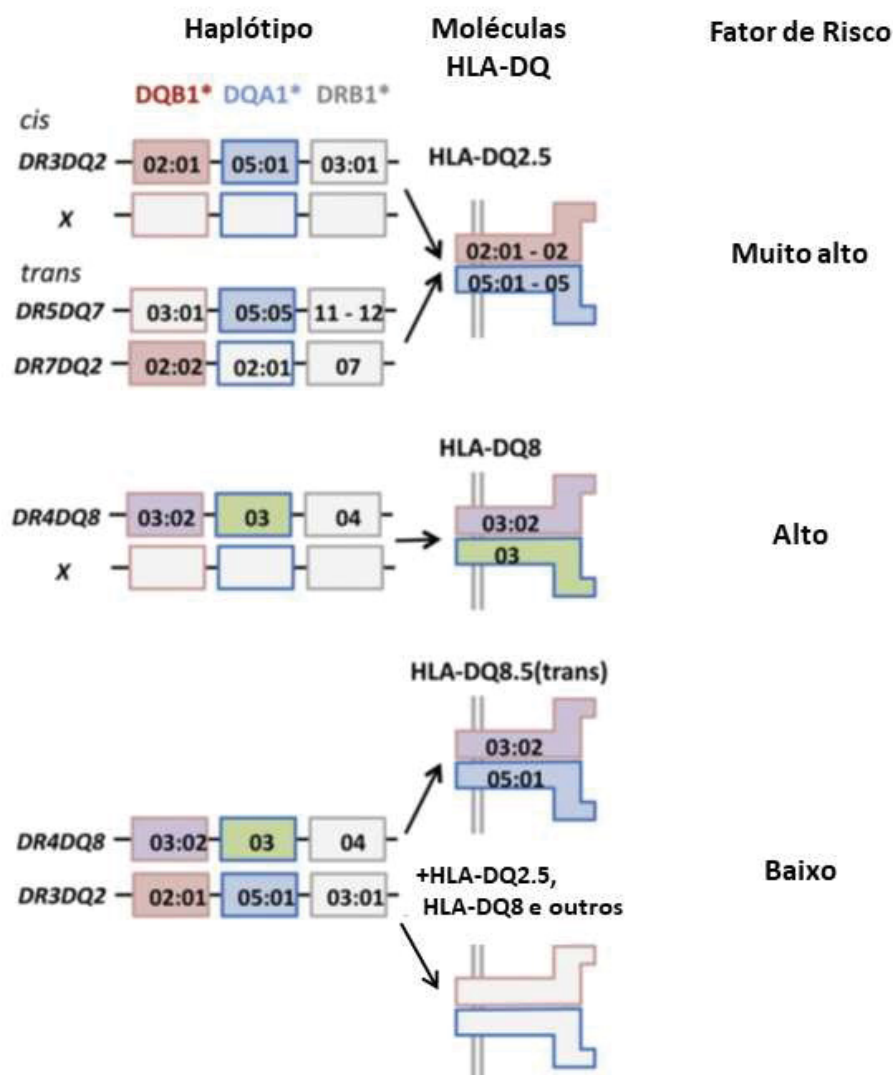
No lado esquerdo, está representada a diferenciação de células T no timo. Na parte central superior, o efeito da resposta imune na lâmina própria. Na parte central inferior, o efeito indutivo das células T no linfonodo mesentérico. Em vermelho, estão representados os produtos dos genes HLA e não-HLA e suas possíveis funções na patogênese da DC. Após a entrada dos peptídeos do glúten e posterior deaminação pela enzima transglutaminase 2 (tTG), esses peptídeos são captados por células apresentadoras de antígenos (células dendríticas ou macrófagos) e apresentados pelo heterodímero composto por duas moléculas HLA de classe II, tendo maior afinidade pelos heterodímeros HLA-DQ2 e/ou DQ8. Células T CD4+ (em cinza) reconhecem os peptídeos do glúten apresentados pelas células dendríticas e tornam-se células efetoras. Células efetoras reconhecem peptídeos apresentados por células B, diferenciam-se em plasmócitos e produzem anticorpos IgA e IgG, anti-glúten e anti-tTG. Células T CD4+ efetoras sofrem expansão clonal e desencadeiam a resposta imunológica Th1, produzindo citocinas e causando lesões no tecido intestinal.

2.3.6 Fatores genéticos

Como mencionado anteriormente, a prevalência média da DC entre parentes de primeiro grau é de aproximadamente 8%. Por meio de estudo com gêmeos monozigóticos, observou-se que a herdabilidade da DC varia entre 75-80% (NISTICÒ *et al.*, 2006, SINGH *et al.*, 2015). Parte desta herdabilidade é explicada por polimorfismos em genes HLA de classe II em 6p21, notavelmente *HLA-DQB1* e *HLA-DQA1*, cujos produtos se reúnem para compor um heterodímero de membrana responsável por apresentar antígenos às células T. Os haplótipos HLA que codificam

os heterodímeros HLA-DQ2 e DQ8 de classe II são os principais fatores de predisposição genética na DC (SOLLID *et al.*, 1989). Essas moléculas aumentam em até seis vezes, o risco de desenvolvimento da doença. Aproximadamente 95% dos pacientes celíacos expressam a molécula HLA-DQ2, codificada pelos haplótipos HLA-DQ2.5 (*DQA1*05-DQB1*02*) ou HLA-DQ2.2 (*DQA1*02:01-DQB1*02:02*). Os demais 5% expressam HLA-DQ8 (*DQA1*03-DQB1*03:02*) (GUJRAL, 2012; GUTIERREZ-ACHURY *et al.*, 2015; SOLLID; LIE, 2005; SOLLID; JABRI, 2013). Indivíduos homocigotos para HLA-DQ2.5 têm maior susceptibilidade à DC e podem manifestar sintomas mais graves, comparados a heterocigotos (MEGIORNI; PIZZUTI, 2012; ROMANOS *et al.*, 2009), possivelmente devido a uma maior afinidade para os peptídeos do glúten (VADER *et al.*, 2003) (FIGURA 7).

FIGURA 7: MOLÉCULAS DE HLA ASSOCIADAS A DOENÇA CELÍACA



FONTE: Modificado de MERESSE; MALAMUT; CERF-BENSUSSAN (2012).

HLA-DQ2 é o fator de risco genético mais forte associado a DC. A maioria dos pacientes celíacos expressam o heterodímero HLA-DQ2.5, codificado pelos alelos *DQA1*05* (cadeia α) e *HLA-DQB1*02* (cadeia β). Esses dois alelos são carregados em *cis* no haplótipo DR3-DQ2.5 ou em *trans* em indivíduos que são DR5-DQ7 e DR7-DQ2.2 heterozigotos. Indivíduos celíacos HLA-DQ2 negativos expressam HLA-DQ8, o qual é codificado pelo haplótipo DR4-DQ8. HLA-DQ2.2 é outro heterodímero do tipo DQ2, codificado pelos alelos *HLA-DQA1*0201* e *HLA-DQB1*02*, o qual confere baixo risco ao desenvolvimento da DC.

Contudo, embora 40% dos europeus apresentem *HLA-DQ2* ou *HLA-DQ8*, apenas 3% desenvolvem a DC (LIU; REWERS; EISENBARTH, 2005). A contribuição dos genes HLA para a DC em gêmeos monozigóticos, varia de 25-40% (GRECO, 2002; VAN HEEL *et al.*, 2005). Vários genes não-HLA, cujos produtos influenciam a integridade da barreira intestinal e qualidade da resposta imunológica, também

modulam a susceptibilidade à doença (GUJRAL, 2012). Por meio de estudos de associação genômica ampla (GWAS - do inglês *Genome-Wide Association Study*), observou-se que cerca de 15% da susceptibilidade genética é explicada por 57 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) localizados em 39 *loci* não HLA (RICAÑO-PONCE; WIJMENGA; GUTIERREZ-ACHURY, 2015; TRYNKA *et al.*, 2012). Segundo Kumar e colaboradores (2012), aproximadamente 81% dos SNPs associados à DC estão localizados em regiões intergênicas ou regulatórias; 5% situam-se na região 5' não traduzida (UTR), potencialmente afetando a regulação transcricional; 9% na região não traduzida a 3' (3'UTR), possivelmente alterando a estabilidade ou taxa de degradação dos respectivos RNAs mensageiros (RNAm), inibindo a tradução ou modificando sítios de ligação de micro RNAs (miRNA); e apenas 5% dos SNPs modificam sequências em regiões codificadoras. No entanto, aproximadamente 45% da herdabilidade da DC é explicada pelo somatório dos pequenos efeitos, conferidos por inúmeras variantes raras (ALMEIDA *et al.*, 2014; FEERO; GUTTMACHER; MANOLIO, 2010; GIBSON, 2012; HUNT *et al.*, 2013; RICAÑO-PONCE; WIJMENGA; GUTIERREZ-ACHURY, 2015; TRYNKA *et al.*, 2012).

Os primeiros *loci* fora da região do HLA associados com a DC estão localizados nas regiões 5q, 19p e 2q33 (GUJRAL, 2012). Dentre eles, os produtos dos genes *CD28* (*Antigen CD28*) e *ICOS* (*Inducible T cell costimulator*) estão envolvidos na ativação de células T, enquanto *CTLA4* (*Cytotoxic T lymphocyte-associated 4*) é um regulador negativo da ativação, uma vez que compete com o CD28 para os mesmos receptores, CD80 e CD86 (BOUWHUIS *et al.*, 2010; CARRENO; COLLINS, 2002). O alelo *g.203874196*G* (rs3087243) de *CTLA4*, por exemplo, está associado com proteção à DC e com a diminuição dos níveis da sua isoforma solúvel (HUNT *et al.*, 2005; MAGISTRELLI *et al.*, 1999). SNPs nesses genes também foram associados com diabetes tipo 1, lupus eritematoso sistêmico e doenças autoimunes da tireoide (ANJOS; POLYCHRONAKOS, 2004; TAHA KHALAF *et al.*, 2011).

Associações com os polimorfismos rs6822844 e rs6840978, situados a montante de *IL2* e a jusante de *IL21* na região 4q27, respectivamente, já foram observadas. Estes SNPs modulam a produção destas interleucinas, as quais promovem a síntese de interferon gama (IFN- γ), ativando e causando a proliferação de células T (KASAIAN *et al.*, 2002; MAITI *et al.*, 2010; WARREN *et al.*, 2011). A deficiência do gene *SH2B3* (*SH2 adaptor protein 3*), que é expresso em monócitos e células dendríticas (SU *et al.*, 2004) e no intestino delgado (HUNT *et al.*, 2008; PLAZA-IZURIETA *et al.*, 2011),

leva a uma maior produção de células B, revelando uma função de regulação negativa na sinalização de citocinas e na resposta celular Th2 (GUO *et al.*, 2015 *apud* TAKAKI *et al.*, 2008). O alelo mais comum *g.111446804*T* de rs3184504 (p.262Trp), está associado com maior expressão de SH2B3 na mucosa intestinal de pacientes com DC (PLAZA-IZURIETA *et al.*, 2011) e tem estado sob seleção positiva, por gerar uma resposta antibacteriana mais eficiente. Por sua vez, o alelo menos comum, *g.111446804C* (p.262Arg) está associado com um risco aumentado de DC (GUO *et al.*, 2015).

O gene *IL18RAP* (*Interleukin 18 receptor accessory protein*) localizado em 2q12.1, codifica a cadeia β (cadeia de sinalização) do receptor da IL-18, essencial para a sinalização de IL-18, resultando na produção de IFN- γ (CHEUNG *et al.*, 2005). O receptor de IL-18 (composto por IL18R1 e IL18RAP) é expresso nas células T auxiliares do tipo Th1 e nas células NK (HUNT *et al.*, 2008; KOSKINEN *et al.*, 2009 *apud* TORIGOE *et al.*, 1997), em resposta ao IFN- γ e/ou IL-12 (SARENEVA; JULKUNEN; MATIKAINEN, 2000). Este receptor é altamente expresso na mucosa intestinal de pacientes com DC não tratados, comparados com controles saudáveis (PLAZA-IZURIETA *et al.*, 2011; SALVATI *et al.*, 2002). Polimorfismos de *IL18RAP* associados à DC alteram a eficiência de ligação de miRNAs (rs7559479 ou *g.102452327G>A* afeta a ligação de hsa-miR-140-3p, hsa-miR-212 e hsa-miR-27a e cria um potencial sítio de ligação para hsa-miR-136, enquanto rs7603250 ou *g.102452374T>A* afeta a ligação do hsa-miR-668) (KUMAR; WIJMENGA; WITHOFF, 2012). Além disso, homozigotos para o alelo *g.102454108*T* (rs917997) expressam baixos níveis de RNAm e apresentam maior risco à DC (HUNT *et al.*, 2008).

2.4 INTOLERÂNCIA A LACTOSE

2.4.1 Hipolactasias e persistência da lactase

O leite materno é a fonte exclusiva de nutrição dos mamíferos nos primeiros meses de vida. Para que ocorra a clivagem da lactose (dissacarídeo presente no leite e em seus derivados) em componentes menores (glicose e galactose), e posterior digestão e absorção pelo intestino, é fundamental a presença da enzima lactase. A atividade da lactase é alta e vital durante a infância na maioria dos mamíferos, incluindo os humanos (SWALLOW, 2003). No entanto, a sua expressão diminui a partir do nascimento para níveis inferiores a 10% no período pré-desmame na

infância, mesmo em mamíferos em que o desmame é prolongado. A deficiência da enzima lactase na mucosa do intestino delgado é conhecida como hipolactasia. Essa deficiência leva a uma má absorção da lactose que, por sua vez, pode levar à intolerância à lactose (SAHI, 1994). Há três condições de hipolactasia: congênita, primária e secundária.

A forma congênita é uma condição autossômica recessiva extremamente grave. Caso não seja diagnosticada precocemente, pode levar ao óbito. O recém-nascido apresenta diarreia líquida ao ser amamentado ou ao receber fórmulas contendo lactose. Por meio de um estudo genético realizado com 24 famílias finlandesas afetadas, identificou-se cinco mutações diferentes na região codificadora do gene da lactase (*LCT*) associadas a hipolactasia congênita. A homozigose para a mutação nonsense *c.4170*T>A* (*p.Y1390X*), designada "Finmajor", foi observada em 84% dos pacientes e resulta em um códon de parada no éxon 9, gerando uma proteína truncada com 537 aminoácidos. Duas outras mutações (*p.S1666fsX1722* e *p.S218fsX224*) resultam em uma mudança de quadro de leitura, igualmente gerando uma proteína truncada, por meio de um códon de parada prematuro. Por fim, outras duas mutações causaram uma substituição de aminoácidos (*p.Q268H* e *p.G1363S*) (BEHRENDT *et al.*, 2009; KUOKKANEN *et al.*, 2006).

Diferente da IL congênita em que a enzima lactase está ausente ou não é funcional, os indivíduos com hipolactasia primária expressam uma lactase competente, porém em níveis progressivamente inferiores ao longo da vida. Geralmente a IL primária se manifesta após a infância, à medida em que ocorre a diminuição da expressão da lactase. Evolutivamente, a maioria dos mamíferos atinge um pico de atividade da lactase diretamente após o nascimento durante a lactação, quando o leite é a única nutrição. Geralmente, a atividade da lactase diminui para 5% a 10% em comparação com o nível inicial entre o desmame e antes da idade adulta, associado a alterações na composição da dieta (SIMOONS, 1970 *apud* AMIRI *et al.*, 2015).

A hipolactasia secundária ocorre quando o intestino delgado diminui a produção de lactase após uma doença, lesão ou cirurgia. Entre as doenças associadas à IL secundária, estão a doença celíaca (OJETTI *et al.*, 2005), doença inflamatória intestinal (especialmente doença de Crohn), enterites infecciosas e enterites induzidas por drogas ou radiação (MATTAR; FERRAZ; MAZO, 2010). No caso de parasitas intestinais, as infecções por *Giardia* foram associadas a uma maior

proporção de intolerância à lactose em pacientes do Gabão, na África Central, analisadas por testes de hidrogênio expirado (GENDREL *et al.*, 1992). Pacientes diagnosticados com a síndrome do intestino irritável (SII) frequentemente têm uma maior sensibilidade visceral aos efeitos luminiais da lactose, em comparação com indivíduos saudáveis (LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008 *apud* SCIARRETA *et al.*, 1984). De fato, a má digestão da lactose afeta 24-45% dos pacientes com SII, e sua exclusão dietética pode melhorar os sintomas (LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008 *apud* BOHMER *et al.*, 1996; e *apud* PARKER *et al.*, 2001). Contudo, isto não indica, necessariamente, que estes pacientes apresentam hipolactasia (FARUP; MONSBAKKEN; VANDVIK, 2004). Quando o leite sem lactose provoca os mesmos sintomas que a lactose, em sujeitos diagnosticados com IL, isto pode indicar que a patologia subjacente é SII (VERNIA; DI CAMILLO; MARINARO, 2001).

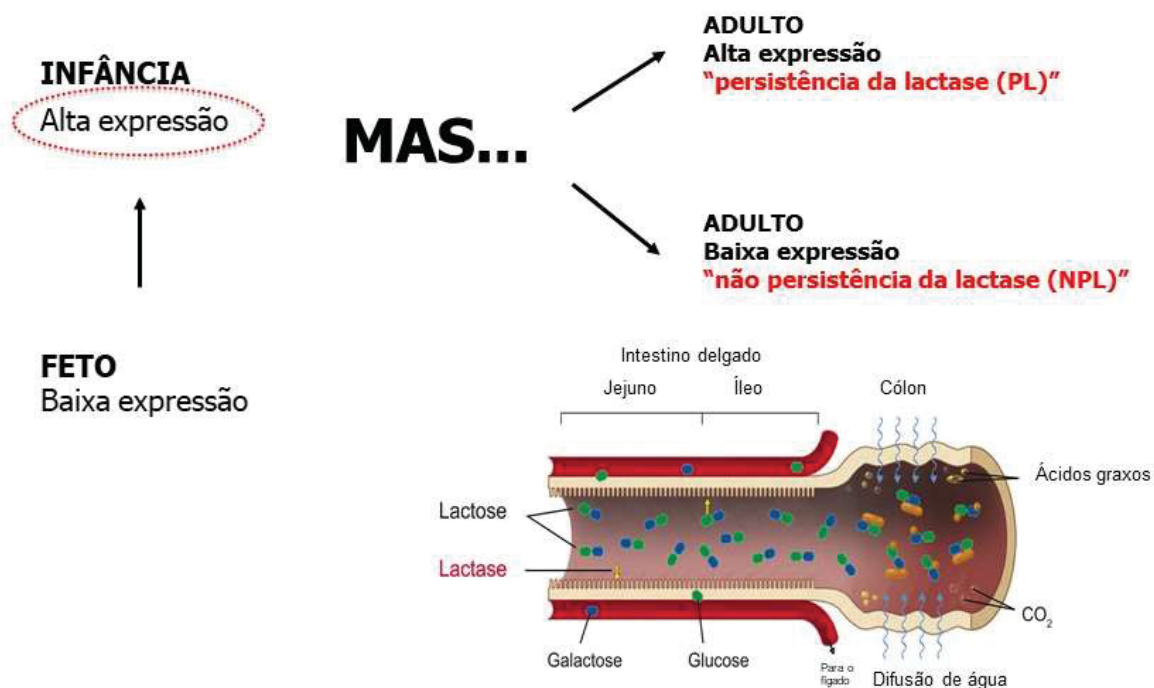
Há indivíduos que mantêm o seu nível neonatal de expressão da lactase quando adultos, sendo conhecidos como persistentes para a lactase (TROELSEN, 2005). Estes apresentam mutações na região intensificadora do gene *LCT*, que ocorre em um intron do gene vizinho, *MCM6* (*Minichromosome maintenance complex component 6*). Dentre estas, rs4988235 (*c.1917+326C>T*, conhecido como *LCT-13910 C>T*) e rs182549 (*c.1362+117G>A*, conhecido como *LCT-22018 G>A*) são os SNPs mais comuns em europeus com ancestral tradição pastoril. Interessantemente, há outros SNPs associados com a persistência da expressão da lactase na mesma região do gene *MCM6*, como rs145946881 (*c.1917+226G>C* ou *-14010 G>C*) em povos pastoris africanos, indicando que a atividade pastoril e a persistência da lactase provavelmente coevoluíram ao longo da história (BERSAGLIERI *et al.*, 2004; HOLDEN; MACE, 1997; INGRAM *et al.*, 2009; TISHKOFF *et al.*, 2007).

2.4.2 Aspectos clínicos

A IL não causa nenhum distúrbio ou desconforto, a menos que alimentos que contenham lactose sejam consumidos. Em indivíduos com IL, a microflora fermenta a lactose não digerida no lúmen intestinal, o que leva à produção de ácidos graxos de cadeia curta, hidrogênio, dióxido de carbono e metano. Esses subprodutos causam inchaço, flatulência e dor abdominal. Além disso, a lactose não digerida acidifica o cólon e aumenta a carga osmótica, resultando em diarreia. Embora a diarreia relacionada à IL possa se tornar crônica, os pacientes geralmente não perdem peso.

No entanto, alguns indivíduos podem desenvolver constipação devido à diminuição da motilidade intestinal (LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008) (FIGURA 8).

FIGURA 8: ASPECTOS CLÍNICOS DA HIPOLACTASIA PRIMÁRIA



FONTE: sedida por Alessia Ranciaro (comunicação pessoal).

Sintomas extra intestinais também podem ser observados nos pacientes. Entre eles, estão as queixas sistêmicas, como dor de cabeça, vertigem, comprometimento da memória, letargia, dores musculares e articulares, alergia, arritmia cardíaca, úlceras na boca e dor de garganta (HARRINGTON; MAYBERRY, 2008; MATTHEWS *et al.*, 2005). Quando há queixas sistêmicas, é importante avaliar se elas resultam da IL, ou se são devido a uma alergia à caseína, proteína do leite de vaca, presente em até 20% dos pacientes com sintomas de IL (LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008).

De acordo com a capacidade do paciente de digerir a quantidade de lactose ingerida, a gravidade dos sintomas varia consideravelmente. Os fatores que contribuem para essa variabilidade incluem osmolaridade e conteúdo de gordura dos alimentos que contêm lactose, taxa de esvaziamento gástrico, capacidade da microflora colônica de fermentar lactose, tempo de trânsito intestinal, capacidade de absorção de água do cólon e percepção individual de dor e desconforto abdominal (LOMER; PARKES; SANDERSON, 2008; SUCHY *et al.*, 2010).

Em uma revisão sistemática, Shaukat e colaboradores (2010) avaliaram a dose máxima tolerável de lactose para participantes com má absorção de lactose e com IL. Observou-se que uma dose única de lactose (até 12 g, equivalente à contida em aproximadamente um copo de leite) administrada isoladamente produz nenhum ou menor sintoma em pessoas com IL ou má digestão à lactose. As doses de lactose de 15 a 18 g são bem toleradas quando oferecidas juntamente com outros nutrientes. Dose superiores a 18 g, a intolerância se torna progressivamente mais frequente e quantidades acima de 50 g provocam sintomas na maioria dos indivíduos.

2.4.3 Diagnóstico

Uma das formas de diagnosticar a IL é pelo teste de curva glicêmica. Neste exame, o indivíduo ingere de 25 a 50g de lactose. Seus sintomas são avaliados por duas a três horas, além da coleta de sangue em intervalos de tempo pré-definidos para a análise da absorção da lactose pelo aumento da glicose no sangue (curva glicêmica). Se o indivíduo absorver a lactose, a glicemia deve se elevar de 1,4 mMol/L ou mais (RIDEFELT; HÅKANSSON, 2005).

Outra forma de diagnóstico é o teste respiratório do hidrogênio expirado. O exame se baseia na produção de hidrogênio, em decorrência da fermentação da lactose não absorvida: o hidrogênio entra na corrente sanguínea e é expirado pelo pulmão. O paciente sopra no equipamento para medir o nível de hidrogênio basal, ingere a lactose, e depois sopra novamente em intervalos de 60, 90, 120, 150 e 180 minutos. O exame é considerado positivo, quando ocorre aumento de hidrogênio expirado em 20 ppm (partes por milhão), em relação ao valor basal. O paciente intolerante relata sintomas durante o exame, geralmente coincidindo com o aumento do hidrogênio expirado (ROMAGNUOLO; SCHILLER; BAILEY, 2002).

Devido à alta concordância com resultados de testes para tolerância à lactose (curva glicêmica ou teste respiratório do hidrogênio expirado), a tipagem do polimorfismo *LCT**-13910C>T passou a incorporar a rotina de exames de laboratório para diagnosticar a hipolactasia primária (RIDEFELT; HÅKANSSON, 2005; ROMAGNUOLO; SCHILLER; BAILEY, 2002). Em europeus esta variante está significativamente associada a persistência da lactose. Estudos funcionais indicaram que a persistência da lactase é atribuída à presença do alelo -13190T, por sua vez a hipolactasia primária é decorrente do genótipo -13910 C/C (ENATTAH *et al.*, 2002).

2.4.4 Tratamento

A recomendação inicial para o manejo da intolerância à lactose é buscar a remissão dos sintomas, com dieta restritiva de lactose. Como mencionado anteriormente, a maioria dos indivíduos pode tolerar até 12 g de lactose sem sintomas significativos. Após a dieta inicialmente restrita, a lactose deve ser gradualmente reintroduzida até que o limiar de sintomas do paciente seja atingido. Nesse ponto, várias medidas comportamentais podem ser adotadas para superar possíveis sintomas, incluindo a ingestão de produtos lácteos fermentados e amadurecidos, consumindo a lactose junto com outros alimentos e distribuindo a ingestão de lactose, ao longo do dia.

Outras formas de tratar a IL é com terapia de reposição com lactase exógena, consumo de leite hidrolisado ou reduzido em lactose. A ingestão de probióticos contendo lactase pode ter o potencial de auxiliar a digestão da lactose em pacientes intolerantes, porém há estudos com resultados conflitantes. Portanto, o papel dos probióticos no manejo da IL ainda é incerto (MONTALTO *et al.*, 2006).

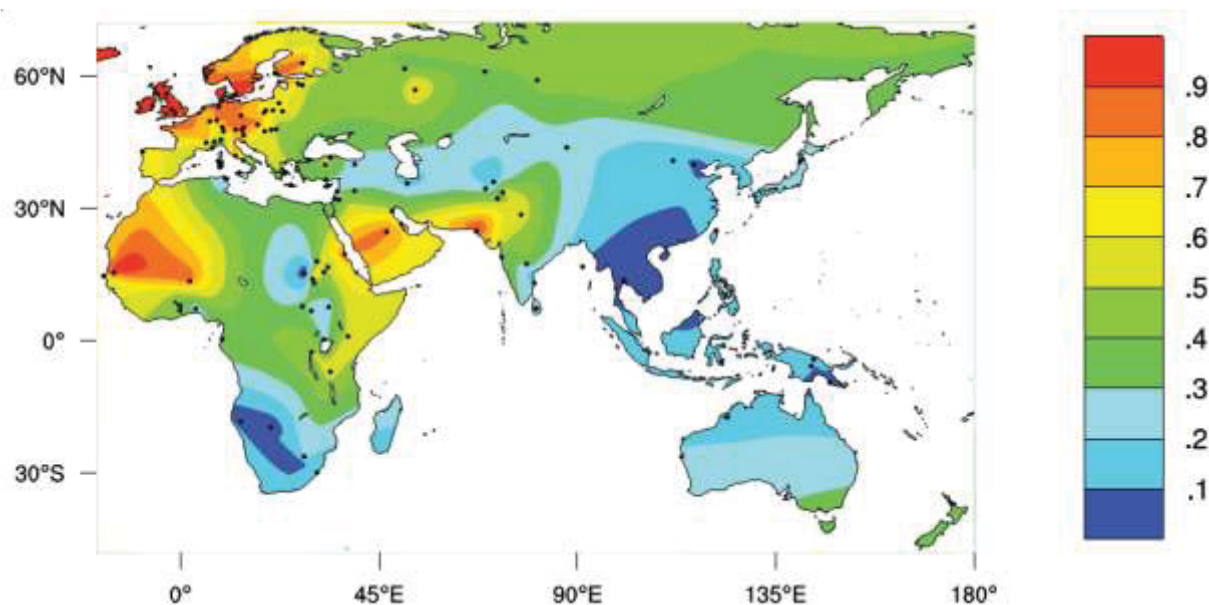
2.4.5 Epidemiologia

A prevalência da IL varia substancialmente entre as populações (FIGURA 9). A seleção natural desempenhou um papel importante na determinação das frequências de persistência da lactase em diferentes populações humanas desde o desenvolvimento da domesticação de gado na Europa, no Oriente Médio e no norte da África, bem como no aumento da frequência alélica de variantes genéticas associadas a persistência da lactose (*LCT-13910 C>T* e *LCT-22018 G>A* os SNPs mais comuns em europeus e *14010 G>C* em povos pastoris africanos) (BERSAGLIERI *et al.*, 2004; HOLDEN; MACE, 1997; INGRAM *et al.*, 2009; TISHKOFF *et al.*, 2007).

No nordeste da Europa, próximo ao Mar do Norte, a prevalência da IL é de 5%, com a menor prevalência encontrada na Dinamarca (4%), na Grã-Bretanha (5%) e na Suécia (1 a 7%). Na Alemanha, a prevalência é próxima a 14,8% (FLATZ *et al.*, 1982). Em um estudo realizado no Brasil, observou-se uma prevalência da IL de 57% entre os descendentes de europeus, de 89,3% em indígenas Terena e 100% em descendentes de japoneses (DOS SANTOS ALVES; DE MORAIS; FAGUNDES-NETO, 2002; MATTAR *et al.*, 2009). Na África, com diferentes variantes alélicas, a

persistência da lactase também foi mais frequente nos povos com tradição de pecuária, em relação aos agricultores (MATTAR; FERRAZ; MAZO, 2010; TISHKOFF *et al.*, 2007).

FIGURA 9: MAPA COM INTERPOLAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS FENOTÍPICAS DA PERSISTÊNCIA DA LACTASE NO VELHO MUNDO, DE ACORDO COM DADOS DA LITERATURA.



FONTE: ITAN *et al.*, 2010.

NOTA: Os pontos representam os locais de coleta. As cores e os números mostram as frequências do fenótipo persistência da lactase, estimados por interpolação de superfície.

2.4.6 Regulação da Lactase

Nos seres humanos, a expressão da lactase muda durante o desenvolvimento pós-natal, levando a fenótipos conhecidos como persistência e não persistência da lactase. Polimorfismos no potencializador do gene da lactase, em particular o *LCT-13910*C>T*, estão associados a esses fenótipos. No entanto, o mecanismo molecular responsável pelo aumento progressivo da IL com o aumento da idade não é completamente compreendido. Labrie e colaboradores (2016) identificaram elementos reguladores em haplótipos de *LCT-MCM6*, que são epigeneticamente controlados e nos quais a metilação diferencial do DNA foi associada a diferenças interindividuais na expressão do mRNA da lactase. Os haplótipos com o alelo *-13910C* acumulam citosinas metiladas que silenciam os elementos reguladores no *MCM6* e no *LCT*, enquanto o haplótipo de persistência de lactase, contendo o alelo *-13910T*, exibe alterações que mantêm a atividade de expressão do *LCT*. No entanto, os

autores não levaram em consideração os níveis de atividade enzimática da lactase, na definição dos fenótipos de persistência e não persistência da lactase.

Ao contrário, Leseva e colaboradores (2018) também realizaram análises incluindo a expressão gênica da lactase e a atividade enzimática. Assim como Labrie e colaboradores (2016) estes autores observaram que os alelos do polimorfismo rs4988235 estão associados aos níveis médios de metilação do DNA nas ilhas CpG próximas ao *LCT*. Indivíduos com o genótipo *-13910 C/C* apresentaram níveis de metilação significativamente superiores aos de indivíduos com o genótipo *C/T*. Estes, por sua vez, apresentaram níveis de metilação superiores aos de homozigotos *T/T*. Estas diferenças também foram observadas comparando indivíduos não persistentes e persistentes para a expressão da lactase. De fato, a maior parte da variação da metilação do DNA nessa região é explicada apenas pelo genótipo de rs4988235.

3 JUSTIFICATIVA

Embora o Plano Nacional de Saúde de 2013 tenha sido o mais extenso levantamento epidemiológico já realizado no Brasil, por meio de entrevistas e medições biométricas em cerca de 80.000 domicílios brasileiros (MALTA; SZWARCOWALD, 2015b), sua execução não permitiu avaliar diferenças epidemiológicas entre a população neobrasileira e populações geneticamente mais isoladas que residem no Brasil, como é o caso dos menonitas. Conhecer as especificidades epidemiológicas desta população é muito importante para o desenvolvimento de estratégias de capacitação de famílias que têm sofrido psicologicamente e economicamente com doenças, para as quais herdaram um grau mais elevado de predisposição. Além de compreender uma etapa essencial para a elaboração e melhoria de programas e políticas públicas de saúde, o levantamento fundamenta futuros estudos de associação para a identificação de variantes genéticas que predisõem ao desenvolvimento de características e doenças complexas. Ao empoderar o participante com o conhecimento da sua individualidade genética quanto a variantes genéticas de interesse clínico-preventivo, com o devido acompanhamento clínico e psicológico de profissionais já engajados no projeto, este se torna mais consciente de medidas que permitem minimizar o risco de apresentação de certas doenças crônicas e retardar e/ou diminuir sintomas decorrentes da predisposição genética a doenças complexas.

Os hábitos alimentares dos menonitas se assemelham aos de populações do norte europeu, principalmente às do Norte da Alemanha, Bélgica e Países Baixos, os quais têm por tradição o consumo diário de alimentos contendo glúten, principal proteína presente em alimentos produzidos com trigo, centeio e cevada e de alimentos contendo lactose, como leite e seus derivados. Sabendo que a história demográfica da população menonita favorece o aumento da frequência de doenças e que a IL frequentemente mascara o diagnóstico da DC em decorrência de sintomas comuns (OJETTI *et al.*, 2005), cujo início pode ser muito insidioso, culminando em outras manifestações autoimunes graves e neoplasias (GREEN; LEBWOHL; GREYWOODE, 2015; KOTZE, 2009), é de fundamental importância realizar uma triagem populacional destas doenças gastrointestinais. De fato, a realização deste trabalho não somente permitiu a verificação e levantamento dos casos, mas a conscientização da

comunidade e de suas famílias, quanto à importância do diagnóstico precoce de doenças, assim como o aconselhamento genético das famílias acometidas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o levantamento epidemiológico de doenças complexas e de fatores de risco e avaliar a associação genética com a doença celíaca e a intolerância a lactose na população menonita, comparando os resultados com os da população brasileira não menonita e de populações europeias ancestrais.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a população menonita brasileira com relação a características biométricas e demográficas, rotas migratórias, hábitos alimentares, exposição a mutágenos, prevalência e agregação familiar de doenças complexas;
- Comparar os perfis epidemiológicos entre as principais colônias menonitas brasileiras – Colônia Witmarsum (Palmeira - PR), Curitiba (PR) e Colônia Nova (Aceguá - RS);
- Identificar, através da comparação do perfil epidemiológico menonita com o e de populações europeias ancestrais, se há um compartilhamento genético entre essas populações;
- Identificar, através da comparação do perfil epidemiológico menonita com o da população brasileira, se há um compartilhamento ambiental entre essas populações;
- Identificar, através do rastreamento sorológico, a presença da DC em menonitas assintomáticos;
- Caracterizar a distribuição das variantes HLA-DQ2 e DQ8 predisponentes à DC, em menonitas;
- Caracterizar a distribuição do polimorfismo *LCT**-13910T>C para a persistência da expressão da lactase em menonitas e euro-brasileiros não menonitas;
- Identificar novas variantes genéticas associadas a IL nestas populações.

5 CAPÍTULO I

Neste capítulo, foram compilados e analisados os principais dados obtidos do levantamento epidemiológico realizado nas comunidades menonitas de Curitiba (CWB), Colônia Witmarsum (CWI) e Colônia Nova (CON). Devido ao pequeno número amostral obtido de indivíduos não menonitas residentes nestas comunidades (105 indivíduos das três localidades, ao total), apenas os resultados dos indivíduos menonitas serão apresentados. Mais do que realizar uma descrição exaustiva de todos os dados obtidos no levantamento, selecionou-se as variáveis mais importantes para desenhar um panorama geral do perfil epidemiológico da população menonita e de suas comunidades no Sul do Brasil. Neste contexto, serão analisados os fatores de propensão às doenças gastrointestinais desta população, nos capítulos seguintes.

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Levantamento epidemiológico

Todos os indivíduos foram esclarecidos quanto aos objetivos da pesquisa, assinando um termo de consentimento livre esclarecido (TCLE). Menores de 18 anos e com pelo menos 12 anos de idade assinaram o termo de assentimento (TALE), e puderam participar do estudo após o consentimento de seus pais ou responsáveis, em TCLE apropriado (Apêndices A ao D). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (CEP SCS-UFPR) e está incluído em dois projetos, representados pelos protocolos 2.247.952 - CAAE 55297916.6.0000.0102 (projeto “Levantamento Epidemiológico dos Fenótipos e Doenças Complexas Existentes nas Comunidades Menonitas”) e 2.204.113 - CAAE 54385616.2.0000.0102 (projeto “Susceptibilidade à Doença Celíaca na População Menonita”).

Neste estudo transversal de prevalência, os dados foram obtidos no período de outubro de 2016 a dezembro de 2019. Em cada comunidade, as providências necessárias foram tomadas para que todos os membros da população acessível tivessem a mesma chance de participar da amostra. Para este fim, a divulgação do estudo foi realizada oralmente nas igrejas Menonita e Irmãos Menonitas (das três colônias) e nas reuniões de seniores, na forma de palestras (nas línguas vernácula e alemã). Também foram distribuídas cartas-convite pela Associação de Moradores e

redigido um artigo de divulgação em alemão, no jornal local menonita (Bibel & Pflug). As entrevistas foram realizadas em locais disponibilizados pelas Associações de Moradores e por líderes das comunidades. Também foram conduzidas nas próprias casas dos participantes, caso estes apresentassem disponibilidade de tempo fora do horário comercial, dificuldade de locomoção ou de acesso ao local das entrevistas. Além disso, o questionário foi disponibilizado *online* (Google Forms: <https://forms.gle/3ayneAgVuQ4Rnu51A>), para participantes com facilidade de acesso e familiaridade com os recursos da *Internet*. Utilizando *whatsapp*, foram montados grupos de *broadcast* de cada comunidade, para envio de avisos e resultados gerais relativos ao projeto.

Os critérios de inclusão foram: idade mínima de 12 anos e convivência em uma comunidade menonita. Caso nenhum dos pais apresentasse ascendência menonita (avaliada pelos registros genealógicos), os participantes recebiam os resultados das tipagens, porém eram excluídos das análises estatísticas subsequentes. Participaram deste estudo: 614 menonitas, sendo 252 de CON (Aceguá – RS), 163 de CWI (Palmeira – PR) e 199 de CWB (Curitiba - PR). Este tamanho amostral corresponde ao necessário para uma população estimada de 5.000 indivíduos (1.500 em cada colônia e 2.000 em Curitiba, segundo as Associações de Moradores), com um intervalo de confiança de 95% e precisão de +/- 3,7% (calculado com <http://sampsiz.sourceforge.net/>).

O questionário aplicado é uma versão modificada do questionário da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) de 2013 (apêndice F). Cada entrevista durou aproximadamente uma hora e incluiu perguntas sobre ascendência parental, local de nascimento dos avós e rota migratória, hábitos de vida (alimentação, prática de atividade física, exposição ambiental a mutágenos), idioma, ambiente familiar, diagnóstico médico de doenças crônicas (confirmado por laudos médicos) e agregação de doenças em familiares. As respostas relativas a agregação familiar de doenças foram comparadas dentro das mesmas famílias. Incoerências foram resolvidas, contatando novamente os participantes, normalmente por *whatsapp*. Registros genealógicos e informações fornecidas pelos participantes foram utilizadas para confirmar sua ascendência menonita. Quando possível, foram construídos heredogramas das famílias. Peso, altura, circunferência da cintura e quadril e pressão arterial foram mensurados de acordo com as orientações disponíveis em www.pns.icict.fiocruz.br e no Manual de Antropometria utilizado no PNS 2013. Dados

como porcentagem de gordura corporal, massa muscular, massa óssea, água corporal e calorias foram obtidos por uma balança de bioimpedância *Balmak Actlife*, modelo SLIMPRO-180. O Índice de Massa Corporal (IMC) foi calculado dividindo o peso (em kg) pela altura (em m) elevada ao quadrado.

5.1.2 Análise estatística

Prevalências foram calculadas, dividindo o número total de indivíduos afetados, pelo total da amostra. Dados qualitativos foram comparados entre si, por meio dos testes qui-quadrado e exato de Fisher. Dependendo da normalidade na distribuição dos dados quantitativos, foram feitas comparações entre os grupos com o teste ANOVA ou Kruskal-Wallis com o programa PRISM v.5.0 (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Quando apropriado, o *odds ratio* foi calculado, com um intervalo de confiança de 95%, por regressão logística binária, com o programa STATA v.9.2 (StataCorp LP, Lakeway Drive, Texas, EUA). Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Dados demográficos

A proporção entre homens e mulheres não diferiu entre as colônias. No entanto, mais da metade dos participantes (59,5%) foi do sexo feminino. A mediana de idade também não diferiu entre as colônias, sendo de 49,7 (13-92) anos entre as mulheres e de 50 (12-95) anos em homens. Os valores de IMC, contudo, foram muito mais altos nos indivíduos de CON, para ambos os sexos ($P < 1 \times 10^{-4}$ com mediana de 27,6 para mulheres e $P = 2 \times 10^{-4}$ com mediana de 28,5 para homens). O mesmo ocorreu para uma maior porcentagem de gordura corporal em mulheres ($P = 3 \times 10^{-4}$) (TABELA 4). Valores elevados de IMC foram associados a uma maior susceptibilidade a hipertensão arterial sistêmica (OR = 1,13 [IC95% = 1,07-1,19], $P < 1 \times 10^{-3}$), distúrbios da coluna vertebral (OR = 1,04 [IC95% = 1,01-1,09], $P = 0,022$) e distúrbios osteomusculares relacionados ao trabalho (DORT) (OR = 1,07 [IC95% = 1,02-1,12], $P = 0,002$). A pressão arterial média foi maior em CON para ambos os sexos ($P < 1 \times 10^{-4}$ em ambos os sexos).

Ao compararmos o grau de escolaridade, com exceção da frequência do ensino médio incompleto, em todas as outras comparações houve diferença significativa

entre as colônias. A frequência de indivíduos com apenas ensino fundamental incompleto ou completo foi maior entre os indivíduos de CON ($P = 8 \times 10^{-3}$ ou 3×10^{-3} , respectivamente). Já em CWB a frequência de indivíduos com ensino superior incompleto ou completo foi maior comparada as outras colônias ($P = 0,007$ ou 5×10^{-5}).

TABELA 4: DADOS DEMOGRÁFICOS DA POPULAÇÃO MENONITA

	CON	CWI	CWB	P	TOTAL
Sexo (F/M)	153/99	100/63	112/87	0,537	365/249
	Mediana (min-max)	Mediana (min-max)	Mediana (min-max)		Mediana (min-max)
Idade - F	54,3 (14-83)	48,2 (13-83)	44,7 (13-92)	0,067	49,7 (13-92)
Idade - M	51,1 (17-82)	56,5 (12-95)	49,4 (12-95)	0,574	50,8 (12-95)
IMC - F	27,6 (15-45)	24 (16-34)	23,46 (15-40)	< 1×10^{-4}	25,2 (15-45)
IMC - M	28,5 (19-40)	26,2 (16-47)	26,2 (16-38)	2×10^{-4}	26,7 (16-47)
% Gordura corporal - F	36,6 (13-64)	27,5 (13-49)	30,3 (11-59)	3×10^{-4}	30,5 (11-64)
% Gordura corporal - M	31,3 (12-62)	27,2 (8-49)	27,3 (8-49)	0,344	28,4 (8-62)
PAM - F	174,2 (136,7 – 286,7)	160,7 (120,3-219,0)	164,2 (114,3-260,0)	< 1×10^{-4}	167,5 (114,3-286,7)
PAM - M	191,7 (151,7-253,7)	171,7 (147,3-223,3)	173,3 (134,3-215,0)	< 1×10^{-4}	177,7 (134,3-253,7)
Grau de escolaridade	% (n/total N)	% (n/total N)	% (n/total N)		% (n/total N)
Ensino Fundamental incompleto	15,0 (29/193)	4,6 (6/130)	5,2 (8/153)	8×10^{-4}	9,0 (43/476)
Ensino Fundamental completo	16,1 (31/193)	3,8 (5/130)	6,5 (10/153)	3×10^{-4}	9,7 (46/476)
Ensino Médio incompleto	8,8 (17/193)	10,0 (13/130)	8,5(13/153)	0,900	9,0 (43/476)
Ensino Médio completo	27,5 (53/193)	30,8 (40/130)	13,1 (20/153)	6×10^{-4}	23,7 (113/476)
Ensino Superior incompleto	7,3 (14/193)	13,8 (18/130)	18,3 (28/153)	0,007	12,6 (60/476)
Ensino Superior completo	25,4 (49/193)	36,9 (48/130)	48,4 (74/153)	5×10^{-5}	35,9 (171/476)

FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: CON: Colônia Nova; CWI: Colônia Witmarsum; CWB: Curitiba; F: feminino; M: masculino; IMC: índice de massa corporal (Kg/m^2); min: mínimo; max: máximo, P: valor de P; PAM: pressão arterial média, é calculada pode ser calculada por meio da fórmula: $\text{PAM} = (\text{PA sistólica} + (2 \times \text{PA diastólica})/3$. Em negrito: significativa (valor de $P < 0,05$).

5.2.2 Ancestralidade menonita

Nesta análise, foram considerados os indivíduos com ancestrais maternos e/ ou paternos que passaram por uma das seguintes quatro rotas migratórias: (1) Rússia

- Alemanha - Brasil (RU - DE - BR); (2) Rússia - China - Alemanha - Brasil (RU - CN - BR); (3) Rússia - Alemanha - Paraguai - Brasil (RU - DE - PY); (4) Rússia - China - Alemanha - Paraguai - Brasil (RU - CN - PY). Houve um grupo com ancestrais menonitas que saíram da Polônia para o Paraguai, e depois para o Brasil, durante a Segunda Guerra Mundial (ou seja, nunca chegaram a emigrar da Polônia para a Rússia, como os demais). Este grupo contribuiu para o *pool* gênico dos participantes de CWI, porém foi desconsiderado para a análise subsequente. Indivíduos que tiveram avós nascidos no BR não foram contabilizados nas análises.

Aproximadamente 88% dos indivíduos analisados apresentaram todos os ancestrais menonitas (avós e bisavós), provenientes da Rússia. A maior parte dos casos de miscigenação ocorreu com descendentes de alemães que já habitavam o vale do Itajaí (municípios de Blumenau, Presidente Getúlio e Ibirama, SC), quando da chegada dos menonitas ao Brasil. A miscigenação foi reportada pelos próprios participantes e confirmada pela análise de sobrenomes (sobrenomes menonitas estão listados na GAMEO - Global Anabaptist Mennonite Encyclopedia, disponível em <https://gameo.org/>). A taxa média de miscigenação foi de 12%, sendo menor em CON (5,9%), comparada a CWI (16%) e CWB (17%) ($P = 4 \times 10^{-4}$).

As frequências de utilização das quatro rotas migratórias mais comuns diferiram entre as colônias (TABELA 5):

1. RU - DE - BR foi a rota mais frequente para ancestrais de todas as colônias, porém muito mais utilizada pelas avós maternas (76,1%, $P = 5 \times 10^{-4}$) e paternas (83,1%, $P = 3 \times 10^{-6}$) dos indivíduos de CON;
2. RU - CN - BR foi a rota utilizada por 5 a 10% de todos os ancestrais das colônias, porém esteve mais representada entre avós maternos de participantes de CON (18,1%, $P = 0,006$);
3. RU - DE - PY foi uma rota muito mais comum para ancestrais de CWI (em torno de 5%) e CWB (10%), do que CON (0-1%). De fato, foi muito mais frequente em avós maternas (11,2%, $P = 8 \times 10^{-4}$), avós e avós paternos (7,3% e 9,3%, $P = 0,018$ e $0,005$, respectivamente) de indivíduos de CWB.
4. RU - CN - PY não foi utilizada por nenhum ancestral dos participantes de CON. Esta rota foi igualmente compartilhada por 7-8% dos avós paternos de CWB e CWI ($P = 0,006$).

TABELA 5: ROTAS MIGRATÓRIAS DOS ASCENDENTES DOS MENONITAS

	CON	CWI	CWB	P	TOTAL
	% (n/total N)	% (n/total N)	% (n/total N)		% (n/total N)
Avó materna					
0. Nasceu no Brasil	12,7 (19/149)	21,8 (22/101)	19,2 (24/125)	0,144	16,8 (65/375)
1. RU -> DE -> BR	76,1 (108/149)	67,3 (68/101)	50,4 (63/125)	5x10⁻⁴	63,7 (239/375)
2. RU -> CN -> BR	13,4 (20/149)	5,9 (6/101)	12 (15/125)	0,159	10,9 (41/375)
3. RU -> DE -> PY	1,3 (2/149)	2,9 (3/101)	11,2 (14/125)	8x10⁻⁴	5,1 (19/375)
4. RU -> CN -> PY	0	1,9 (2/101)	7,2 (9/125)	0,117	2,9 (11/375)
Avô materno					
0. Nasceu no Brasil	9,0 (13/144)	17,7 (17/96)	23,9 (28/117)	1x10⁻⁵	16,2 (58/357)
1. RU -> DE -> BR	72,9 (105/144)	70,8 (68/96)	54,7 (64/117)	0,005	66,4 (237/357)
2. RU -> CN -> BR	18,1 (26/144)	4,2 (4/96)	11,9 (14/117)	0,006	12,3 (44/357)
3. RU -> DE -> PY	0	3,1 (3/96)	5,1 (6/117)	0,308	2,5 (9/357)
4. RU -> CN -> PY	0	4,2 (4/96)	4,3 (5/117)	0,408	2,5 (9/357)
Avó paterna					
0. Nasceu no Brasil	8,1 (11/136)	18,8 (22/117)	16,3 (20/123)	0,030	14,1 (53/376)
1. RU -> DE -> BR	83,1 (113/136)	59,8 (70/117)	56,1 (69/123)	3x10⁻⁶	67,0 (252/376)
2. RU -> CN -> BR	8,1 (11/136)	9,4 (11/117)	4,8 (16/123)	0,404	10,1 (38/376)
3. RU -> DE -> PY	0,7 (1/136)	4,3 (5/117)	7,3 (9/123)	0,018	3,9 (15/376)
4. RU -> CN -> PY	0	7,7 (9/117)	7,3 (9/123)	0,006	4,8 (18/376)
Avô paterno					
0. Nasceu no Brasil	5,1 (7/137)	14,5 (16/110)	16,3 (21/129)	0,001	11,7 (44/376)
1. RU -> DE -> BR	87,6 (120/137)	65,5 (72/110)	56,6 (73/129)	0	70,5 (265/376)
2. RU -> CN -> BR	6,6 (9/137)	8,2 (9/110)	10,1 (13/129)	0,583	8,2 (31/376)
3. RU -> DE -> PY	0,7 (1/137)	4,5 (5/110)	9,3 (12/129)	0,005	2,1 (18/376)
4. RU -> CN -> PY	0	7,3 (8/110)	7,8 (10/129)	0,005	2,1 (18/376)

FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: CON: Colônia Nova; CWI: Colônia Witmarsum; CWB: Curitiba; P: valor de P; n: número de indivíduos; NC: não calculado; RU: Rússia; DE: Alemanha; CN: China; PY: Paraguai; BR: Brasil. Em negrito: significativo (valor de P < 0,05).

NOTA: As abreviaturas das rotas incluem apenas os países de maior tempo de permanência. Todos os ancestrais, contudo, passaram um período em campos de refugiados na Alemanha, antes de chegar a América do Sul. As duas rotas que incluem o Paraguai, representam ancestrais que abandonaram as colônias menonitas paraguaias e se dirigiram ao Brasil, especialmente nos anos 40.

5.2.3 Hábitos alimentares

Os hábitos alimentares igualmente diferiram entre as comunidades. O consumo de peixe e enlatados foi inferior, e o de alimentos contendo glúten e o de pratos com grãos (referindo-se principalmente a feijão) foi maior em CON, do que em CWI e CWB (peixe P < 1x10⁻⁴, enlatados P = 0,02, glúten P = 0,001 e grãos P < 1x10⁻⁴,

respectivamente). CWI apresentou o dobro do consumo de leite, do que as demais comunidades ($P < 1 \times 10^{-4}$), enquanto CWB apresentou maior consumo de derivados de leite e de doces ($P = 0,002$ e $P = 0,005$, respectivamente) (TABELA 6).

TABELA 6:HÁBITOS ALIMENTARES DA POPULAÇÃO MENONITA

	CON	CWI	CWB	P	TOTAL
	Mediana (min-max)	Mediana (min-max)	Mediana (min-max)		Mediana (min-max)
Hábitos alimentares					
Peixe	0,02 (0-1)	0,07 (0-0,42)	0,07 (0-0,42)	< 1x10⁻⁴	0,03 (0-1)
Enlatados	0,07 (0-2)	0,14 (0-1)	0,14 (0-0,85)	0,020	0,14 (0-2)
Embutidos	0,29 (0-2)	0,29 (0-2)	0,29 (0-2)	0,582	0,29 (0-2)
Alimentos preparado na brasa	0,07 (0-0,42)	0,07 (0-0,28)	0,07 (0-1)	0,413	0,07 (0-1)
Leite	1,00 (0-5)	2,00 (0-5)	1,00 (0-2)	< 1x10⁻⁴	1,00 (0-6)
Derivados de leite	1,00 (0-2)	1,00 (0-3)	1,00 (0-5)	0,002	1,00 (0-5)
Glúten	2,00 (0,2-3)	2,00 (0-3)	2,00 (0-3)	0,001	2,00 (0-3)
Doces	0,57 (0-5)	0,57 (0-3)	1,00 (0-4)	0,005	1,00 (0-5)
Fruta	1,00 (0-3)	1,00 (0-5)	1,00 (0-4)	0,223	1,00 (0-5)
Verdura	1,00 (0-4)	1,00 (0-2)	1,00 (0-2)	0,076	1,00 (0-4)
Grãos	0,43 (0-2)	0,29 (0-1)	0,29 (0-3)	< 1x10⁻⁴	0,42 (0-3)
Fritura	0,14 (0-1)	0,14 (0-2)	0,10 (0-1)	0,081	0,14 (0-2)

FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: CON: Colônia Nova; CWI: Colônia Witmarsum; CWB: Curitiba; P: valor de P; n: número de indivíduos. Em negrito: significante (valor de $P < 0,05$).

NOTA: a frequência auto-reportada de consumo de alimento foi calculada com base no número de vezes, que o indivíduo consome determinado alimento, por dia).

5.2.4 Exposição ambiental a mutágenos

Dentre todos os mutágenos avaliados, a exposição a metais pesados foi a de menor impacto entre os indivíduos (2,6%). A frequência de indivíduos expostos a poeiras, radiações e produtos químicos foi significativamente menor em CWB ($P < 1 \times 10^{-4}$, $P < 1 \times 10^{-4}$ e $P 4 \times 10^{-6}$, respectivamente). De todos os produtos químicos avaliados, os mais comuns entre os indivíduos de CON e CWI foram inseticidas e pesticidas, representando 64,5% (91/141) (TABELA 7).

A exposição a fumaça foi associada a um risco elevado de desenvolver câncer em geral (OR = 2,71 [95%IC = 1,55-4,73], $P < 10^{-3}$), assim como doenças respiratórias (OR = 1,86 [95%IC = 1,06-3,26], $P=0.028$). Apenas 12,6% do total de entrevistados foram expostos a fumaça do tabaco, sendo que consideramos como expostos: fumantes ativos (5), ex-fumantes (51) e fumantes passivos (3). Indivíduos com maior exposição a radiações apresentaram um risco elevado de desenvolver câncer em

geral (OR = 1,94 [95%IC = 1,13-3,33], P = 0,016), em específico, o câncer de pele não-melanoma (OR = 3,17 [95%IC = 1,14-9,03], P = 0,030).

TABELA 7: EXPOSIÇÃO AMBIENTAL DA POPULAÇÃO MENONITAS A MUTÁGENOS

	CON	CWI	CWB	P	TOTAL
	% (n/total N)	% (n/total N)	% (n/total N)		% (n/total N)
Fumaça	24,2 (46/190)	25,9 (34/131)	19,2 (28/146)	0,406	32,1 (108/467)
Poeira	65,4 (123/188)	65,4 (85/130)	20,6 (30/146)	< 1x10⁻⁴	51,3 (238/464)
Radiação	64,0 (121/189)	53,1 (69/130)	19,7 (28/142)	< 1x10⁻⁴	47,3 (218/461)
Produtos químicos	45,5 (86/189)	46,9 (61/130)	21,9 (32/146)	4x10⁻⁶	38,5 (179/465)
Metais pesado	2,1 (4/189)	2,3 (3/130)	3,5 (5/145)	0,758	2,6 (12/464)

FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: CON: Colônia Nova; CWI: Colônia Witmarsum; CWB: Curitiba; P: valor de P; n: número de indivíduo. Em negrito: significativo (valor de P < 0,05).

NOTA: O grupo exposto à fumaça inclui a exposição à fumaça de tabaco, fumos metálicos e fumaça de queimadas. A exposição a poeira inclui a exposição a poeira de obras, vidro, rua, carpete e madeira. O grupo exposto à radiação inclui a exposição a radiação solar e raio X, radioterapia e raio UV. O grupo exposto a produtos químicos inclui a exposição a tintas, resinas, corantes e pigmentos, solventes, combustíveis e lubrificantes, inseticidas, pesticidas, preservantes, ácidos e cáusticos fortes. O grupo de exposição a metais pesados inclui a exposição a cromo, cádmio, níquel, mercúrio e chumbo.

5.2.5 Doenças e agregação familiar

Aproximadamente 58% dos indivíduos declararam terem tido pelo menos uma doença infecciosa, sendo as mais comuns, varicela, caxumba e sarampo (44,9%, 31,3% e 30,2%, respectivamente).

A hipertensão arterial sistêmica, assim como ter um parente afetado pela mesma, foi mais comum entre os indivíduos de CON (P = 0,001). Estes participantes também apresentaram valores elevados de IMC, associados a um maior risco de desenvolver hipertensão arterial sistêmica, como demonstrado anteriormente.

Os distúrbios da coluna vertebral e DORT, foram mais comuns em CON e CWI (P=0,004 e 0,002, respectivamente). A ocorrência de artrite ou reumatismo, também foi maior em CON (P=0,046).

Aproximadamente 25% dos participantes tem ou já tiveram diagnóstico de depressão, a qual foi associada a uma pior autopercepção de saúde (OR = 1,72 [95%IC = 1,01-2,93], P=0,046) (BOLDT *et al.*, manuscrito submetido). Dentre as doenças gastrointestinais investigadas (DC, IL e síndrome do intestino irritável), a IL

ou apresentar parentes afetados com IL foram mais reportados em CWB (2×10^{-5} ou 6×10^{-6} , respectivamente).

Em relação aos casos de câncer, 14,3% dos indivíduos reportaram o diagnóstico de pelo menos um tipo. O câncer de pele não melanoma foi o mais frequente (49,3%, 33 de 67), seguido do câncer de mama em mulheres (33,3%, 11 de 33). Dos indivíduos com história pessoal de câncer de pele, 94% (31/33) afirmaram permanecer em local com exposição à radiação solar por mais de 30 minutos diários e 46% sempre fazem uso do filtro solar. Como mostrado anteriormente, a exposição a radiação está associada a um maior risco de desenvolvimento de câncer de pele (OR = 3,17 [95%IC = 1,14-9,03], P = 0,030). Em algumas famílias, foi observada a ocorrência de vários indivíduos com diagnóstico de diferentes tipos de câncer (FIGURA 10) (TABELA 8).

TABELA 8: PREVALÊNCIA DE DOENÇAS COMPLEXAS E AGREGAÇÃO FAMILIAR EM COMUNIDADE MENONITAS

	CON	CWI	CWB	P	TOTAL
	% (n/total N)	% (n/total N)	% (n/total N)		% (n/total N)
Doença infecciosa	60,5 (112/185)	48,8 (62/127)	63,6 (91/143)	0,002	58,2 (265/455)
Hipertensão Arterial Sistêmica	33,9 (62/183)	20,8 (27/130)	17,7 (26/147)	0,001	25,0 (115/460)
Familiar	91,1 (216/237)	77,5 (100/129)	83,9 (125/149)	0,001	85,6 (441/515)
Hipercolesterolemia	24,0 (43/179)	26,6 (33/124)	25,5 (32/136)	0,823	24,6 (108/439)
Familiar	94,3 (50/53)	61,1 (22/36)	83,9 (78/93)	2×10^{-4}	82,4 (150/182)
Cardiopatias	13,0 (21/161)	15,8 (20/127)	13,8 (20/145)	0,802	14,1 (61/433)
Familiar	87,5 (189/216)	77,1 (91/118)	75,5 (111/147)	0,006	81,3 (391/481)
Diabete	7,5 (13/174)	5,8 (7/121)	4,9 (7/143)	0,625	6,2 (27/438)
Familiar	76,1 (176/230)	69,4 (77/111)	55,1 (81/147)	1×10^{-4}	68,4 (334/488)
Acidente Vascular Cerebral	1,7 (3/179)	0 (0/129)	2,0 (3/148)	0,333	1,3 (6/456)
Familiar	30,9 (56/181)	36,2 (47/130)	46,6 (69/148)	0,013	37,5 (172/459)
Depressão	26,6 (47/177)	24,6 (31/126)	21,8 (21/142)	0,032	24,5 (109/445)
Familiar	54,2 (96/177)	48,1 (50/104)	55,6 (80/144)	0,568	53,2 (226/425)
Doenças Respiratórias Crônicas	12,5 (23/184)	19,2 (25/130)	15,2 (23/151)	0,263	15,3 (71/465)
Familiar	43,4 (79/182)	60,5 (69/114)	33,8 (51/151)	7×10^{-5}	44,5 (199/447)
Distúrbios da coluna vertebral	48,3 (87/180)	43,9 (57/130)	27,6 (40/145)	0,004	40,4 (184/455)
Familiar	62,8 (113/180)	63,2 (72/114)	52,0 (78/150)	0,085	59,3 (263/444)
DORT	32,4 (58/179)	25,2 (32/127)	15,2 (22/145)	0,002	24,8 (112/451)
Familiar	30,5 (54/177)	28,4 (29/102)	22,6 (33/146)	0,271	27,3 (116/425)
Artrite ou Reumatismo	12,3 (22/179)	4,7 (6/127)	6,9 (10/145)	0,046	8,4 (38/451)
Familiar	46,1 (82/178)	44,2 (42/95)	45,5 (66/165)	0,955	43,4 (190/438)

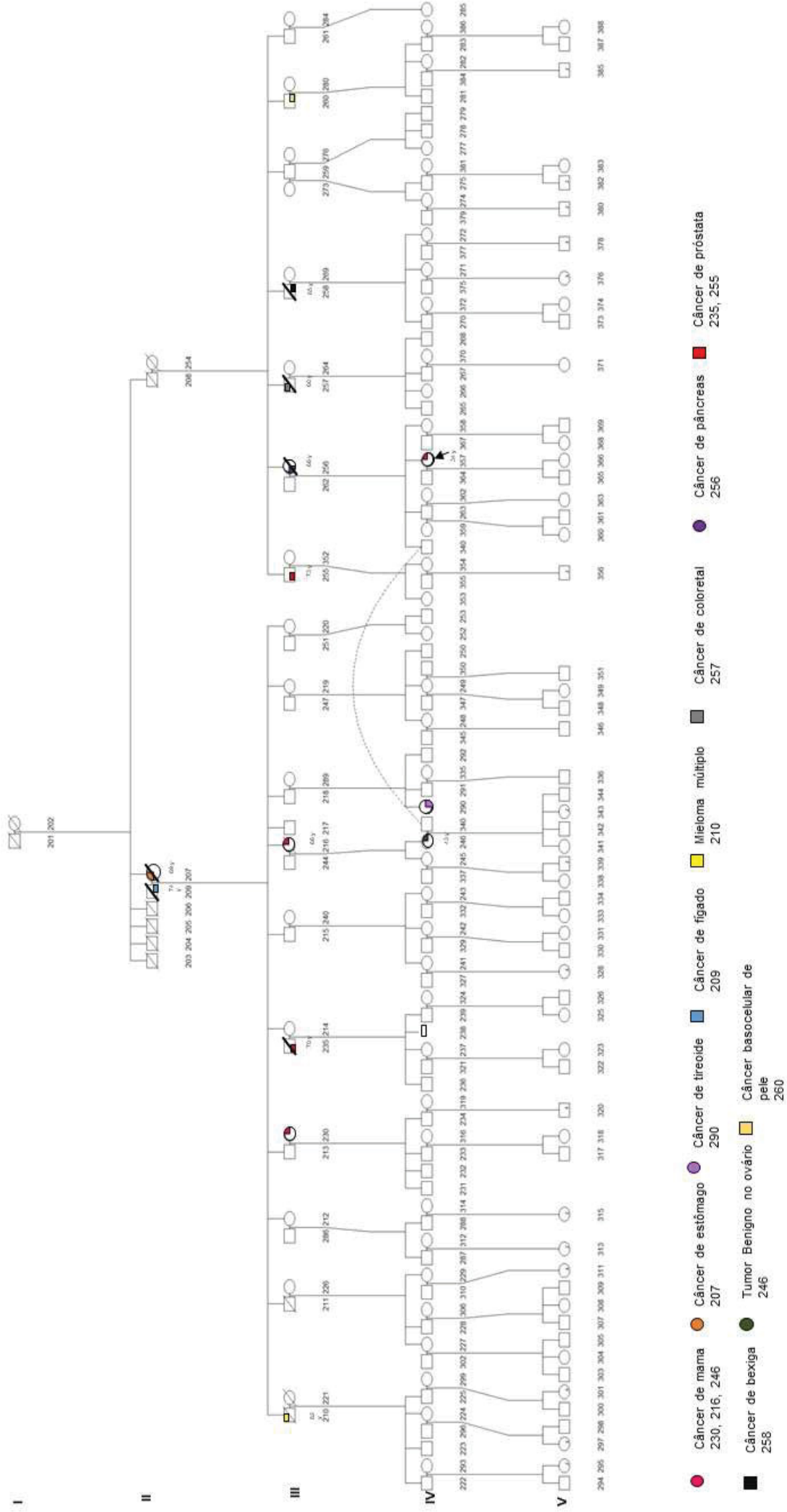
	CON	CWI	CWB	P	TOTAL
	% (n/total N)	% (n/total N)	% (n/total N)		% (n/total N)
Insuficiência Renal Crônica	2,7 (5/183)	1,5 (2/130)	0,7 (1/147)	NC	1,7 (8/460)
Familiar	15,1 (30/176)	16,5 (17/103)	9,2 (13/142)	0,101	14,3 (60/421)
Câncer	12,6 (24/190)	17,1 (22/129)	14,1 (21/149)	0,540	14,3 (67/468)
Familiar	60,7 (153/252)	71,2 (116/163)	60,3 (120/199)	0,053	63,4 (389/614)
Disfunções da tireoide	10,2 (19/187)	12,6 (16/127)	14,4 (20/139)	0,504	12,1 (55/453)
Familiar	30,0 (57/190)	28,3 (32/113)	28,0 (33/118)	0,913	29,0 (122/421)
Doença Celíaca*	3,0 (6/198)	3,9 (6/153)	4,1 (7/170)	0,839	3,6 (19/521)
Familiar	6,0 (11/185)	15,9 (13/82)	11,9 (10/84)	0,030	9,7 (34/351)
Intolerância a Lactose	1,1 (2/181)	1,7 (2/120)	11,5 (14/122)	2x10⁻⁵	4,3 (18/423)
Familiar	13,9 (27/194)	32,9 (24/73)	38,0 (35/92)	6x10⁻⁶	24,0 (86/359)
Síndrome do Intestino Irritável	5,1 (9/178)	5,0 (6/119)	5,9 (7/119)	0,941	5,3 (22/416)
Familiar	6,9 (13/188)	12,7 (8/63)	15,4 (12/78)	0,080	10,0 (33/329)

FONTE: O autor (2020).

LEGENDA: CON: Colônia Nova; CWI: Colônia Witmarsum; CWB: Curitiba; P: valor de P; n: número de indivíduos; NC: não calculado; DORT: Distúrbios Osteomusculares Relacionados ao Trabalho. Em negrito: significativo (valor de P < 0,05). * incluindo os indivíduos assintomáticos, identificados pela triagem sorológica (vide capítulo II)

NOTA: Foram consideradas como doenças infecciosas: hepatite B e C, tuberculose, malária, hanseníase, HIV, dengue, zica, chicungunha, caxumba, sarampo, varicela, rubéola; como cardiopatias, o infarto agudo do miocárdio, angina, insuficiência cardíaca, entre outras; como doenças respiratórias crônicas: asma, bronquite, rinite; como distúrbios da coluna vertebral: hérnia de disco, escoliose, lombalgia, bico de papagaio, lordose; como disfunções da tireoide: hipotireoidismo e hipertireoidismo.

FIGURA 10: HEREDOGRAMA DE UMA FAMÍLIA MENONITA COM MÚLTIPLOS CASOS DE CÂNCER



5.3 DISCUSSÃO

A persistente e intensa colaboração das populações anabatistas norte-americanas com as pesquisas de Genética Humana lançou os fundamentos da Genética Clínica nos anos 60, continuando a lançar luz sobre a etiologia genética das doenças complexas, como se vê atualmente na enciclopédia *online Mendelian Inheritance of Man* (MCKUSICK, 2007). Apesar disso, a população anabatista latino-americana, que engloba mais de 100 mil indivíduos, grande parte vivendo isolada em colônias, permanece praticamente desconhecida. Neste sentido, este trabalho foi pioneiro ao lançar as bases para a compreensão da epidemiologia de doenças complexas na população menonita sul-brasileira.

5.3.1 Diferenças entre as comunidades

Dentre os achados epidemiológicos, não haviam sido antecipadas diferenças biométricas, de hábitos alimentares, rotas migratórias e propensão a doenças, entre as comunidades. Estes resultados foram, de fato, surpreendentes, uma vez que não se esperavam grandes diferenças genéticas e ambientais entre as comunidades estudadas, especialmente as localizadas em região rural. Contudo, o perfil biométrico dos habitantes da Colônia Witmarsum foi bastante similar ao de menonitas da cidade de Curitiba, sendo este em geral mais associado a bons parâmetros de manutenção da saúde, do que o de moradores de Colônia Nova. Estes últimos apresentaram menores índices de escolaridade e maiores de obesidade, hipertensão arterial (tanto dos próprios participantes, quanto reportada em familiares), familiares com cardiopatia, familiares com diabete (tipo 2), diagnóstico de depressão e artrite. Também reportaram mais problemas de coluna e distúrbios osteomusculares relacionados ao trabalho, porém em frequências similares aos participantes de CWI. Comparativamente, os participantes de CWB relataram familiares afetados por AVC com mais frequência que as demais comunidades, sendo que doenças respiratórias crônicas foram mais comuns em CWI.

É interessante destacar que alguns hábitos alimentares diferiram entre as três comunidades. O consumo de carboidratos na forma de grãos e de farinhas com glúten foi muito superior em CON, o que pode justificar em parte, o IMC mais elevado. Já o consumo de leite foi maior em CWI, fato que pode estar diretamente relacionado à maior atividade leiteira desta colônia, em relação às demais (CON, embora igualmente

rural, tem economia baseada no plantio). Já o maior consumo de doces e laticínios em CWB pode ser justificado pela facilidade de acesso de alimentos mais industrializados, na zona urbana, assim como o consumo de peixe.

A associação entre o IMC elevado e a propensão a várias destas doenças está em conformidade com dados epidemiológicos da literatura. O IMC alto é, de fato, um fator de risco para hipertensão e eventos cardiovasculares (BOMBELLI *et al.*, 2011; COLANGELO *et al.*, 2015; MIRZAEI *et al.*, 2017; SHIHAB *et al.*, 2012). Entre os obesos (IMC>30), a hipertensão arterial sistêmica e eventos cardiovasculares são, respectivamente, 4,17 e 1,46 vezes mais comuns do que em indivíduos de peso normal (SHIHAB *et al.*, 2012). Em um estudo realizado com participantes de 20 países europeus, verificou-se que 53,1% da população europeia estava acima do peso (IMC>25) (44,4% homens e 30,5% mulheres), sendo 15,9%, obesa (IMC>30) (15,9% para homens e mulheres). Assim como em CON, pessoas das áreas rurais apresentaram maior sobrepeso (39,1 vs. 36,1%) e obesidade (17,0 vs. 15,3%), do que aquelas que viviam nas áreas urbanas (MARQUES *et al.*, 2018). Sobrepeso e obesidade também estão relacionados a dores crônicas, entre elas dor na região lombar da coluna vertebral (CHIN *et al.*, 2019). Esta é outra queixa que se repetiu frequentemente em CON, embora também, em CWI. Em uma meta análise realizada por Zhang *et al.*, (2016), observou-se que o IMC elevado está associado a um aumento da incidência de dor lombar em ambos os sexos e em indivíduos com sobrepeso e obesidade.

Em nosso estudo, o menor grau de miscigenação foi observado em CON. Isto é esperado, uma vez que CON está localizada no extremo sul do RS e em uma região rural, podendo ser considerada a comunidade mais isolada geograficamente, dentre as três estudadas. Esse isolamento geográfico, somado ao fato de que esta colônia foi a primeira a oficialmente se separar do grupo original (o qual prosseguiu mantendo maior contato com os descendentes de alemães já residentes no Vale do Itajaí), explica a sua menor taxa de miscigenação, o que também pode ter implicado em um maior grau de consanguinidade e, possivelmente, maior susceptibilidade a doenças crônicas, como reportado para outras comunidades menonitas isoladas (ORTON *et al.*, 2008).

CON também apresentou maior contribuição de avós que conseguiram emigrar diretamente da Rússia, para os campos de refugiados da Alemanha, e destes, para o Brasil, e de avós maternos que migraram pela rota RU - CN - BR. Já CWB e CWI

apresentam um enriquecimento em ancestrais que emigraram inicialmente para o Paraguai, e deste país, para o Brasil. Embora seja difícil definir o grau de dificuldade dessas rotas, sabe-se que todas incluíram períodos de fome, intenso stress psicológico e exposição a doenças como a tuberculose e o tifo, segundo relatos dos próprios participantes do estudo. Muitos dos ancestrais que saíram diretamente da Rússia para a Alemanha, cruzando legalmente a fronteira com o trem, vivenciaram diretamente os horrores da guerra civil, desapropriação, fome e anarquia pré-revolução bolchevique, nas colônias das estepes da Ucrânia (informações fornecidas pelos próprios participantes seniores). A intensidade destes fatores pode ocasionar modificações transgeracionais epigenéticas persistentes que aumentam a propensão a doenças crônicas como a diabetes do tipo 2, obesidade e síndrome metabólica (HEIJMANS *et al.*, 2008; ZIMMET *et al.*, 2018).

Ao avaliarmos a exposição dos indivíduos a agentes externos, verificamos que participantes de CON e CWI relatam uma maior exposição a poeiras, radiações e produtos químicos. Assim como CON, CWI também está localizada em uma região rural. Aproximadamente 28% dos indivíduos de CON e CWI trabalham ou já trabalharam com atividades relacionadas a agropecuária. Tais semelhanças explicam essa maior exposição, comparado a CWB, que nesta amostra, foi associado a uma maior predisposição ao câncer (no caso da fumaça, também a doenças respiratórias). A exposição a estes agentes externos e sua associação com o desenvolvimento de neoplasias é confirmada por outros estudos genético-epidemiológicos e funcionais. Alterações de metilação do DNA ocorrem em genes supressores tumorais e oncogenes expostos ao arsênio, benzeno, cromo e fumaça de cigarro, enquanto que o benzopireno, cádmio, carvão e pó de madeira modulam proteínas específicas de choque térmico e metaloproteases. A análise múltipla desses biomarcadores fornece informações sobre os mecanismos cancerígenos ativados pela exposição a estes agentes ambientais (CECCAROLI *et al.*, 2015).

5.3.2 Diferenças entre os menonitas e outras populações

O questionário da PNS 2013 incluiu perguntas sobre o padrão de dieta e de atividade física, consumo de tabaco e álcool, e sobre doenças crônicas, em especial hipertensão, diabetes, doenças cardiovasculares, respiratórias e mentais, depressão, insuficiência renal e câncer. Dados antropométricos e de pressão sanguínea também foram coletados (MALTA; SZWARCOWALD, 2015a). A PNS 2013, contudo, não

diferenciou populações geneticamente isoladas, pertencentes a diferentes grupos étnicos, residentes no Brasil, tampouco avaliou a predisposição genética da população brasileira às doenças pesquisadas. Neste trabalho, esta lacuna começou a ser preenchida para a população anabatista menonita, gerando informações que serão valiosas para o desenho de estratégias de saúde pública e que fundamentam trabalhos de associação genética a doenças e características complexas.

De um total de pouco mais de 60.000 indivíduos entrevistados na PNS 2013, 47,1% referiram o diagnóstico de pelo menos uma doença crônica (não transmissível); e apenas 9,3% disseram ter “estilo de vida saudável” (não usar produtos de tabaco, consumir frutas e hortaliças e praticar atividade física no lazer). Observou-se que hipertensos e diabéticos tendem a evitar comportamentos nocivos à saúde (como consumir sal e doces), mas apresentam dificuldade em adotar práticas que lhes beneficiariam (como se exercitar, comer hortaliças, etc.) (SZWARCOWALD et al., 2015). Já entre os que tiveram câncer, observou-se maior consumo de frutas e hortaliças e maior proporção de ex-fumantes. Contudo, estes também apresentaram maior uso de álcool (SILVA et al., 2016). Por meio destes dados, é possível observar que a adoção dos comportamentos saudáveis no Brasil ainda é bastante incipiente (SZWARCOWALD et al., 2015), embora o consumo do tabaco no país tenha declinado de 18,5% em 2008 a 14,7% em 2013, representando um dos mais baixos do mundo (MALTA et al., 2015a e <https://bit.ly/2yBNS3P>). Já a população menonita apresentou baixo uso ativo do tabaco (1,1%) e do álcool (raramente relata tomar mais de uma dose em uma única vez, ou ultrapassa 5 dias de consumo de uma única dose, por mês). A maioria come hortaliças e frutas, todos os dias. Contudo, houve relatos frequentes de aplicação de pesticidas sem qualquer equipamento de proteção, razão pela qual os ensaios do micronúcleo e do cometa serão utilizados para avaliar danos no DNA, em projetos futuros. O uso de protetores solares também será objeto de futuras campanhas de conscientização, principalmente dada a elevada frequência de câncer de pele não melanoma, nesta população (vide abaixo).

A hipertensão arterial foi referida por 21,4% dos brasileiros, principalmente em mulheres de baixa escolaridade (MALTA et al., 2015b) assim como a angina pectoris, que ocorreu em 9,1% das mulheres comparado a 5,9% dos homens (LOTUFO et al., 2015). A prevalência da HAS entre menonitas (25%) não chegou a ser superior a observada no Brasil, porém cardiopatias variadas foram reportadas por 14,1% dos

entrevistados, sendo o objeto de investigações mais aprofundadas, em trabalhos futuros.

De fato, as doenças mais prevalentes no Brasil foram hipertensão arterial (21,4%), problema crônico de coluna (18,5%), depressão (7,6%), artrite (6,4%) e *diabetes mellitus* (6,2%), sendo sempre mais frequentes entre as mulheres (MALTA *et al.*, 2015c). Na população menonita, contudo, a frequência de problemas de coluna e de diagnóstico passado ou presente de depressão atingiram prevalências impressionantes de 40,4 e 24,5%, muito superiores à brasileira. Já a prevalência de artrite foi um pouco superior apenas, de 8,4%, e a de diabete não diferiu da frequência brasileira (6,2%).

Asma foi reportada por 4,4% dos entrevistados na PNS 2013, dos quais 15% afirmaram que a doença limitava seriamente suas atividades diárias (MENEZES *et al.*, 2015). Entre os menonitas, 15,3% responderam sofrer/ ter sofrido com doenças respiratórias, mencionando especialmente a asma brônquica na infância. A análise mais aprofundada deste grupo de doenças será objeto de futuras investigações, e é especialmente interessante em vista da possibilidade de comparações com os resultados obtidos recentemente com a susceptibilidade à asma, em indivíduos dos grupos Amish e Huterita (OBER *et al.*, 2017).

Na PNS 2013, a maior limitação em atividades habituais foi relatada por participantes com diagnóstico de acidente vascular cerebral (AVC) (38,6%) (THEME FILHA *et al.*, 2015). Altas taxas de prevalência de AVC foram observadas principalmente em indivíduos mais idosos, sem educação formal, em centros urbanos (BENSENOR *et al.*, 2015). De fato, participantes de CWB reportaram com mais frequência, indivíduos afetados na família, do que indivíduos de CWI e de CON.

Em nosso estudo, 14,3% dos indivíduos reportaram o diagnóstico de pelo menos um tipo de câncer. O tipo mais comum foi o câncer de pele não melanoma (49,3%), seguido do câncer de mama em mulheres (33,3%). Segundo o INCA, 324.580 novos casos de câncer foram estimados para os anos de 2018 e 2019 e, desses, 85.170 (26,2%) de câncer de pele não melanoma e 59.700 (29,5%) de câncer de mama em mulheres. Na população alemã, a incidência do câncer de pele não melanoma em 2012 foi estimada em 250 casos para 100 mil pessoas (LEITER *et al.*, 2017), já para o câncer de mama foi de 120 casos para 100 mil (INSITUT RK, 2013). A exposição a radiação solar é bem estabelecida como um importante fator de risco para o desenvolvimento de câncer de pele não melanoma (KRICKER; ARMSTRONG;

ENGLISH, 1994). Em nosso trabalho, também verificamos que essa exposição está associada a um aumento de três vezes na propensão a este tipo de câncer. Frequentemente, este ocorre junto a outros tipos de câncer, numa mesma família menonita. Estudos de susceptibilidade genética estão sendo realizados pelo nosso grupo, para a identificação dos principais fatores de susceptibilidade genéticos e ambientais ao câncer, na população menonita.

A prevalência de doenças como disfunções da tireoide e DC (12,1 e 3,6%, respectivamente) foram superiores em menonitas, quando comparadas às observadas em outras populações europeias. Em países com quantidade de iodo suficiente, a prevalência de hipertireoidismo varia de 0,2 a 1,3%; na Alemanha, a prevalência é de 0,7% (MADARIAGA *et al.*, 2014; VÖLZKE *et al.*, 2003). Por sua vez, a prevalência do hipotireoidismo em países europeus varia de 0,2% a 5,3%; e no Brasil, de 1,6% (ÅSVOLD; VATTEN; BJØRO, 2013; MCGROGAN *et al.*, 2008; VÖLZKE *et al.*, 2003). Na DC, a prevalência varia de acordo com o método diagnóstico, sendo a soroprevalência global de 1,4%, com a maior soroprevalência relatada até o momento (5,6%) no povo Saharai isolado do Saara Ocidental (CATASSI *et al.*, 2001). Já a prevalência global confirmada por biópsia é de 0,7%, com a maior prevalência observada na Suécia, de 2,58% (MYLÉUS *et al.*, 2009; VILPPULA *et al.*, 2008). Embora a prevalência de artrite em menonitas tenha atingido a marca de 8%, o refinamento do diagnóstico ainda permitirá definir se se trata realmente da forma autoimune ou de outras formas inflamatórias de artrite ou artrose.

Todos os achados de prevalência superiores às observadas globalmente reforçam a importância epidemiológica desse estudo para as políticas públicas de saúde. Estudos de identificação de variantes genéticas, epigenéticas e ambientais associadas são necessários e devem ajudar a definir o risco dessa população para o desenvolvimento de doenças e estabelecer as bases de futuras estratégias de medicina preventiva.

6 Capítulo II

High Celiac Disease Prevalence and a HLA**DQ8* Founder Effect In Mennonites From South Brazil¹

Luana Caroline Oliveira¹, Amanda Coelho Dornelles¹, Renato Mitsunori Nisihara², Priscila Iansen dos Santos¹, Gabriel Adelman Cipolla¹, Stefanie Epp Boschmann², Iara José de Messias-Reason², Francinete Ramos Campos³, Maria Luiza Petzl-Erler¹, Angelica Beate Winter Boldt¹.

¹ Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil. ² Laboratory of Molecular Immunopathology, Department of Clinical Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil. ³ Laboratory of Bioscience and Mass Spectrometry, Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

6.1 ABSTRACT

Celiac disease (CD) is an often-underdiagnosed autoimmune enteropathy, despite its high morbidity. Using a modified version of the questionnaire of the 2013 National Health Survey, we interviewed 595 Mennonites of Frisian/Flemish origin, isolated since 25 generations. They were also screened for IgA autoantibodies in serum, and 391, for HLA-DQ2.5/DQ8 subtypes. CD seroprevalence was 1:30 (3.36%, 95%CI=2.15-4.57%) and biopsy-confirmed CD, 1:55 (1.85%, 95%CI=0.64-3.06%), much superior than the highest global prevalence (1:100). Half (10/20) of the patients unsuspected the disease. HLA-DQ2.5/DQ8 increased CD susceptibility (OR=12.13 [95%CI=1.56-94.20], P=0.003). HLA-DQ2.5 carrier frequency was higher in Mennonites, than in Brazilians (P=7x10⁻⁶). HLA-DQ8 but not HLA-DQ2.5 carrier frequency differed among settlements (P=0.007) and was higher than in Belgians, a Mennonite ancestral population (P=1.8.x10⁻⁶), and also higher than in Euro-Brazilians (P=6.5x10⁻⁶). This favors a founder effect to explain the high CD prevalence in Mennonites and highlights the epidemiological relevance of this study for public health policies.

¹ Este artigo foi adaptado para compor a tese de doutorado. Ele será submetido para publicação na revista científica **eLIFE**.

6.2 INTRODUCTION

Celiac Disease (CD) is a chronic, immune-mediated enteropathy of the small intestine, caused by exposure to dietary gluten (insoluble gliadin polypeptides found in wheat, rye, barley, and other closely-related grains) in genetically predisposed individuals (1). CD has a strong genetic association with human leukocyte antigens (HLA) HLA-DQ2.5 (haplotype *DQA1*05-DQB1*02*) and/or HLA-DQ8 (haplotype *DQA1*03-DQB1*03:02*) (2), estimated to account for up to 40% of the genetic load. However, only a fraction of HLA-DQ2.5-positive and/or HLA-DQ8-positive individuals consuming gluten, develop the disorder.

Clinical presentation varies from typical gastrointestinal symptoms like diarrhea, steatorrhea, weight loss, bloating, flatulence, abdominal pain to extraintestinal manifestations as abnormal liver function tests, iron deficiency anemia, bone disease, and skin disorders. Affected individuals may also remain asymptomatic for a long time, despite the growing loss of their intestinal villi (3). They are often detected through serologic testing of CD-specific auto-antibodies and definitely diagnosed with a duodenal mucosal biopsy (4). Nevertheless, clinical heterogeneity complicates the diagnostic work-up, delaying the diagnosis or allowing the disease to remain unrecognized, causing CD to be highly underdiagnosed. Gluten-free diet (GFD) is the main form of treatment. Affected individuals who are non-compliant with GFD and/or with a late diagnosis evolve to osteoporosis, sterility, neurological and psychiatric disorders, small bowel adenocarcinoma, lymphoma, and carcinoma of the esophagus (5,6). CD prevalence is higher in females, individuals with certain disorders (type 1 diabetes mellitus, autoimmune thyroiditis, Down syndrome, for example) and first-degree affected relatives of CD patients (reviewed by 8). Global CD seroprevalence is 1.4% (95% CI = 1.1–1.7%), with the highest seroprevalence reported to date (5.6%) in the isolated Saharawi people of Western Sahara (8). On the other hand, the global prevalence of biopsy-confirmed CD is 0.7% (95% CI = 0.5–0.9%), with the highest prevalence in Europe (0.8%) and Oceania (0.8%), and the lowest prevalence in South America (0.4%), being 0.24% (1:417) in Curitiba, the capital city of Paraná state in Brazil (9,10). This city also harbored three former Mennonite settlements.

Mennonite is the name given to people belonging to a pacifist religious group that emerged in the 16th century, during the Anabaptist Movement in Europe. They

passed through at least three recent bottlenecks, living in isolated communities for more than 20 generations. In South America, the Mennonites founded numerous colonies. In Brazil, approximately 1.200 Mennonites (200 families) arrived in the state of Santa Catarina in 1930. From there, several families readily moved to Curitiba (CWB/PR). Other 86 families moved to Rio Grande do Sul state in 1949 and founded Nova Colony (CN/Aceguá-RS). In 1951, 74 families, totalizing 455 people, settled in Witmarsum Colony (CW/Palmeira-PR) (11). Although marriages were random within the Mennonite colonies, approximately five centuries of isolation favored consanguinity among the families (12). Inbreeding contributes to the increase in homozygosity above the level predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium and to the expression of specific recessive phenotypes, due to allele sharing within families (13–15). Isolated populations, such as the Mennonites, show little genetic and environmental variability, offering an excellent model for studies with complex diseases. Jaworski *et al.* (16) suggested that this group is especially suitable for genetic and epidemiological studies. It is well defined, with extensive disease aggregation and accurate genealogical records, limitations to move to other places (for having large families), and numerous cases of consanguinity and homozygote descendants, reinforced by the bottlenecks and founder effects observed in their demographic history. Beside genetic isolation, daily consumption of gluten further justifies a tracking study of celiac disease in this population. Since the prevalence of CD in first-degree relatives (FDRs) of celiac patients increases between 2-21%, depending on sex and *HLA-DQ* genotype (17), this screening will allow the identification of predisposed relatives, who may benefit from early dietary intervention.

6.3 MATERIAL AND METHODS

6.3.1 Ethics

The Ethics Committee of the Health Sciences Sector of the Federal University of Paraná (CEP SCS-UFPR) approved this study (protocols 2.247.952 – CAAE 55297916.6.0000.0102 and 2.204.113 - CAAE 54385616.2.0000.0102). Informed consent was obtained from all participants.

6.3.2 Patient and public involvement

Representatives of the Mennonite population, concerned with the apparent high frequency of gastrointestinal symptoms and cancer in the communities, personally directed a request for the identification of underlying causes and prevention of chronic diseases, to the current coordinator of the project (ABWB). This prompted us to start a survey of lactose intolerance (conducted by SEB and supervised by IJMR), which was followed by the current epidemiological survey of celiac disease (conducted by LCO and supervised by ABWB). We previously discussed the strategy of contact, personal interviews, timing and location of recruitment with leaders of all communities. We invited the population to participate through letters and e-mails distributed by the residents' associations and through short oral communications, given during the service in the local churches. In addition, we wrote an informative article in the local Mennonite newspaper (Bibel & Pflug, in German). Mennonite health workers (physicians, nutritionists, nurses, pharmacists, psychologists), educators and preachers were engaged in the project from the very beginning, both to motivate participation in the study and to support the deliverance of general results (regarding findings about prevalence and prevention of celiac disease) in talks given in special meetings. Physicians and nutritionists already working in the Mennonite communities volunteered to accompany ABWB and LCO in the personal communication of positive serological results to participants, who previously unsuspected the disease, as well as to follow them up. All leaders are in close contact with the project coordinator.

6.3.3 Epidemiological Study

We performed a pilot study in January 2013, with 93 individuals from the Witmarsum Mennonite community, previously enrolled in a genetic population study for lactose intolerance (18). We found serologically anti-endomysial positive results in three individuals who unsuspected the disease (3.2%). This prompted us to launch an epidemiological transversal field study, from October 2016 to December 2018. Thirty-eight individuals who participated in the pilot study were sampled again and screened a second time. In total, we interviewed 595 Mennonites, being 202 from Nova Colony (CON), a Mennonite settlement near the Uruguayan border (Aceguá-RS), 212 from Witmarsum Colony (CWI), cc. 70 Km apart from Curitiba (Palmeira – PR) and 181 from Curitiba (CWB), the capital city from Paraná state (Figure 1). To this end, we added some questions to the basic questionnaire of the National Health Survey of 2013. Each interview lasted approximately one hour and included questions about parental

ancestry, place of birth of grandparents and migratory route, eating and health habits, language, family atmosphere, exposure to mutagens, medical diagnosis of chronic diseases (confirmed by medical reports) and familial disease aggregation. Genealogical records and information given by participants were used to confirm their Mennonite ancestry. Weight, height, waist circumference and blood pressure were measured according to the guidelines available at www.pns.icict.fiocruz.br and in the Manual of Anthropometry used in the 2013 PNS.

6.3.4 Serological screening

Serum samples of 576 Mennonites were collected in tubes containing thixotropic gel, centrifuged, aliquoted, and immediately stored at -20°C. This number represents almost 90% of those interviewed in each community, being 200 individuals from CON (78%), 207 from CWI (97%) and 169 from CWB (93%). We performed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) serological screening with anti-tissue transglutaminase (tTG) IgA (Euroimmun, Germany), and anti-deamidated gliadin-related peptide (DGP) IgA (ORGENTEC Diagnostika Mainz, DE), according to the manufacturer's instructions. Positive results were confirmed with indirect immunofluorescence in human umbilical cord cryostat sections as substrate for anti-human endomysial IgA antibodies immunofluorescence screening (IgA-EmA, Southern Biotech), according to Volta *et al.* (19).

Positive results were given to the participants or guardians of the research participants, in personal visits accompanied by a Mennonite nutritionist, with instructions to adhere to the gluten-free diet. All newly diagnosed cases were counseled to confirm the diagnosis with small bowel intestinal biopsy by collaborating physicians attending the communities. By collaborating physicians attending the communities, all cases positive to screening with autoantibodies (anti-DGP and/or IgA-EmA) were counseled to confirm the diagnosis by duodenal biopsy, due to histological findings of the duodenal mucosa, in accordance with the Marsh classification (20).

6.3.5 HLA-DQ2.5/DQ8 genetic screening

Blood from 400 Mennonites (62.5% of those interviewed) was collected in tubes containing anticoagulant ethylenediaminetetra.acetic acid (EDTA), being 117 individuals from CON (45.9%), 156 from CWI (73.2%), and 117 from CWB (64.6%).

Genomic DNA was extracted from whole blood according to the Wizard® Genomic DNA Purification kit protocol (Promega, Madison, WI, USA). We identified CD-predisposing *HLA* genotypes: *DQA1*05-DQB1*02* (DQ2.5.5) and *DQA1*03-DQB1*03:02* (DQ8) by analyzing the melting curve of sequence-specific real-time PCR products, using a Viia7 Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific). Sequence-specific primers used for *DQA1*05*, *DQB1*02*, and *DQA1*03* identification were described by Olerup *et al.* (21), and for *DQB1*03:02*, by Profaizer *et al.* (22). The galactosylceramidase gene (*GALC*) was used as an internal amplification control. Amplification protocols and amplification conditions differed for each CD-predisposing *HLA* allele (Supplementary Tables 1 and 2). We did not discriminate homozygotes from heterozygotes, using this genotyping approach.

6.3.6 Statistical and bioinformatic analysis

Comparisons of quantitative variables between groups were made with ANOVA or Kruskal-Wallis tests, depending on the normality of the distribution (tested with the Shapiro-Wilk test), using the software PRISM v.5.0 (GraphPad Software, San Diego, California, USA). We directly counted HLA-DQ2.5/DQ8 carrier frequencies in the Mennonites and compared them with carrier frequencies calculated from data stored in the Allele Frequency Net Database (www.allelefrequencies.net, (23)). Belgians and Euro-Brazilians were the two most comparable populations with enough *HLA* haplotype and allele data to enable these comparisons (Supplementary Table 3).

In the association analysis, independence tests were performed between the variables using Fisher's two-tailed or chi-square tests. All associations were corrected for possible confounding factors using logistic regression. When appropriate, the odds ratio was calculated, with a 95% confidence interval. P values lower than 0.05 and significant after Benjamini-Hochberg correction for multiple comparisons, were considered significant. The associations found with univariate and multivariate binary logistic regression were obtained using Vassarstats (VassarStats: Website for Statistical Computation; available at <http://vassarstats.net>) and STATA v.9.2 (StataCorp LP, Lakeway Drive, Texas, USA).

6.3.7 Results

Sexual distribution of the participants did not differ among communities, but more than a half (59.5%) were female. The median age was 51 (14–89) years and differed between the communities for female participants, which were older in CON ($P = 0.01$). BMI values were also much higher in this last settlement, for both sexes ($P < 1 \times 10^{-4}$).

Approximately 14% of Mennonites reported having at least one clinically diagnosed autoimmune disease (AD), among type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, autoimmune thyroiditis and/or celiac disease. Among CD-related symptoms and diseases, joint pain and clinically diagnosed autoimmune diseases were more frequent complaints in CON ($P = 2 \times 10^{-6}$ and $P = 0.029$, respectively), and clinically diagnosed lactose intolerance, in CWB ($P = 2 \times 10^{-6}$). Among 351 Mennonites who were confident to answer about CD familial history, 16 (4.56%) presented affected FDRs and 15 (4.27%), affected second-degree relatives (SDRs). There were less reports for SDRs affected with celiac disease in CON ($P = 0.025$) (Table 1).

The prevalence of CD did not differ among the investigated settlements. Ten individuals were already aware of their CD diagnosis, through both positive serology and biopsy results. Ten individuals were IgA-EmA positive. Two of them were identified as celiac in the pilot study. They were still not compliant with treatment and remained positive, even after a time span of almost five years. After a renewed contact, one of them adhered to GFD and turned negative (personal communication). It was not possible to evaluate the extent of intestinal epithelial injury through biopsies in these newly diagnosed Mennonite patients, since most resisted to go through this invasive process.

Nevertheless, given the high sensibility and specificity of the employed serological tests, all ten individuals were considered CD patients in downstream statistical analyses. This represents 10/20 or 50% of underdiagnosed CD cases. The estimated CD seroprevalence was 20/595 or 3.36% (95%CI=2.15-4.57%), approximately 1:30. The prevalence of biopsy-confirmed CD was 10/595 or 1.85% (95%CI=0.64-3.06%), cc. 1:55.

Due to the high rate of unsuspected CD patients, there was no difference between gluten consumption of CD and non-CD groups. The median age of Mennonite CD patients was 37 (16-75) years, being 15 women and 5 men. Compared with non-

CD female participants, female CD patients were younger ($P = 0.020$). The frequency of reported relatives diagnosed with CD differed between Mennonites with and without CD ($P = 1 \times 10^{-4}$). As expected, the susceptibility to CD was strongly associated with the presence of affected relatives (OR = 10.35 [95% CI = 3.31–32.30], $P < 10^{-3}$). This was also evident in our study, since all six affected first-degree relatives belonged to the group of patients, who were already aware of their condition (biopsy-proven). Even after the exclusion of four first-degree affected relatives (two from one family and two from another, without excluding first-degree relatives from the non-affected group), prevalence remained high: 16/595 (2.69% or 1:37 [95%CI = 1.48-3.90]). The distribution of non-CD ADs did not differ between the groups with and without CD (Table 1). As expected, weight loss, iron-deficiency anemia, and chronic abdominal pain were more common among CD patients, increasing between 4-6 times the odds for a CD diagnosis (Table 2).

Up to 391 Mennonites were screened for the principal CD-predisposing HLA variants (Table 1). The frequency of HLA-DQ2.5 and/or DQ8 positive individuals was 49.7%, being 26% HLA-DQ2.5 only and 21.5% HLA-DQ8 only, respectively. Their distribution did not differ between the three investigated communities. Based on data of the Allele Frequency Net Database (<http://www.allelefreqencies.net/>), we compared the frequencies of HLA-DQ2.5 and DQ8 carriers in the Mennonite population, with those in the Belgian (715 individuals) and Euro-Brazilian (641 individuals) populations, considering both cis and trans allelic combinations (*DQA1*05* and *DQB1*02* for *HLA-DQ2.5*, and *DQA1*03* and *DQB1*03:02* for *HLA-DQ8*). The frequency of HLA-DQ2.5 carriers among the investigated Mennonites (29.67%) is almost identical to the one reported in Belgium (28.72%), but did differ from the one reported in Euro-Brazilians (17.49%, Fisher $P = 7 \times 10^{-6}$). Among 13 investigated CD patients, 12 were *HLA-DQ2.5* positive. We did not identify *HLA-DQ8* positive CD patients. Even so, the frequency of HLA-DQ2.5 or DQ8 positive individuals was lower in healthy individuals (92.31% vs. 49.74%, respectively). This status was associated with increased susceptibility to CD (OR=12.13 [95%CI=1.56-94.20], $P=0.003$). Yet the frequency of HLA-DQ8 carriers within the Mennonite population was higher (24.81%) than in Belgians (14.07%, Fisher $P = 1.8 \times 10^{-6}$). It was also higher in Mennonites than in Euro-Brazilians (16%, Fisher $P = 6.5 \times 10^{-6}$).

6.4 DISCUSSION

Due to its peculiar demographic history, the genomic architecture of the Mennonite population has suffered the effects of genetic drift, altering the frequency of rare Mendelian, as well as chronic diseases (12–15). Indeed, cc. 17% of the participating individuals in our study reported diagnosis of at least one autoimmune disease (AD), like type 1 diabetes, rheumatoid arthritis, autoimmune thyroiditis and/or celiac disease. This prevalence (16.6%) is in clear contrast with the AD world prevalence of almost 5% (24).

CD seroprevalence and the prevalence of biopsy-confirmed CD among Southern Brazilian Mennonites was impressively high: 3.36% (approximately 1:30). This is near to the highest seroprevalence reported to date (5.6%) for the isolated Saharawi people of Western Sahara (8). It is also much higher than the 1.22% seroprevalence reported in the Dutch population (25), thought to be one of the principal contributors to the current genetic pool of the Mennonites, together with the Germans (1.57% seroprevalence) and the Belgians (0.86%) (26,27). Even if taking into account only biopsy-confirmed CD, the 1.85% frequency in Mennonites contrasts with the global prevalence of the disease, which ranges from 0.5% (1:200) to 1.0% (1:100) (28). More specifically, CD seroprevalence was 1.4%, and biopsy-based CD diagnosis was 0.7% in a recent meta-analysis, ranging from 0.4% in South America to 0.8% in Europe and Oceania (9), reaching 0.24% (1:417) in Curitiba (10) and 0.35% (1:286) in São Paulo (29), two Brazilian cities, and 0.37% in Germany (30). The Mennonite prevalence is actually very close to the 2.13% frequency found in Finland, which is also a genetically isolated population (31).

Ten individuals were identified as celiac by our serological screening, representing 50% of underdiagnosed cases. Worldwide, the proportion of diagnosed and undiagnosed cases varies from one country to another, spanning from 1:2 in Finland (32) to 1:20 in Argentina (33). The failure to detect the disease, coupled with failure to treat it, may lead to several severe comorbidities such as osteoporosis, sterility, neurological and psychiatric disorders, small bowel adenocarcinoma, lymphoma and carcinoma of the esophagus, and increased morbidity (5,34,35). Two individuals previously identified as celiac in the pilot study remained positive in the second serological screening, indicating non-compliance with the gluten-free diet. The

reason for non-compliance may be social restrictions in the Mennonite community, whose eating habits rely heavily on gluten consumption.

Through our questionnaire, we gathered information about eating and health habits, exposure to mutagens, presence of chronic diseases and familial disease aggregation, among others, that allowed us to identify predisposed individuals, who may benefit from early intervention (36). Approximately 10% of individuals reported a family history of celiac disease (CD), 4.48% of FDRs and 4.20% of second-degree relatives. Furthermore, we observed family aggregation of CD. The prevalence of CD in FDRs of celiac patients increases to a range between 2-21%, depending on sex and *HLA-DQ* genotype, and the association with other ADs is frequent in both patients and relatives (4,37–40). Through a systematic review and a meta-analysis, others estimated a prevalence of 7.6% among FDRs and 2.3% among second-degree relatives (41). Among the most common symptoms associated with CD, our study also found iron-deficiency anemia, weight loss, and chronic abdominal pain.

Worldwide, *HLA* typing has a high negative predictive value for the diagnosis of CD, since at least one of the susceptibility variants, either *HLA-DQ2.5* or *HLA-DQ8*, occurs in 86-93% of patients with CD (2,42). Interestingly, the frequency of *HLA-DQ8* in Mennonites differed from the one reported in the Belgian population – which significantly contributed to the current Mennonite gene variant pool. This is most probably the result of a founder effect. Since we did not identify any *DQ8+* Mennonite affected with CD, probably due to the low sample size, we cannot justify the high CD prevalence based on the rise of *DQ8* frequency. In fact, more than half of *HLA-DQ2.5/DQ8* Mennonite carriers do not have CD (50.3%, compared with 40% among Europeans without CD) (38,43). These individuals may also bear protective genetic/epigenetic/ microbiota variants, yet to be discovered.

Furthermore, *HLA-DQ2.5* and *DQ8* frequencies were significantly higher in Mennonites, than in Euro-Brazilians. This is a result of prime epidemiological relevance for the design of public health policies, indicating a higher general susceptibility to the disease, than most Brazilians with a strong European genetic component.

HLA-DQ2.5 carrier frequency of Mennonite patients (92.31%) was similar to that reported in 102 Turkish pediatric patients (76%) (44). As in our study, none of the Turkish patients were *HLA-DQ8* positive. One of our CD patients was neither *HLA-DQ2.5* nor *HLA-DQ8* positive, indicating an influence of yet unknown predisposing genetic variants in *HLA-DQ2.5/DQ8* negative CD Mennonite patients. The absence of

HLA-DQ2.5 or HLA-DQ8 was also formerly observed by Kotze *et al* (45) in Brazilian patients. In fact, several non-*HLA* genes, whose products influence the integrity of the intestinal barrier and the quality of the immune response, modulate the susceptibility to the disease (28). About 15% of the genetic susceptibility to CD is explained by 57 single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in 39 non-*HLA* loci, identified through Genome-Wide Association Studies (GWAS) (46,47). Furthermore, HLA-DQ2.5/DQ8's contribution to CD in monozygotic twins ranges only from 25–40% (48,49). Thus, it is important not to exclude strongly suspicious patients from diagnostic workup, based only on being HLA DQ2.5 or DQ8 negative.

Finally, our results indicate that one in thirty Mennonites are expected to present CD. Of those affected, half are unaware of the disease. Most are HLA-DQ2.5 positive but a role for HLA-DQ8, whose frequency is cc. 1.8 times higher than in original contributing populations, cannot be excluded. Both DQ2.5/DQ8 carrier frequencies are cc. 1.6 times higher in Mennonites than in Euro-Brazilians, highlighting the epidemiological relevance of this work for public health policies. Further identification of other associated genetic, epigenetic and environmental variants shall help to define the CD risk of this population and lay the foundations of future strategies of preventive medicine.

Table 1: The distribution of demographic characteristics, symptoms, diagnoses, and genetic screening of the studied population samples.

	CON	CWI	CWB	P value	TOTAL	CD patients	Non CD patients	P value
N	N=202	N=212	N=180			20	574	
Gender (F/M)	123/79	137/74	98/82	0.108	358/235	15/05	343/231	0.245
	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)		Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	
Age - female	57 (14-83)	46 (16-89)	44 (14-88)	0.010 q=0,042	50 (14-89)	32 (16-69)	51 (14-89)	0.020 q=0,037
Age - male	53 (17-82)	57 (20-94)	47 (15-85)	0.143	52 (15-94)	59 (19-75)	52 (15-94)	0.004
BMI - female	27.59 (15.82-45.79)	24.58 (16.21-33.57)	22.91 (16.20-35.40)	<1X10 ⁻⁴ q=0,002	25.25 (15.82-45.79)	22.39 (19.50-45.79)	25.47 (15.82-44.52)	0.346
BMI - male	28.41 (19.22-42.90)	26.19 (18.62-47.56)	25.09 (17.04-38.67)	<1X10 ⁻⁴ q=0,005	26.76 (17.04-47.56)	27.42 (26.03-28.90)	26.65 (17.04-47.56)	0.029 q=0,04
Symptoms/ diagnoses	% (n/total N)	% (n/total N)	% (n/total N)		% (n/total N)	% (n/total N)	% (n/total N)	
Chronic diarrhea	2.12 (4/189)	6.74 (12/178)	5.41 (6/111)	0.096	4.60 (22/478)	11.11 (2/18)	4.37 (20/458)	0.045 q=0,05
Weight loss	3.70 (7/189)	8.19 (10/122)	3.63 (4/110)	0.154	4.98 (21/421)	17.65 (3/17)	4.45 (18/404)	0.007 q=0,038
Iron-deficiency anemia	7.40 (14/189)	10.48 (13/124)	8.18 (9/110)	0.628	8.51 (36/423)	33.33 (6/18)	7.40 (30/405)	<1X10 ⁻⁴ q=0,007
Bloating	13.29 (25/188)	18.03 (22/122)	10.00 (11/110)	0.200	13.81 (58/420)	5.88 (1/17)	14.14 (57/403)	0.272
Constipation	12.69(24/189)	19.00 (23/121)	17.43 (19/109)	0.282	15.75 (66/419)	6.25 (1/16)	16.12 (65/403)	0.295
Chronic abdominal pain	16.40 (31/189)	16.38 (29/177)	16.36 (18/110)	1	16.45 (78/474)	41.18 (7/17)	15.53 (71/459)	0.003 q=0,028
Joint pain	26.98 (51/189)	8.06 (10/124)	7.92 (8/101)	2x10 ⁻⁶ q=0,007	16.70 (69/413)	6.25 (1/16)	17.12 (68/397)	0.321
Diabetes mellitus type 1	1.07 (2/187)	0 (0/123)	1.94 (2/103)	0.326	0.96 (4/414)	0 (0/16)	1.01 (4/397)	0.147

Irritable bowel syndrome	5.32 (10/188)	3.36 (4/119)	3.88 (4/103)	0.608	4.44 (18/405)	7.14 (1/14)	4.35 (17/391)	0.124
Lactose intolerance	1.63 (3/184)	3.47 (6/173)	13.58 (14/103)	2x10 ⁻⁶ q=0,005	5.00 (23/460)	0 (0/17)	5.19 (23/443)	0.588
Autoimmune thyroiditis	10.52 (20/190)	13.01 (16/123)	14.42 (15/104)	0.591	12.23 (51/417)	11.76 (2/17)	12.25 (49/400)	0.707
Rheumatoid arthritis	11.36 (20/176)	4.09 (5/122)	6.48 (7/108)	0.059	8.01 (33/412)	0 (0/16)	7.88 (32/406)	0.346
Celiac disease	2.97 (6/202)	2.83 (6/212)	4.44 (8/181)	0.637	3.36 (20/595)	-	-	
Any autoimmune disease*	18.31 (37/202)	9.57 (20/209)	12.29 (22/179)	0.029 q=0,04	13.64 (79/590)	12.50 (2/16)	13.41 (77/574)	1
Familial aggregation								
FDR with CD	2.15 (4/186)	7.41 (6/81)	7.14 (6/84)	0.07	4.56 (16/351)	42.86 (6/14)	2.96 (10/337)	<1X10 ⁻⁴ 0,002
SDR with CD	1.61 (3/186)	6.17 (5/81)	8.33 (7/84)	0.025 q=0,04	4.27 (15/351)	28.57 (4/14)	3.26 (11/337)	<1X10 ⁻⁴ q=0,005
Any relative with CD	5.79 (11/190)	15.85 (13/82)	11.76 (10/85)	0.010 q=0,037	9.65 (34/352)	46.67 (7/15)	8.01 (27/337)	<1X10 ⁻⁴ 0,002
HLA	N=115	N=155	N=121		N=391	N=13	N=378	
DQ2.5 (+)	33.91 (39)	29.03 (45)	26.45 (32)	0.559	29.67 (116)	92.31 (12)	27.51 (104)	3x10 ⁻⁶
Only DQ2.5 (+)	33.04 (38)	23.23 (36)	23.97 (29)	0.159	26.09 (102)	92.31 (12)	24.07 (90)	1x10 ⁻⁶
DQ8 (+)	16.52 (19)	32.90 (51)	22.31 (27)	0.007	24.81 (97)	0	25.66 (97)	0.044#
Only DQ8 (+)	15.65 (18)	27.10 (42)	19.83 (24)	0.072	21.48 (84)	0	22.22 (84)	0.08
DQ2.5 (+) and/or DQ8 (+)	49.57 (57)	56.13 (87)	46.28 (56)	0.248	51.15 (200)	92.31 (12)	49.74 (188)	0.003

P values were calculated with chi-square test for most variables, except BMI and age distributions (non-parametric Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests), gender, diabetes mellitus type 1, first and second-degree relatives (Fisher exact T-tests). # not significant after correction with the Benjamini-Hochberg method for multiple comparisons (q=0.02 for HLA results).

* autoimmune disease (AD): type 1 diabetes, arthritis and/or autoimmune thyroiditis, excluding CD for the analysis in this group.

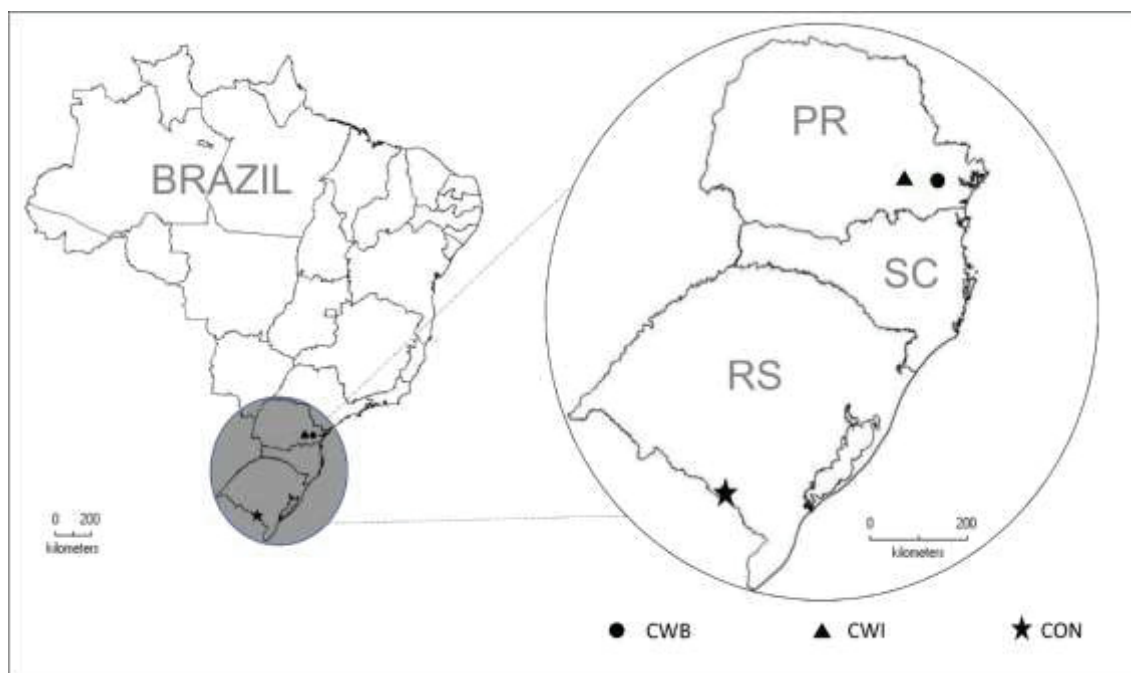
BMI = body mass index, CD = celiac disease, CON = Nova Colony, CWI = Witmarsum Colony, CWB = Curitiba, F = female, FDR = first degree relative, M = male, P = P value, SDR = second degree relative, n = number of individuals with the evaluated characteristic, N = total number of individuals.

Table 2: Common symptoms associated with CD.

Symptoms	CD% (n/total N)	N-CD% (n/total N)	OR	95% CI	P value
Iron-deficiency anemia	33.33 (6/18)	7.39 (30/406)	6.27	2.11-18.65	0.001
Chronic abdominal pain	41.18 (7/17)	15.47 (71/459)	3.56	1.28-9.84	0.014
Weight loss	17.65 (3/17)	4.44 (18/405)	4.11	1.05-16.03	0.041

CD = celiac disease, N-CD = non-celiac disease, n = number of individuals with the evaluated characteristic, N = total number of individuals, CI = confidence interval of 95%, OR = Odds Ratio, P value = probability of significance. All associations were corrected for possible confounding factors (sex and age) using logistic regression.

Figure 1: Location of the investigated Southern Brazilian Mennonite communities.



PR = Paraná state, SC = Santa Catarina state, RS = Rio Grande do Sul state, CON = Nova Colony, CWI = Witmarsum Colony, CWB = Curitiba.

Supplementary table 1: Reagent, primer concentrations, and volumes used for each assay.

	DQA1*05 and DQA1*03		DQB1*02		DQB1*03:02		
	[Initial]	[Final]	Volume (µL)	[Final]	Volume (µL)	[Final]	Volume (µL)
HLA forward primer (ng/µL)	10	0.15	0.25	0.18	0.3	0.2	0.25
HLA reverse primer (ng/µL)	10	0.15	0.25	0.18	0.3	0.2	0.25
GALC forward primer (ng/µL)	10	0.075	0.125	0.075	0.125	0.1	0.125
GALC reverse primer (ng/µL)	10	0.075	0.125	0.075	0.125	0.1	0.125
Genomic DNA (ng/µL)	20	0.3	1	0.3	1	0.4	1
GoTaq® RealTime qPCR master mix (x)	2	7.5	2.5	7.5	2.5	-	-
KAPA SYBR® FAST qPCR master mix (x)	2	-	-	-	-	16	4
DMSO (%)	5	-	-	-	-	40	0.25
H₂O (µL)	-	-	1.75	-	1.65	-	2
Total volume per reaction			6		6		8

Within brackets: concentration. *HLA* – Human Leukocyte Antigen, *GALC* – galactosylceramidase, qPCR – quantitative polymerase chain reaction, DMSO – dimethyl sulfoxide

Supplementary table 2: PCR conditions.

Parameter	DQA1*05 and DQA1*03			DQB1*02			DQB1*03:02		
	Temperature (°C)	Time	Cycles	Temperature (°C)	Time	Cycles	Temperature (°C)	Time	Cycles
Initial denaturation	95	10 min	1	95	10 min	1	94	5 min	1
	95	15 sec		95	15 sec		94	20 sec	
Amplification	60	60 sec	32	55	60 sec	32	60	20 sec	66
	-	-		-	-		72	40 sec	
Melt curve – step 1	95	15 sec	1	95	15 sec	1	95	15 sec	1
Melt curve – step 2	60	60 sec		60	60 sec		60	60 sec	
Melt curve – step 3	95	15 sec		95	15 sec		95	15 sec	

Supplementary Table 3. HLA-DQ2 and DQ8 carrier frequencies estimated for the Brazilians and the Belgians, compared with the Mennonite population

Population	DQ2 <i>DQA1*05-DQB1*02</i>	Combination Frequency	Homozygote Frequency	Heterozygote Frequency	Carrier Frequency	Carriers (N)	Fisher's exact P value
Brazil (N=641)	cis	0.0913	0.0083	0.1659	0.1742	112	
	trans	0.0259	0.0007	0.0504	0.0510	33	
	total	0.1171	0.0090	0.2162	0.2252	144	0.0075
Belgium (N=715)	cis	0.1410	0.0199	0.2422	0.2621	187	
	trans	0.0126	0.0002	0.0250	0.0251	18	
	total	0.1536	0.0200	0.2672	0.2872	205	ns
Mennonites (N=383)	total	nd	nd	nd	0.3003	115	
DQ8							
<i>DQA1*03-DQB1*03:02</i>							
Brazil (N=641)	cis	0.0835	0.0070	0.1530	0.1600	103	
	trans	0.0005	0	0.0011	0.0011	0	
	total	0.0840	0.0070	0.1541	0.1610	103	0.0004
Belgium* (N=715)	cis	0.0730	0.0053	0.1353	0.1407	101	
	total	nd	nd	nd	0.2507	96	0.00001

The frequency of HLA**DQ2.5* and *DQ8* in cis combinations was obtained by summing the frequencies of corresponding HLA haplotypes reported in the Allele Frequency Net Database (<http://www.allelefrequencies.net/>). To obtain the frequency of trans combinations, the sum of corresponding frequencies for HLA**DQA1* alleles (*DQA1*05:01* + *DQA1*05:03* + *DQA1*05:05* for *DQ2.5*, *DQA1*03:01*, *DQA1*03:02* and *DQA1*03:03* for *DQ8*) and HLA**DQB1* alleles (*DQB1*02:01* + *DQB1*02:02* + *DQB1*02:03* for *DQ2.5*, *DQB1*03:02* for *DQ8*) reported in the Allele Frequency Net Database was subtracted from the sum of in cis frequency combinations. *DQA1*05* and *DQB1*02* resulting frequencies were multiplied to obtain *DQ2.5* trans combinations, as well as *DQA1*03* and *DQB1*03:02*, to obtain *DQ8* trans combinations. The resulting cis and trans frequencies were summed to obtain the total combination frequencies. Homozygote and heterozygote carrier frequencies were obtained from the cis, trans and total HLA combination frequencies, assuming Hardy and Weinberg equilibrium. Carrier frequencies were estimated through the sum of homozygote and heterozygote carrier frequencies. Absolute numbers were compared with Fisher's exact

test (two-sided P value), between Brazilians and Mennonites, and between Belgians and Mennonites.* there were no HLA-DQ8 "trans" combinations for the Belgian population, all *DQB1*03:02* alleles were found in absolute linkage disequilibrium with *DQA1*03* alleles. nd: not determined (homozygotes were not differentiated from heterozygotes in our genotyping approach), ns: not significant.

6.5 REFERENCE

1. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PHR, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* [Internet]. 2013 Jan;62(1):43–52. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2011-301346>
2. Bourgey M, Calcagno G, Tinto N, Gennarelli D, Margaritte-Jeannin P, Greco L, et al. HLA related genetic risk for coeliac disease. *Gut* [Internet]. 2007 Aug 1;56(8):1054–9. Available from: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2006.108530>
3. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology* [Internet]. 2001;120(3):636–51. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508501251877>
4. Utiyama SRDR, Nass FR, Kotze LMDS, Nisihara RM, Ambrosio AR, De Messias-Reason IT. Triagem sorológica de familiares de pacientes com doença celíaca: Anticorpos anti-endomísio, antitransglutaminase ou ambos? *Arquivos de Gastroenterologia*. 2007;44(2):156–61.
5. Kotze LMDS. Celiac disease in Brazilian patients: associations, complications and causes of death. Forty years of clinical experience. *Arquivos de Gastroenterologia* [Internet]. 2009 Dec;46(4):261–9. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-28032009000400004&lng=en&tlng=en
6. Green PHR, Lebowl B, Greywoode R. Celiac disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* [Internet]. 2015 May;135(5):1099–106. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.01.044>
7. Lindfors K, Ciacci C, Kurppa K, Lundin KEA, Makharia GK, Mearin ML, et al. Coeliac disease. *Nature Reviews Disease Primers* [Internet]. 2019 Dec 10;5(1):3. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41572-018-0054-z>
8. Catassi C, Ratsch li-M, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, Asmar R El, et al. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *The Lancet* [Internet]. 1999 Aug;354(9179):647–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673699026094>
9. Singh P, Arora A, Strand TA, Leffler DA, Catassi C, Green PH, et al. Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* [Internet]. 2018 Jun;16(6):823-836.e2. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356517307838>
10. Pereira MAG. Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. *World Journal of Gastroenterology* [Internet]. 2006;12(40):6546. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v12/i40/6546.htm>

11. PAULS JR P. Mennoniten in Brasilien: Gedenkschrift zum 50 Jahr-Jubiläum ihrer Einwanderung 1930-1980. Palmeira: Witmarsum. 1980;
12. Lopes FL, Hou L, Boldt ABW, Kassem L, Alves V, Nardi A, et al. Finding Rare, Disease-Associated Variants in Isolated Groups: Potential Advantages of Mennonite Populations. *Human Biology*. 2016;88(2):109–20.
13. Hou L, Kember RL, Roach JC, O'Connell JR, Craig DW, Bucan M, et al. A population-specific reference panel empowers genetic studies of Anabaptist populations. *Scientific Reports* [Internet]. 2017 Dec 20;7(1):6079. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41598-017-05445-3>
14. Pardo-Seco J, Llull C, Berardi G, Gómez A, Andreatta F, Martínón-Torres F, et al. Genomic continuity of Argentinean Mennonites. *Scientific Reports* [Internet]. 2016 Dec 8;6(1):36392. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep36392>
15. Toscanini U, Brisighelli F, Llull C, Berardi G, Gómez A, Andreatta F, et al. Charting the Y-chromosome ancestry of present-day Argentinean Mennonites. *Journal of Human Genetics* [Internet]. 2016 Jun 4;61(6):507–13. Available from: <http://www.nature.com/articles/jhg20163>
16. Jaworski MA, Slater JD, Severini A, Hennig KR, Mansour G, Mehta JG, et al. Unusual clustering of diseases in a Canadian Old Colony (Chortitza) Mennonite kindred and community. *CMAJ: Canadian Medical Association journal* [Internet]. 1988 Jun 1;138(11):1017–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3370569>
17. Tursi A, Elisei W, Giorgetti GM, Gaspardone A, Lecca PG, Di Cesare L, et al. Prevalence of celiac disease and symptoms in relatives of patients with celiac disease. *European review for medical and pharmacological sciences* [Internet]. 2010 Jun;14(6):567–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20712266>
18. Boschmann SE, Boldt AB, de Souza IR, Petzl-Erler ML, Messias-Reason IJ. The Frequency of the LCT*-13910C>T Polymorphism Associated with Lactase Persistence Diverges among Euro-Descendant Groups from Brazil. *Medical Principles and Practice*. 2016;25(1):18–20.
19. Volta U, Molinaro N, De Franceschi L, Fratangelo D, Bianchi FB. IgA anti-endomysial antibodies on human umbilical cord tissue for celiac disease screening. *Digestive Diseases and Sciences* [Internet]. 1995 Sep;40(9):1902–5. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF02208653>
20. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A Molecular and Immunobiologic Approach to the Spectrum of Gluten Sensitivity ('Celiac Sprue'). *Gastroenterology* [Internet]. 1992;102(1):330–54. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0016-5085\(92\)91819-P](http://dx.doi.org/10.1016/0016-5085(92)91819-P)
21. Olerup O, Aldener A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*. 1993;41:119–34.

22. Profaizer T, Eckels D, Delgado JC. Celiac disease and HLA typing using real-time PCR with melting curve analysis. *Tissue Antigens* [Internet]. 2011 Jul;78(1):31–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1399-0039.2011.01676.x>
23. González-Galarza FF, Takeshita LYC, Santos EJM, Kempson F, Maia MHT, Da Silva ALS, et al. Allele frequency net 2015 update: New features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. *Nucleic Acids Research*. 2015;43(D1):D784–8.
24. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR. Sex Differences in Autoimmune Disease from a Pathological Perspective. *The American Journal of Pathology* [Internet]. 2008 Sep;173(3):600–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944010616355>
25. Csizmadia C, Mearin ML, Blomberg B, Brand R, Verloove-vanhorick SP. An iceberg of childhood coeliac disease in the Netherlands. *The Lancet*. 1999;353:813–4.
26. Händel N, Mothes T, Petroff D, Baber R, Jurkutat A, Flemming G, et al. Will the Real Coeliac Disease Please Stand Up? Coeliac Disease Prevalence in the German LIFE Child Study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [Internet]. 2018 Oct;67(4):494–500. Available from: <http://insights.ovid.com/crossref?an=00005176-201810000-00015>
27. Vijgen S, Alliet P, Gillis P, Declercq P, Mewis A. Seroprevalence of celiac disease in Belgian children and adolescents. *Acta gastro-enterologica Belgica* [Internet]. 2012 Sep;75(3):325–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23082703>
28. Gujral N. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World Journal of Gastroenterology* [Internet]. 2012;18(42):6036. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3496881&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Alencar ML, Ortiz-Agostinho CL, Nishitokukado L, Damião AOMC, Abrantes-Lemos CP, Leite AZ de A, et al. Prevalence of celiac disease among blood donors in São Paulo: the most populated city in Brazil. *Clinics (São Paulo, Brazil)* [Internet]. 2012;67(9):1013–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3438239&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
30. Kratzer W. Prevalence of celiac disease in Germany: A prospective follow-up study. *World Journal of Gastroenterology* [Internet]. 2013;19(17):2612. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v19/i17/2612.htm>
31. Vilppula A, Collin P, Mäki M, Valve R, Luostarinen M, Krekelä I, et al. Undetected coeliac disease in the elderly. *Digestive and Liver Disease* [Internet]. 2008 Oct;40(10):809–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S159086580800145X>

32. Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, et al. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *New England Journal of Medicine*. 2003;348:2517–24.
33. Gomez J. Prevalence of celiac disease in argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *The American Journal of Gastroenterology* [Internet]. 2001 Sep;96(9):2700–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002927001026867>
34. Green PHR, Krishnareddy S, Lebwohl B. Clinical Manifestations of Celiac Disease. *Digestive Diseases* [Internet]. 2015 Apr 22;33(2):137–40. Available from: <https://www.karger.com/Article/FullText/370204>
35. Freeman HJ. Risk factors in familial forms of celiac disease. *World Journal of Gastroenterology* [Internet]. 2010;16(15):1828. Available from: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v16/i15/1828.htm>
36. Cárdenas-Roldán J, Rojas-Villarraga A, Anaya J. How do autoimmune diseases cluster in families? A systematic review and meta-analysis. *BMC Medicine* [Internet]. 2013 Dec 18;11(1):73. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1741-7015/11/73>
37. Ciclitira PJ, Johnson MW, Dewar DH, Ellis HJ. The pathogenesis of coeliac disease. *Molecular Aspects of Medicine* [Internet]. 2005 Dec;26(6):421–58. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0098299705000336>
38. Högberg L, Fälth-Magnusson K, Grodzinsky E, Stenhammar L. Familial Prevalence of Coeliac Disease: a Twenty-Year Follow-up Study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* [Internet]. 2003 Jan 8;38(1):61–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12608466>
39. Mearin ML. The prevention of coeliac disease. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* [Internet]. 2015;29(3):493–501. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2015.04.003>
40. Parra-Medina R, Molano-Gonzalez N, Rojas-Villarraga A, Agmon-Levin N, Arango M-T, Shoenfeld Y, et al. Prevalence of Celiac Disease in Latin America: A Systematic Review and Meta-Regression. Coppola D, editor. *PLOS ONE* [Internet]. 2015 May 5;10(5):e0124040. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0124040>
41. Singh P, Arora S, Lal S, Strand TA, Makharia GK. Risk of Celiac Disease in the First- and Second-Degree Relatives of Patients With Celiac Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *American Journal of Gastroenterology* [Internet]. 2015 Nov;110(11):1539–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2015.296>
42. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, et al. Hla types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the european genetics cluster on celiac disease. *Human Immunology*

[Internet]. 2003 Apr;64(4):469–77. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885903000272>

43. Liu E, Rewers M, Eisenbarth GS. Genetic testing: Who should do the testing and what is the role of genetic testing in the setting of celiac disease?

Gastroenterology [Internet]. 2005 Apr;128(4):S33–7. Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508505001824>

44. Basturk A, Artan R, Yilmaz A. The incidence of HLA-DQ2/DQ8 in Turkish children with celiac disease and a comparison of the geographical distribution of HLA-DQ. Gastroenterology Review [Internet]. 2017;4(4):256–61. Available from:

<https://doi.org/10.5114/pg.2017.72099>

45. Kotze LM da S, Nishihara R, Utiyama SR da R, Kotze LR. Absence of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 does not exclude celiac disease in Brazilian patients. Rev Esp Enferm Dig (Madrid). 2014;106(8):561–2.

46. Ricaño-Ponce I, Wijmenga C, Gutierrez-Achury J. Genetics of celiac disease. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology [Internet]. 2015 Jun;29(3):399–

412. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521691815000517>

47. Trynka G, Hunt K a, Bockett N a, Romanos J, Castillejo G, Concha EG De, et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. Nature Genetics. 2012;43(12):1193–201.

48. Greco L. The first large population based twin study of coeliac disease. Gut [Internet]. 2002 May 1;50(5):624–8. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1773191&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

49. van Heel DA, Hunt K, Greco L, Wijmenga C. Genetics in coeliac disease. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology [Internet]. 2005 Jun;19(3):323–39.

Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S152169180500003X>

7 CAPÍTULO III

Lactose intolerance despite genetic lactase persistence among Brazilian Mennonites²

Luana Caroline Oliveira¹, Renato Mitsunori Nisihara², Gabriel Adelman Cipolla¹, Stefanie Epp Boschmann², Iara José de Messias-Reason², Maria Luiza Petzl-Erler¹, Angelica Beate Winter Boldt¹.

¹ Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil. ² Laboratory of Molecular Immunopathology, Department of Clinical Pathology, Clinical Hospital, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil.

7.1 ABSTRACT

Objective: to characterize genetic lactase persistence (LP) in the isolated Mennonite population. **Methods:** using sequence-specific amplification, we genotyped the –13910*C>T (rs4988235) *LCT* polymorphism in 495 Mennonites from three Southern Brazilian settlements. **Results:** The C/C genotype, highly associated with absence of lactase expression, had a frequency of 10.5%. This contrasts with the high prevalence of Mennonites reporting LI symptoms (36.5% or 138/378), of which 70% (86/138) still consume milk and/or dairy products, at least once a day. Of those with complaints, eight of ten have confirmed LI through the serum glucose measurement test (8/138 or 5.8%). The C/C genotype was more common among this group of LI-confirmed individuals (37.5% or 3/8) than among asymptomatic individuals (10% or 24/239) (OR=5.38 [95%CI=1.21-23.90, P=0.045]). **Conclusion:** The frequency of –13910*T carriers associated with LP was of 89.5% among Mennonites, similar to Northern Europeans. The C/C genotype is associated with lactose intolerance in this population, but, in contrast to other populations, cannot explain most cases of LI-symptoms among the Mennonites.

² Este artigo foi adaptado para compor a tese de doutorado. Ele será submetido para publicação na revista científica *Medical Principles and Practice* no formato de short communication.

7.2 INTRODUCTION

Lactose is an abundant disaccharide in milk, which is the exclusive source of mammalian nutrition in the first months or years of life. The presence of the lactase enzyme in the brush border of the small intestinal mucosa is essential for the cleavage of lactose in glucose and galactose, and subsequent digestion and absorption. In most infants, intestinal lactase activity is maximal during the perinatal period, and ceases after weaning or during childhood in the majority of human populations [1]. This condition is genetically programmed and lactase non-persistence leads to primary lactose intolerance (LI). In contrast, some individuals sustain lifelong production of the enzyme, known as lactase persistence (LP). LI individuals present physiological problems because lactose is not cleaved, then causing osmotic alterations and bacterial fermentation, leading to various gastrointestinal symptoms, such as bloating, abdominal pain, flatulence and diarrhea [2].

The prevalence of LP reflects the ancient history of pastoralism and milking, being more frequent in northern Europe and among nomads in Africa and in the Middle East [3]. The major polymorphism associated with this phenotype in Europeans is the variant rs4988235 (*-13910C/T*). This nucleotide substitution is located in a 13.9 kb enhancer region upstream of the lactase (*LCT*) gene, within the *MCM6* gene [3]. Four other different point mutations within this same *MCM6* region seem to modify *LCT* gene expression [4].

The Mennonites belong to a pacifist religious group originated by the Anabaptist Movement in Europe in the 16th century, sharing Belgian, German and Dutch ancestry. They have lived in isolated communities for approximately 25 generations and passed through at least three demographic bottlenecks, the last one as they fled from Russia, in the second decade of the last century. In South America, the Mennonites founded numerous settlements. In Brazil, several families settled in the Paraná state: within the state's capital, Curitiba (CWB/PR), and ca. 60 km away from it, in the Witmarsum Colony (CW/Palmeira-PR). Others founded Nova Colony in the Rio Grande do Sul state, at the Uruguayan border (CN/Aceguá-RS) [5]. Since its inception, the Mennonite communities maintain German traditions, as well as agriculture and dairy farming.

A previous study performed by Boschmann et al [6], verified the prevalence of $-13910C>T$ among 151 Mennonites from Witmarsum Colony and 292 Euro-descendants from South Brazil. They observed that the frequency of $-13910*T$ was much higher among Mennonites, compared to the Euro-Brazilian cohort, and that lactase persistence was more prevalent among Mennonites. Based on this, we aimed to investigate lactose intolerance within this population, sampling different Mennonite communities from South Brazil.

7.3 MATERIAL AND METHODS

7.3.1 Ethics Statement

The Ethics Committee of the Health Sciences Sector of the Federal University of Paraná (CEP SCS-UFPR) approved this study (protocols 2.247.952 – CAAE 55297916.6.0000.0102 and 2.204.113 - CAAE 54385616.2.0000.0102). All study participants were informed about the research and signed a term of informed consent.

7.3.2 Research Participants

In total, we genotyped 495 Mennonites (57.6% female, average age 50.3 (14-94) years), being 159 from Colony Nova (CON), a Mennonite settlement near the Uruguayan border (Aceguá-RS), 213 from Colony Witmarsum (CWI), cc. 60 km apart from Curitiba (Palmeira – PR) and 123 from Curitiba (CWB), the capital of Paraná state,. We also interviewed 378 of them, with a slightly modified version of the questionnaire of the National Health Survey of 2013. Each interview lasted approximately one hour and included questions about parental origin, place of birth of grandparents and migratory route to confirm ethnicity, eating and health habits, gastrointestinal symptoms and familial disease aggregation.

7.3.3 $-13910*C>T$ genotyping

Blood was collected in tubes containing anticoagulant EDTA, and genomic DNA was extracted from whole blood according to the Wizard® Genomic DNA Purification kit protocol (Promega, Madison, WI, USA). The genotype for $-13910C>T$ was identified through amplification with sequence-specific primers (amplifying a Human Growth Hormone gene fragment as internal control), as published by

Boschmann et al [6]. All reactions were carried out in a final volume of 8 μ l, containing 20 ng of genomic DNA, 0.2 mM of each dNTP and 1x Coral Buffer (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA). Thermal cycling began with 95°C for 5 min, followed by a touchdown strategy (10 cycles at 63°C, 12 at 61°C and 12 at 59°C). We submitted the amplified fragments to an electrophoretic run on 1.5% agarose gel, stained with UniSafe Dye (Uniscience, Sao Paulo, Brazil).

7.3.4 Statistical analysis

We obtained allele and genotype frequencies by direct counting, and the hypothesis of Hardy-Weinberg equilibrium was tested by the exact test of Guo & Thompson, using ARLEQUIN v.3.5 [7]. We further compared the distribution of allelic and genotypic frequencies for $-13910C>T$ polymorphism among Mennonites from different communities, as well as with different ancestries, using the Fisher's exact test (VassarStats, available at: <http://vassarstats.net>). When appropriate, the odds ratio was calculated, with a 95% confidence interval. P values lower than 0.05 were considered significant.

7.4 RESULTS

The genotypic distributions did not differ between the three investigated communities and were in agreement with those expected by Hardy-Weinberg equilibrium. The frequency of $-13910*T$ carriers among the investigated Mennonites (88.64%) is close to those in Utah residents (92.92%), Finish (85.85%) and British (90.10%), and higher than in Iberian (68.22%) and Toscani (15.88%) populations ($P<10^{-3}$ for both comparisons, Table 1). The $-13910C/C$ genotype associated with adult-type hypolactasia occurred in 10.5% of Mennonites, compared with 50.83% of Euro-Brazilians ($P<10^{-3}$) [6,8,9]. This figure cannot explain the high prevalence (36.5% or 138/378) of LI symptoms (abdominal pain, bloating, diarrhea, constipation) among Mennonites, of which 70% (86/138) still consume milk and/or dairy products at least once a day. Of those with complaints, eight of ten confirmed LI through the serum glucose measurement test (5.8% or 8/138). Only three of these individuals presented the C/C genotype. We thus estimate that around half of the cases of LI-confirmed Mennonites are not explained by their genotype for $-13910C>T$ (they are genetically lactase-persistent, i.e., they are $-13910*T$ carriers). Even so, the C/C genotype was

more common in LI-confirmed Mennonites (37.5% or 3/8) than in asymptomatic Mennonites (10% or 24/239) (OR=5.38 [95%CI=1.21-23.90, P=0.045).

7.5 DISCUSSION

The Mennonite *LCT-13910**C>T allelic and genotypic frequencies agreed with those found by Boschmann et al [6]. As expected, the frequency of LP in Mennonites (89.5%) did not differ from that of Northern European-derived populations, reflecting their common origin. More than 90% of individuals in Scandinavia and Netherlands present LP. This frequency decreases across Southern Europe and the Middle East (~50% in Spain, Italy and among pastoralist Arabic populations), and is low in Asia and most of Africa (~1% in Chinese, ~5%–20% in West African agriculturalists) [10]. We confirmed that LP frequency differed between Mennonites and Euro-Brazilians who lived in the same geographic area [6]. The prevalence of LI varies substantially among populations. It is close to 14.8% in Germany and as high as 57% in Euro-Brazilians [8,10]. The C/C genotype is associated with lactose intolerance, but cannot explain most cases of LI symptoms among the Mennonites, which may be explained by the quality of the microbiota and/or other genetic variants.

Table 1: Frequency of LCT *13910C>T (rs4988235) genotypes in the Brazilian Mennonite communities and European populations.

	CON	CWI	CWB	Total	CEU ¹	FIN ¹	GBR ¹	IBS ¹	TSI ¹
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
-13910*C>T	10.1 (16)	10.3 (22)	11.4 (14)	10.5 (52)	7.1 (7)	14.1 (14)	9.9 (9)	31.8 (34)**	84.1 (90)**
C/C	42.1 (67)	48.9 (104)	50.4 (62)	47.1 (233)	38.4 (38)	53.5 (53)	36.3 (33)*	44.9 (48)	14.0 (15)**
C/T	47.8 (76)	40.8 (87)	38.2 (47)	42.4 (210)	54.5 (54)*	32.3 (32)	53.8 (49)	23.4 (25)**	1.9 (2)**
Lactase persistence (C/T and T/T)	89.9 (143)	89.7 (191)	88.6 (109)	89.5 (443)	92.92 (92)	85.85 (85)	90.10 (82)	68.22 (73)**	15.88 (17)**
Total	159	213	123	495	99	99	91	107	107

CON: Nova Colony, CWI: Witmarsum Colony, CWB: Curitiba, CEU: Utah residents with Northern and Western ancestry, FIN: Finish in Finland, GBR: British in England and Scotland, IBS: Iberian population in Spain, TSI: Toscani in Italy, n = number of individuals with the evaluated characteristic. P values were calculated with chi-square test. P* < 0.05, P** < 0.001. ¹ Data from the 1,000 Genomes Project.

7.6 REFERENCES

- [1] Ingram CJE, Mulcare CA, Itan Y, Thomas MG, Swallow DM. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Human Genetics* 2009;124:579–91. doi:10.1007/s00439-008-0593-6.
- [2] Ojetti V, Nucera G, Migneco A, Gabrielli M, Lauritano C, Danese S, et al. High prevalence of celiac disease in patients with lactose intolerance. *Digestion* 2005;71:106–10. doi:10.1159/000084526.
- [3] Olds LC, Sibley E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: Functional role as a cis regulatory element. *Human Molecular Genetics* 2003;12:2333–40. doi:10.1093/hmg/ddg244.
- [4] Gerbault P. The onset of lactase persistence in Europe. *Human Heredity* 2014;76:154–61. doi:10.1159/000360136.
- [5] Lopes FL, Hou L, Boldt ABW, Kassem L, Alves V, Nardi A, et al. Finding Rare, Disease-Associated Variants in Isolated Groups: Potential Advantages of Mennonite Populations. *Human Biology* 2016;88:109–20.
- [6] Boschmann SE, Boldt AB, de Souza IR, Petzl-Erler ML, Messias-Reason IJ. The Frequency of the LCT*-13910C>T Polymorphism Associated with Lactase Persistence Diverges among Euro-Descendant Groups from Brazil. *Medical Principles and Practice* 2016;25:18–20. doi:10.1159/000440807.
- [7] Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3 . 5 : a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 2010;10:564–7. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- [8] Mattar R, Monteiro MS, Villares CA, Santos AF, Silva JMK, Carrilho FJ. Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. *Nutrition Journal* 2009;8:1–3. doi:10.1186/1475-2891-8-46.
- [9] Friedrich DC, Santos SEB, Ribeiro-dos-Santos ÂKC, Hutz MH. Several Different Lactase Persistence Associated Alleles and High Diversity of the Lactase Gene in the Admixed Brazilian Population. *PLoS ONE* 2012;7:1–8. doi:10.1371/journal.pone.0046520.
- [10] Swallow DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual Review of Genetics* 2003;37:197–219. doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.143820.

8 CAPÍTULO IV

Lack of association between *LCT_rs140433552*CA>del* indel polymorphism and lactose intolerance in a Southern Brazilian population³

Luana Caroline Oliveira^{1,2}, Andrey Lucas Dias Barros², Angelica Beate Winter Boldt^{1,2}, Gabriel Adelman Cipolla^{1,2}.

¹ Postgraduate Program in Genetics, Department of Genetics, Federal University of Paraná (UFPR), 81530-900, Curitiba, Paraná State, Brazil. ² Laboratory of Human Molecular Genetics, Department of Genetics, UFPR, Curitiba, Paraná State, Brazil.

Running head: The 3'UTR indel of the lactase gene and lactose intolerance

8.1 ABSTRACT

Background/Aims: Polymorphisms in the enhancer of the lactase gene (*LCT*) are strongly associated with lactase persistence, but not always predictive of the phenotype. We investigated a possible association between the regulatory *rs140433552*CA>del* variant of *LCT* and lactose intolerance (LI). *Methods:* We genotyped 122 individuals for *rs140433552* and *rs4988235* (*-13910*C>T*). *Results:* Associations of *rs140433552*CA>del* with LI depend on *-13910*C>T*. Homozygous individuals for the C-CA haplotype, and C-CA+/C individuals seem more likely to manifest LI (OR=3.33 [95%CI=1.32-8.35], P=0.011; OR=3.93 [95%CI=1.61-9.61], P=0.003, respectively), while homozygous individuals for the T-CA haplotype, to be lactose-tolerant (OR=0.04 [95%CI=0.002-0.70], P=8x10⁻⁴). *Conclusions:* *rs140433552*CA>del* isn't independently associated with LI.

Keywords: *rs140433552*CA>del*, indel, 3' untranslated region, *LCT*, haplotypes, lactose intolerance, genetic susceptibility

³ Este artigo foi adaptado para compor a tese de doutorado. O artigo foi aceito para publicação em 07/05/2020 na revista científica **Lifestyle Genomics** no formato short communication. O periódico publica segundo o Creative Commons.

8.2 INTRODUCTION

Lactase non-persistence (LNP) or primary hypolactasia is the inability to hydrolyze lactose, an abundant disaccharide in milk, resulting in lactose intolerance (LI). This process is genetically programmed and, in most mammals at weaning time, physiological down-regulation of the lactase gene (*LCT*) occurs, resulting in low lactase activity throughout adult life [1]. An evolutionary adaptation allowed certain human groups with ancient history of milk and dairy production and consumption, such as Northern European populations, as well as nomads of Africa and of the Middle East, to digest lactose even in adulthood [1–3], a phenotype named as lactase persistence (LP) or lactose tolerance (LT).

Several single nucleotide polymorphisms (SNP) in a transcriptional enhancer region of *LCT* have been associated with LP. In Northern Europeans, the -13910^*T and -22018^*G alleles located ~ 14 and ~ 22 kb upstream of *LCT*, within introns 9 and 13 of minichromosome maintenance complex component 6 gene (*MCM6*), respectively, are significantly associated with LP [4]. Functional studies have indicated that the -13910^*T allele is the key variant regulating the maintenance of *LCT* expression in Europeans [5]. However, in some cases, $-13910^*C>T$ genotypes are not strictly predictive of the phenotype. A physiological change in lactase gene expression occurs in the context of a stable DNA sequence, suggesting the presence of other dynamic mediators of *LCT* regulation [6].

The 3' untranslated region (3'UTR) is in general considered to be an important sequence for posttranscriptional regulation of gene expression by harboring microRNA (miRNA) targeting sites [7]. In turn, miRNA are small, non-coding RNA molecules that bind to the 3'UTR to direct messenger RNA degradation or translational inhibition, therefore acting as negative regulators of gene expression [8]. Hence, genetic polymorphisms in the 3'UTR of genes may affect gene expression by creating new or disturbing original miRNA binding sites [9]. The rs140433552 is a 2-bp indel located in the 3'UTR of *LCT*. According to software PolymiRTS [10], this indel may disrupt binding of two miRNA (hsa-miR-4731-3p and hsa-miR-4801) in transcripts harboring the deletion. In functional terms, this deletion could contribute to a higher expression of *LCT*. In the present study, we aimed

to investigate, for the first time, an association between rs140433552 polymorphism and LI in a population of European descendants from Southern Brazil.

8.3 MATERIAL AND METHODS

8.3.1 Research participants

For this study, a total of 43 lactose intolerant individuals (LI group; 32 women:11 men aged 18-71 years) and 79 lactose tolerant individuals (LT group; 49 women:30 men aged 14-74 years) were included. Data for both groups were collected through interviews and medical records. Inclusion criteria were: written informed consent; and European ancestry determined by physical characteristics, in agreement with self-reported ancestry. Specifically for LI, we only included individuals with gastrointestinal symptoms and an negative result for the lactose tolerance test. This test measures the blood glucose levels immediately before and four times, at predefined time intervals, after oral administration of lactose, with a maximum rise of 20 mg/dL at any timepoint within 2 hours, indicating lactose intolerance (i.e., an negative result) [11]. Exclusion criteria were: consanguinity with any individual from either group; disagreement between inferred and self-reported ancestries; and, specifically for LT, familial history of LI.

8.3.2 LCT genotyping

Blood was collected in tubes containing the anticoagulant EDTA, and genomic DNA was extracted from whole blood according to the Wizard[®] Genomic DNA Purification kit protocol (Promega, Madison, WI, USA). The *rs140433552*CA>del* genotype was identified using PCR-SSP, with allele-specific forward primers. For the amplification of a 212 bp fragment, we used the following primers: forward primers *rs140433552*CA* (5'-CTGCTGTTTTATTTTCTGGAAAACAC-3') and *rs140433552*del* (5'-CTGCTGTTTTATTTTCTGGAAAACAA-3'), and reverse primer *140433552_rev* (5'-GGTCTAGTGGGTCTGTGAACC-3'). All PCR co-amplified a fragment of 431 bp of Human Growth Hormone gene (*HGH*) as an overall control for amplification (forward primer 5'-TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA-3' and reverse primer 5'-CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC-3'). All reactions were carried out in a final volume of 8µL, containing 20ng of genomic DNA, 0.15mM of each *HGH* primer, 0.3mM of each *rs140433552* primer, 0.2mM of each dNTP and 1x Coral Buffer (Invitrogen Life

Technologies, Carlsbad, USA). Thermal cycling began with 94°C for 2min, followed by a touchdown strategy (7 cycles at 65°C, 15 at 63°C and 7 at 61°C) on an Eppendorf Mastercycler EP Gradient 96 well Thermal Cycler (Hamburg, Germany). Amplified fragments were run on 1.5% agarose gel, stained with UniSafe Dye (Uniscience, Sao Paulo, Brazil). To better characterize the sample, we also performed genotyping for *rs4988235**C>T (-13910*C>T). This variation is strongly associated with LP in European populations. Sequence-specific primers and PCR-SSP conditions for this SNP were based on Boschmann et al. [12].

8.3.3 Statistical and bioinformatic analysis

We obtained allelic, genotypic and haplotypic frequencies by direct counting, and tested the hypothesis of Hardy-Weinberg equilibrium by the exact test of Guo & Thompson. We reconstructed extended haplotypes based on linkage disequilibrium (LD) with Haploview 4.2. We further compared the distribution of alleles, genotypes and haplotypes among LI and LT groups using the Fisher's exact test in the online software VassarStats. The odds ratio (OR) was calculated with a 95% confidence interval. P values lower than 0.05 were considered significant.

8.4 RESULTS

A total of 122 individuals were genotyped for *rs140433552**CA>del, and for *rs4988235**C>T, the main LI-associated variant. Genotypic distributions in both groups were in agreement with those predicted under Hardy-Weinberg equilibrium. The allelic and genotypic frequencies of *rs140433552**CA>del in our LI group were similar to the Iberian and British populations from the 1,000 Genomes Project [13]. We did not find evidence of association between LI and *rs140433552* alleles or genotypes (Table 1).

According to the prediction algorithm PolymiRTS, the 2-bp deletion in the context of *rs140433552* disrupts the binding site of two miRNA. This could contribute to and be associated with continued lactase enzyme expression in individuals with the C/C genotype who are lactose tolerant. In order to test if such 2-bp deletion could account in part for LT, we compared allelic and genotypic frequencies only among individuals with the *rs4988235**C/C genotype. Thirty lactose intolerant individuals and 25 lactose tolerant individuals with *rs4988235**C/C genotype were included. However, we did not observe

any statistically significant differences between LI and LT groups for the frequencies of *rs140433552*del* homozygotes or carriers (OR=2.66 [95%CI=0.25-27.38], P=0.94; OR=0.66 [95%CI=0.38-2.31], P=1, respectively) (Table 1).

We also tested for the association of *rs4988235* and *rs140433552* haplotypes with LI (Table 2). There was an association when evaluating both investigated polymorphisms. Homozygous individuals for the C-CA haplotype and C-CA+/C individuals are more likely to be lactose intolerant (OR=3.33 [95%CI=1.32-8.35], P=0.011; OR=3.93 [95%CI=1.61-9.61], P=0.003, respectively), while homozygous individuals for the T-CA haplotype to be lactose tolerant (OR=0.04 [95%CI=0.002-0.70], P=8x10⁻⁴).

8.5 DISCUSSION

It is well accepted that lactase gene expression is primarily regulated at the transcriptional level [6], and that the *rs4988235* is associated with LP in people of European ancestry [3]. However, in some cases, these genotypes are not truly predictive of the phenotype. In the present study, we hypothesized that *rs140433552*CA>del*, located in the 3'UTR of *LCT*, could be associated with LI, given its potential to disrupt a miRNA targeting site and, therefore, interfere with enzyme levels.

Genetic polymorphisms in the 3'UTR of genes have been shown to significantly affect gene expression, creating new or disrupting original miRNA binding sites. These polymorphisms may mimic loss of function mutations, or even increase gene expression or change its timing/location [9]. The *rs140433552*del* allele has been predicted to disrupt the binding of two miRNA (*hsa-miR-4731-3p* and *hsa-miR-4801*) at their original binding sites.

However, no evidence of association between LI and alleles or genotypes of *rs140433552* was observed. Likewise, we found no association when analyzing whether *rs140433552*del* is associated with LT among individuals with the *rs4988235*C/C* genotype. Nonetheless, homozygous individuals for the C-CA haplotype, as well as C-CA+/C individuals seem more likely to manifest the LI trait. Considering that homozygous individuals for the T-CA haplotype seem more prone to manifest LT, it is reasonable to suggest that *rs140433552* doesn't play a major role in the trait, since the CA allele is

present in both haplotypes of contrasting effects. Analyzes evaluating the relationship between these haplotypes and enzyme levels could deliver another degree of evidence to our findings.

Our study is the first to address rs140433552 in the context of LI. This 3'UTR indel polymorphism of *LCT* is not independently associated with this phenotype in our sample. However, studies with larger groups and of different ethnicities are necessary to better explore the role of *rs140433552*CA>del* in LI, if any. Moreover, approaches exploring the functional role of this polymorphism on *LCT* expression could help understand its physiological relevance in LNP.

Table 1 - Association of *LCT* variants with lactose intolerance.

	LNP group (n = 43)		LP group (n = 79)		OR	CI	P
	n	%	n	%			
<i>rs140433552*CA>del</i>							
CA	60	69.8	125	79.1	0.60	0.33-1.10	0.118
CA/CA	20	46.5	47	59.5	0.59	0.28-1.25	0.186
CA/del	20	46.5	31	39.2	1.34	0.63-2.85	0.449
del/del	3	7.0	1	1.3	5.85	0.58-58.06	0.125
CA+	40	93.0	78	98.7	0.17	0.01-1.69	0.125
del+	23	53.5	32	40.5	1.69	0.79-3.57	0.186
<i>rs4988235*C>T</i>							
C	73	84.9	87	55.1	4.58	2.34-8.93	2x10⁻⁶
CC	30	69.8	25	31.7	4.98	2.22-11.15	6x10⁻⁵
CT	13	30.2	37	46.8	0.49	0.22-1.08	0.086
TT	0	0	17	21.5	0.04	0.002-0.70	8x10⁻⁴
C+	43	100	62	78.5	24.36	1.42-415.98	8x10⁻⁴
T+	13	30.2	54	68.4	0.20	0.08-0.44	6x10⁻⁵
	LNP group <i>rs4988235*C/C</i> (n=30)		LP group <i>rs4988235*C/C</i> (n=25)		OR	CI	P
	n	%	n	%			
CA	41	68.3	34	68.0	1.01	0.45-2.27	1
CA/CA	14	46.7	10	40.0	1.17	0.41-3.36	0.795
CA/del	13	43.3	14	56.0	0.42	0.20-1.75	0.421
del/del	3	10.0	1	4.0	2.66	0.25-27.38	0.617
CA+	27	90.0	24	96.0	1.05	0.43-2.57	1
del+	19	31.7	16	32.0	0.84	0.29-3.36	0.795

LEGEND: all genotype distributions are in agreement with Hardy-Weinberg equilibrium; LNP, lactose non-persistence; LP, lactose persistence; n, number of individuals; OR, odds ratio by binary logistic regression; CI, confidence interval; P, p value. NOTE: bold values indicate statistical significance at $P < 0.05$.

Table 2 - Association of *LCT* haplotypes with lactose intolerance.

Haplotypes	LNP group (n = 43)		LP group (n = 79)		OR	CI	P
	n	%	n	%			
C-CA/ C-CA	14	32.6	10	12.7	3.33	1.32-8.35	0.011
C-del/ C-CA	13	30.2	14	17.7	2.01	0.84-4.80	0.169
C-del/ C-del	3	7.0	1	1.3	5.85	0.58-58.06	0.125
C-CA/ T-CA	6	13.9	20	25.3	0.47	0.17-1.30	0.170
C-del/ T-CA	7	16.3	17	21.5	0.70	0.26-1.87	0.634
T-CA/ T-CA	0	0.0	17	21.5	0.04	0.002-0.70	8x10⁻⁴
C-CA+/ C	27	72.9	24	40.7	3.93	1.61-9.61	0.003
C-del+/ C	16	44.4	15	24.2	2.50	1.04-6.02	0.045

LEGEND: LNP, lactose non-persistence; LP, lactose persistence; n, number of individuals; OR, odds ratio; CI, confidence interval; P, p value. NOTE: bold values indicate statistical significance at $P < 0.05$. Analyses were performed using the sum of all other haplotypes as a reference. Haplotypes represented two investigated *LCT* variants (*rs4988235* and *rs140433552*).

8.6 REFERENCES

1. Ingram CJE, Mulcare CA, Itan Y, Thomas MG, Swallow DM. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Human Genetics*. 2009;124(6):579–91.
2. Swallow DM. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual review of genetics*. 2003;37:197–219.
3. Itan Y, Jones BL, Ingram CJ, Swallow DM, Thomas MG. A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. *BMC Evolutionary Biology* [Internet]. 2010;10(1):36. Available from: <http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-10-36>
4. Enattah NS, Sahi T, Savilahti E, Terwilliger JD, Peltonen L, Järvelä I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature Genetics*. 2002;30(2):233–7.
5. Lewinsky RH, Jensen TGK, Møller J, Stensballe A, Olsen J, Troelsen JT. T-13910 DNA variant associated with lactase persistence interacts with Oct-1 and stimulates lactase promoter activity in vitro. *Human Molecular Genetics*. 2005;14(24):3945–53.
6. Leseva MN, Grand RJ, Klett H, Boerries M, Busch H, Binder AM, et al. Differences in DNA Methylation and Functional Expression in Lactase Persistent and Non-persistent Individuals. *Scientific Reports*. 2018;8(1):1–14.
7. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* [Internet]. 2009 Jan;136(2):215–33. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409000087>
8. Kim DH, Sætrom P, Snøve O, Rossi JJ. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(42):16230–5.
9. Henrichsen CN, Chaignat E, Reymond A. Copy number variants, diseases and gene expression. *Human Molecular Genetics*. 2009;18(R1):1–8.
10. Bhattacharya A, Ziebarth JD, Cui Y. PolymiRTS Database 3.0: Linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(D1):86–91.
11. Arola H. Diagnosis of hypolactasia and lactose malabsorption. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 1994;29(S202):26–35.
12. Boschmann SE, Boldt AB, de Souza IR, Petzl-Erler ML, Messias-Reason IJ. The Frequency of the LCT*-13910C>T Polymorphism Associated with Lactase Persistence Diverges among Euro-Descendant Groups from Brazil. *Medical Principles and Practice*. 2016;25(1):18–20.
13. Sudmant PH, Rausch T, Gardner EJ, Handsaker RE, Abyzov A, Huddleston J,

et al. An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature*. 2015;526(7571):75–81.

9 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foi possível descrever, pela primeira vez e de forma ampla, o perfil epidemiológico de uma população menonita latino-americana. A elaboração deste perfil seguiu a mesma estratégia da PNS 2013, permitindo comparações com a população brasileira. Devido a expansão realizada na sua paleta de perguntas, também permitiu informar sobre ancestralidade e agregação familiar de doenças complexas, questões não avaliadas pela PNS 2013. O perfil epidemiológico de características biométricas e de doenças complexas de fato diferiu entre as populações menonita e brasileira, especialmente para a prevalência da depressão, problemas de coluna, câncer de pele não melanoma, doenças da tireoide, intolerância a lactose e doença celíaca. Houve associação entre fatores de risco já relatados na literatura com a propensão a doenças crônicas, como IMC elevado com hipertensão arterial, problemas de coluna e distúrbios osteomusculares associados ao trabalho, exposição a fumaças e radiação com câncer em geral e câncer de pele não melanoma, respectivamente, e exposição a fumaças, com doenças respiratórias.

O perfil biométrico, de rota migratória, hábitos alimentares, escolaridade, taxas de miscigenação e de prevalência de certas doenças crônicas diferiu entre as comunidades investigadas, especialmente entre Colônia Nova e as demais colônias. Tal resultado foi inesperado e será objeto de futuras investigações mais detalhadas e de campanhas de conscientização.

A soroprevalência da doença celíaca entre os menonitas sul-brasileiros é de 1:30, sendo uma das mais elevadas já reportadas, mundialmente. Esta prevalência está associada a uma alta frequência de portadores de moléculas HLA-DQ2/DQ8 predisponentes. A frequência de HLA-DQ8 é muito mais alta do que a reportada em pelo menos uma das populações ancestrais menonitas, que na população euro-brasileira, fruto de um possível efeito fundador em sua história demográfica. No entanto, não justifica a alta prevalência da DC, indicando a existência de outras variantes genéticas, epigenéticas, microbiota protetora ainda a serem descobertas.

A persistência da lactase é um fenótipo muito mais frequente em menonitas, que na população euro-brasileira, assemelhando-se a populações norte-europeias. A intolerância a lactose em menonitas está associada a ausência do alelo *LCT*⁻¹³¹⁹⁰ T*, porém o genótipo *C/C* não explica a maior parte dos sintomas gastrointestinais relatados nos participantes. Alelos do polimorfismo *rs140433552* na região 3'UTR do gene da

lactase não estão associados independentemente, ao fenótipo de persistência da lactase.

É importante ressaltar que este trabalho foi o primeiro a propor investigação genético-epidemiológica de uma população anabatista na América Latina. A própria população já se propôs a continuar colaborando em projetos futuros, através de vários de seus representantes no Brasil. Com a sua continuação, futuros projetos abrirão as portas para expansão a outros países da América do Sul e Central, permitindo beneficiar as populações com novos resultados, desenhos de estratégias mais eficientes de saúde pública e grande avanço do conhecimento científico na área.

10 REFERÊNCIAS

ABADIE, V. et al. Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. **Annual Review of Immunology**, v. 29, n. 1, p. 493–525, 2011.

ALENCAR, M. et al. Prevalence of celiac disease among blood donors in SÃO PAULO – the most populated city in Brazil. **Clinics**, v. 67, n. 9, p. 1013–1018, 10 set. 2012a.

ALENCAR, M. L. et al. Prevalence of celiac disease among blood donors in São Paulo: the most populated city in Brazil. **Clinics (São Paulo, Brazil)**, v. 67, n. 9, p. 1013–8, 2012b.

ALMEIDA, R. et al. Fine mapping of the celiac disease-associated LPP locus reveals a potential functional variant. **Human Molecular Genetics**, v. 23, n. 9, p. 2481–2489, 2014.

AMIRI, M. et al. The diverse forms of lactose intolerance and the putative linkage to several cancers. **Nutrients**, v. 7, n. 9, p. 7209–7230, 2015.

ANJOS, S.; POLYCHRONAKOS, C. Mechanisms of genetic susceptibility to type I diabetes: Beyond HLA. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 81, n. 3, p. 187–195, 2004.

ARCOS-BURGOS, M.; MUENKE, M. Genetics of population isolates. **Clinical Genetics**, v. 61, n. 4, p. 233–247, 27 maio 2002.

ARPAIA, E. et al. Defective T cell receptor signaling and CD8+ thymic selection in humans lacking Zap-70 kinase. **Cell**, v. 76, n. 5, p. 947–958, 1994.

ÅSVOLD, B. O.; VATTEN, L. J.; BJØRO, T. Changes in the prevalence of hypothyroidism: The HUNT study in Norway. **European Journal of Endocrinology**, v. 169, n. 5, p. 613–620, 2013.

BALACI, L. et al. IRAK-M is involved in the pathogenesis of early-onset persistent asthma. **American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 6, p. 1103–1114, 2007.

BARDELLA, M. T. et al. Gluten intolerance: Gender- and age-related differences in symptoms. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 40, n. 1, p. 15–19, 2005.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215–233, jan. 2009.

BASTURK, A.; ARTAN, R.; YILMAZ, A. The incidence of HLA-DQ2/DQ8 in Turkish children with celiac disease and a comparison of the geographical distribution of HLA-DQ. **Gastroenterology Review**, v. 4, n. 4, p. 256–261, 2017.

BECH-HANSEN, N. T. et al. Loss-of-function mutations in a calcium-channel α 1-subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness. **Nature Genetics**, v. 19, n. 3, p. 264–267, jul. 1998.

BEHRENDT, M. et al. Impaired Trafficking and Subcellular Localization of a Mutant Lactase Associated With Congenital Lactase Deficiency. **Gastroenterology**, v. 136, n. 7, p. 2295–2303, 2009.

BENSENOR, I. M. et al. Prevalência de acidente vascular cerebral e de incapacidade associada no Brasil: Pesquisa nacional de saúde - 2013. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 73, n. 9, p. 746–750, 2015

BERGSENG, E. et al. Main chain hydrogen bond interactions in the binding of proline-rich gluten peptides to the celiac disease-associated HLA-DQ2 molecule. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 23, p. 21791–21796, 2005.

BERSAGLIERI, T. et al. Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. **American journal of human genetics**, v. 74, n. 6, p. 1111–20, 2004.

BHATTACHARYA, A.; ZIEBARTH, J. D.; CUI, Y. PolymiRTS Database 3.0: Linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. 86–91, 2014.

BODD, M. et al. HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. **Mucosal immunology**, v. 3, n. 6, p. 594–601, 2010.

BOLDT, A. B. W. et al. Analysis of the CCR5 gene coding region diversity in five South American populations reveals two new non-synonymous alleles in Amerindians and high CCR5*D32 frequency in Euro-Brazilians. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 1, p. 12–19, 2009.

BOMBELLI, M. et al. Impact of body mass index and waist circumference on the long-

term risk of diabetes mellitus, hypertension, and cardiac organ damage. **Hypertension**, v. 58, n. 6, p. 1029–1035, 2011.

BOSCHMANN, S. E. et al. The Frequency of the LCT*-13910C>T Polymorphism Associated with Lactase Persistence Diverges among Euro-Descendant Groups from Brazil. **Medical Principles and Practice**, v. 25, n. 1, p. 18–20, 2016.

BOURGEY, M. et al. HLA related genetic risk for coeliac disease. **Gut**, v. 56, n. 8, p. 1054–1059, 1 ago. 2007.

BOUWHUIS, M. G. et al. Polymorphisms in the CD28/CTLA4/ICOS genes: Role in malignant melanoma susceptibility and prognosis? **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 59, n. 2, p. 303–312, 2010.

BRAYBROOK, C. et al. The T-box transcription factor gene TBX22 is mutated in X-linked cleft palate and ankyloglossia. **Nature Genetics**, v. 29, n. 2, p. 179–183, 2001.

BROWN, G. J. et al. A Phase I Study to Determine Safety, Tolerability and Bioactivity of Nexvax2® in HLA DQ2+ Volunteers With Celiac Disease Following a Long-Term, Strict Gluten-Free Diet. **Gastroenterology**, v. 140, n. 5, p. S-437-S-438, 2011.

BURGER, J. P. W. et al. Rising incidence of celiac disease in the Netherlands; an analysis of temporal trends from 1995 to 2010. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 49, n. 8, p. 933–41, 2014.

CAMPBELL, C. et al. ATM mutations on distinct SNP and STR haplotypes in ataxia-telangiectasia patients of differing ethnicities reveal ancestral founder effects. **Human Mutation**, v. 21, n. 1, p. 80–85, 2003.

CÁRDENAS-ROLDÁN, J.; ROJAS-VILLARRAGA, A.; ANAYA, J. How do autoimmune diseases cluster in families? A systematic review and meta-analysis. **BMC Medicine**, v. 11, n. 1, p. 73, 18 dez. 2013.

CARRENO, B. M.; COLLINS, M. THE B7 FAMILY OF LIGANDS AND ITS RECEPTORS: New Pathways for Costimulation and Inhibition of Immune Responses. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 29–53, 2002.

CASTILLO, N. E.; THEETHIRA, T. G.; LEFFLER, D. A. The present and the future in the diagnosis and management of celiac disease. **Gastroenterology Report**, v. 3, n. 1,

p. 3–11, 2014.

CATASSI, C. et al. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? **The Lancet**, v. 354, n. 9179, p. 647–648, ago. 1999.

CATASSI, C. et al. The distribution of DQ genes in the Saharawi population provides only a partial explanation for the high celiac disease prevalence. **Tissue Antigens**, v. 58, n. 6, p. 402–406, dez. 2001.

CECCAROLI, C. et al. Molecular fingerprints of environmental carcinogens in human cancer. **Journal of Environmental Science and Health - Part C**, v. 33, n. 2, p. 188–228, 2015.

CHAVARRÍA-SILES, I. et al. TGFB-induced factor (TGIF): A candidate gene for psychosis on chromosome 18p. **Molecular Psychiatry**, v. 12, n. 11, p. 1033–1041, 2007.

CHEN, W. et al. Variations in the G6PC2/ABCB11 genomic region are associated with fasting glucose levels. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 7, p. 2620–2628, 1 jun. 2008.

CHEUNG, H. et al. Accessory Protein-Like Is Essential for IL-18-Mediated Signaling. **The Journal of Immunology**, v. 174, n. 9, p. 5351–5357, 2005.

CHIN, S. H. et al. Obesity and pain: a systematic review. **International Journal of Obesity**, 2019.

CHOU, R. et al. Screening for celiac disease: Evidence report and systematic review for the US Preventive Services Task Force. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 317, n. 12, p. 1258–1268, 2017.

CICERONE, C.; NENNA, R.; PONTONE, S. Th17, intestinal microbiota and the abnormal immune response in the pathogenesis of celiac disease. **Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench**, v. 8, n. 2, p. 117–122, 2015.

CICLITIRA, P. J. et al. The pathogenesis of coeliac disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 6, p. 421–458, dez. 2005.

COLANGELO, L. A. et al. Is the Association of Hypertension With Cardiovascular Events Stronger Among the Lean and Normal Weight Than Among the Overweight and Obese?: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. **Hypertension**, v. 66, n. 2, p. 286–293, 2015.

COLLIN, G. B. et al. Mutations in ALMS1 cause obesity, type 2 diabetes and neurosensory degeneration in Alström syndrome. **Nature Genetics**, v. 31, n. 1, p. 74–78, 2002.

COLLIN, P. et al. Dermatitis herpetiformis: a cutaneous manifestation of coeliac disease. **Annals of Medicine**, v. 49, n. 1, p. 23–31, 2017.

CORAZZA, G. R. et al. Comparison of the Interobserver Reproducibility With Different Histologic Criteria Used in Celiac Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 5, n. 7, p. 838–843, jul. 2007.

CSIZMADIA, C. et al. An iceberg of childhood coeliac disease in the Netherlands. **The Lancet**, v. 353, p. 813–814, 1999.

DE VRIES, Y. et al. A dutch fanconi anemia FANCC founder mutation in canadian manitoba mennonites. **Anemia**, v. 2012, 2012.

DOS SANTOS ALVES, G. M.; DE MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. Estado nutricional e teste do hidrogênio no or expirado com lactose e lactulose em crianças indígenas terenas. **Jornal de Pediatria**, v. 78, n. 2, p. 113–119, 2002.

DU PRÉ, M. F.; SOLLID, L. M. T-cell and B-cell immunity in celiac disease. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 29, n. 3, p. 413–423, 2015.

ENATTAH, N. S. et al. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. **Nature Genetics**, v. 30, n. 2, p. 233–237, 2002.

ENGERT, J. C. et al. Identification of a chromosome 8p locus for early-onset coronary heart disease in a French Canadian population. **European Journal of Human Genetics**, v. 16, n. 1, p. 105–114, 2008.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. . Arlequin suite ver 3 . 5 : a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, p. 564–567, 2010.

FAIRWEATHER, D.; FRISANCHO-KISS, S.; ROSE, N. R. Sex Differences in Autoimmune Disease from a Pathological Perspective. **The American Journal of Pathology**, v. 173, n. 3, p. 600–609, set. 2008.

FARUP, P. G.; MONSBAKKEN, K. W.; VANDVIK, P. O. Lactose malabsorption in a population with irritable bowel syndrome: prevalence and symptoms. A case-control study. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 39, n. 7, p. 645–649, 2004.

FASANO, A. et al. Prevalence of Celiac Disease in At-Risk and Not-At-Risk Groups in the United States. **Archives of Internal Medicine**, v. 163, n. 3, p. 286, 10 fev. 2003.

FASANO, A.; CATASSI, C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. **Gastroenterology**, v. 120, n. 3, p. 636–651, 2001.

FEERO, W. G.; GUTTMACHER, A. E.; MANOLIO, T. A. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 2, p. 166–176, 2010.

FERRAND, A. et al. Biochemical and Hematologic Manifestations of Gastric Intrinsic Factor (GIF) Deficiency: A Treatable Cause of B12 Deficiency in the Old Order Mennonite Population of Southwestern Ontario. In: **JIMD Reports**. [s.l: s.n.]. v. 1p. 69–77.

FLATZ, G. et al. Distribution of physiological adult lactase phenotypes, lactose absorber and malabsorber, in Germany. **Human Genetics**, v. 62, n. 2, p. 152–157, 1982.

FREEMAN, H. J. Risk factors in familial forms of celiac disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 16, n. 15, p. 1828, 2010.

FRIEDRICH, D. C. et al. Several Different Lactase Persistence Associated Alleles and High Diversity of the Lactase Gene in the Admixed Brazilian Population. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–8, 2012.

GAN-OR, Z. et al. Genotype-phenotype correlations between GBA mutations and Parkinson disease risk and onset. **Neurology**, v. 70, n. 24, p. 2277–2283, 10 jun. 2008.

GANDOLFI, L. et al. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. **American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 3, p. 689–692, 2000.

GENDREL, D. et al. Influence of Intestinal Parasitism on Lactose Absorption in Well-Nourished African Children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 2, p. 137–140, 1 fev. 1992.

GERBAULT, P. The onset of lactase persistence in Europe. **Human Heredity**, v. 76, n. 3–4, p. 154–161, 2014.

GIBSON, G. Rare and common variants: twenty arguments. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 2, p. 135–145, 2012.

GIERSIEPEN, K. et al. Accuracy of diagnostic antibody tests for coeliac disease in children: Summary of an evidence report. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 54, n. 2, p. 229–241, 2012.

GOEL, G. et al. Epitope-specific immunotherapy targeting CD4-positive T cells in coeliac disease: two randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 studies. **The Lancet Gastroenterology and Hepatology**, v. 2, n. 7, p. 479–493, 2017.

GOMEZ, J. Prevalence of celiac disease in argentina: screening of an adult population in the La Plata area. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 96, n. 9, p. 2700–2704, set. 2001.

GONZÁLEZ-GALARZA, F. F. et al. Allele frequency net 2015 update: New features for HLA epitopes, KIR and disease and HLA adverse drug reaction associations. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D784–D788, 2015.

GRANT, S. F. A. et al. Variant of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) gene confers risk of type 2 diabetes. **Nature Genetics**, v. 38, n. 3, p. 320–323, 2006.

GRECO, L. The first large population based twin study of coeliac disease. **Gut**, v. 50, n. 5, p. 624–628, 1 maio 2002.

GREEN, P. H. R. et al. Characteristics of adult celiac disease in the USA: Results of a national survey. **American Journal of Gastroenterology**, v. 96, n. 1, p. 126–131, 2001.

GREEN, P. H. R.; CELLIER, C. Celiac disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 35, n. 10, p. 409–415, 2007.

GREEN, P. H. R.; KRISHNAREDDY, S.; LEBWOHL, B. Clinical Manifestations of Celiac Disease. **Digestive Diseases**, v. 33, n. 2, p. 137–140, 22 abr. 2015.

GREEN, P. H. R.; LEBWOHL, B.; GREYWOODE, R. Celiac disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 135, n. 5, p. 1099–1106, maio 2015.

GREENBERG, C. R. et al. A Homoallelic Gly317 → Asp Mutation in ALPL Causes the Perinatal (Lethal) Form of Hypophosphatasia in Canadian Mennonites. **Genomics**, v. 17, n. 1, p. 215–217, jul. 1993.

GUANDALINI, S.; ASSIRI, A. Celiac Disease. **JAMA Pediatrics**, v. 168, n. 3, p. 272, 2014.

GUDBJARTSSON, D. F. et al. Variants conferring risk of atrial fibrillation on chromosome 4q25. **Nature**, v. 448, n. 7151, p. 353–357, 2007.

GUDBJARTSSON, D. F. et al. Many sequence variants affecting diversity of adult human height. **Nature Genetics**, v. 40, n. 5, p. 609–615, 2008.

GUDMUNDSSON, J. et al. Two variants on chromosome 17 confer prostate cancer risk, and the one in TCF2 protects against type 2 diabetes. **Nature Genetics**, v. 39, n. 8, p. 977–983, 2007.

GUDMUNDSSON, J. et al. Common sequence variants on 2p15 and Xp11.22 confer susceptibility to prostate cancer. **Nature Genetics**, v. 40, n. 3, p. 281–283, 2008.

GUJRAL, N. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 42, p. 6036, 2012.

GUO, C. C. et al. polymorphisms and risk of celiac disease : a meta-analysis. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 4, p. 13221–13235, 2015.

GUTIERREZ-ACHURY, J. et al. Contrasting the Genetic Background of Type 1 Diabetes and Celiac Disease Autoimmunity. **Diabetes Care**, v. 38, n. Supplement 2, p. S37–S44, 2015.

HÄNDEL, N. et al. Will the Real Coeliac Disease Please Stand Up? Coeliac Disease Prevalence in the German LIFE Child Study. **Journal of Pediatric Gastroenterology**

and Nutrition, v. 67, n. 4, p. 494–500, out. 2018.

HARIZ, M. BEN et al. Celiac disease in tunisian children: A second screening study using a “new generation” rapid test. **Immunological Investigations**, v. 42, n. 4, p. 356–368, 2013.

HARPER, J. W. et al. Anemia in celiac disease is multifactorial in etiology. **American Journal of Hematology**, v. 82, n. 11, p. 996–1000, nov. 2007.

HARRINGTON, L. K.; MAYBERRY, J. F. A re-appraisal of lactose intolerance. **International Journal of Clinical Practice**, v. 62, n. 10, p. 1541–1546, 2008.

HARRIS, L. A. et al. Celiac disease: Clinical, endoscopic, and histopathologic review. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 76, n. 3, p. 625–640, 2012.

HATZIKOTOULAS, K.; GILLY, A.; ZEGGINI, E. Using population isolates in genetic association studies. **Briefings in Functional Genomics**, v. 13, n. 5, p. 371–377, 2014.

HAYAT, M. et al. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human duodenum: what is normal? **Journal of Clinical Pathology**, v. 55, n. 5, p. 393–394, 1 maio 2002.

HEIJMANS, B. T. et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 44, p. 17046–17049, 2008.

HELGADOTTIR, A. et al. The gene encoding 5-lipoxygenase activating protein confers risk of myocardial infarction and stroke. **Nature Genetics**, v. 36, n. 3, p. 233–239, 2004.

HELGADOTTIR, A. et al. A Common Variant on Chromosome 9p21 Affects the Risk of Myocardial Infarction. **Science**, v. 316, n. 5830, p. 1491–1493, 8 jun. 2007.

HELGADOTTIR, A. et al. The same sequence variant on 9p21 associates with myocardial infarction, abdominal aortic aneurysm and intracranial aneurysm. **Nature Genetics**, v. 40, n. 2, p. 217–224, 2008.

HELGASON, A. et al. A reassessment of genetic diversity in Icelanders: Strong evidence from multiple loci for relative homogeneity caused by genetic drift. **Annals of**

Human Genetics, v. 67, n. 4, p. 281–297, 2003.

HENDERSON, K. N. et al. The production and crystallization of the human leukocyte antigen class II molecules HLA-DQ2 and HLA-DQ8 complexed with deamidated gliadin peptides implicated in coeliac disease. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, v. 63, n. 12, p. 1021–1025, 2007.

HENRICHSEN, C. N.; CHAIGNAT, E.; REYMOND, A. Copy number variants, diseases and gene expression. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. R1, p. 1–8, 2009.

HERZBERG, I. et al. Convergent linkage evidence from two Latin-American population isolates supports the presence of a susceptibility locus for bipolar disorder in 5q31-34. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 21, p. 3146–3153, 2006.

HILL, I. D. et al. Guideline for the Diagnosis and Treatment of Celiac Disease in Children : Recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, p. 1–19, 2005.

HOERTER, N. A. et al. Diagnostic Yield of Isolated Deamidated Gliadin Peptide Antibody Elevation for Celiac Disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 62, n. 5, p. 1272–1276, 2017.

HÖGBERG, L. et al. Familial Prevalence of Coeliac Disease: a Twenty-Year Follow-up Study. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 38, n. 1, p. 61–65, 8 jan. 2003.

HOLDEN, C.; MACE, R. Phylogenetic analysis of the evolution of lactose digestion in adults. **Human biology; an international record of research**, v. 69, n. 5, p. 605–628, 1997.

HOU, L. et al. A population-specific reference panel empowers genetic studies of Anabaptist populations. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 6079, 20 dez. 2017.

HOVELL, C. J. et al. High prevalence of coeliac disease in a population-based study from Western Australia: A case for screening? **Medical Journal of Australia**, v. 175, n. 5, p. 247–250, 2001.

HUNT, K. et al. Novel celiac disease genetic determinants related to the immune response. **Nature**, v. 40, n. 4, p. 395–402, 2008.

HUNT, K. A. et al. Negligible impact of rare autoimmune-locus coding-region variants on missing heritability. **Nature**, v. 498, n. 7453, p. 232–235, 2013.

HUNT, K. A. et al. A common CTLA4 haplotype associated with coeliac disease. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 13, n. 4, p. 440–4, 2005.

HUNTSMAN, R. J. et al. Atypical presentations of leigh syndrome: A case series and review. **Pediatric Neurology**, v. 32, n. 5, p. 334–340, 2005.

HUSBY, S. et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 136–160, jan. 2012.

INGRAM, C. J. E. et al. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. **Human Genetics**, v. 124, n. 6, p. 579–591, 2009.

INSITUT RK, E. V. G. Cancer in Germany [Krebs in Deutschland]. **Berlin: Robert Koch Insitut, Gesellschaft der epidemiologischecn Krebsregister in Deutschland**, p. 2013, 2013.

ITAN, Y. et al. A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. **BMC Evolutionary Biology**, v. 10, n. 1, p. 36, 2010.

JAWORSKI, M. A. et al. Unusual clustering of diseases in a Canadian Old Colony (Chortitza) Mennonite kindred and community. **CMAJ: Canadian Medical Association journal**, v. 138, n. 11, p. 1017–25, 1 jun. 1988.

JAWORSKI, M. A. et al. Inherited diseases in North American Mennonites: Focus on old colony (Chortitza) Mennonites. **American Journal of Medical Genetics**, v. 32, n. 2, p. 158–168, fev. 1989.

JOHNSTON, S. D. et al. Coeliac disease detected by screening is not silent - simply unrecognized. **QJM - Monthly Journal of the Association of Physicians**, v. 91, n. 12, p. 853–860, 1998.

KAGIMOTO, K. et al. Identification of a common molecular basis for combined 17 α -hydroxylase/17,20-lyase deficiency in two Mennonite families. **Human Genetics**, v. 82, n. 3, p. 285–286, 1989.

KARELL, K. et al. Hla types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the european genetics cluster on celiac disease. **Human Immunology**, v. 64, n. 4, p. 469–477, abr. 2003.

KASAIAN, M. T. et al. IL-21 Limits NK Cell Responses and Promotes Antigen-Specific T Cell Activation A Mediator of the Transition from Innate to Adaptive Immunity. **Immunity**, v. 16, p. 559–569, 2002.

KELLY, C. P. et al. Larazotide acetate in patients with coeliac disease undergoing a gluten challenge: A randomised placebo-controlled study. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 37, n. 2, p. 252–262, 2013.

KIM, D. H. et al. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 42, p. 16230–16235, 2008.

KOMULAINEN, K. et al. Risk alleles of USF1 gene predict cardiovascular disease of women in two prospective studies. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 5, p. 672–681, 2006.

KORPONAY-SZABÓ, I. R. et al. Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for coeliac disease in selective IgA deficiency. **Gut**, v. 52, n. 11, p. 1567–1571, 2003.

KOSKINEN, L. L. E. et al. Association study of the IL18RAP locus in three European populations with coeliac disease. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 6, p. 1148–1155, 2009.

KOTZE, L. M. D. S. Celiac disease in Brazilian patients: associations, complications and causes of death. Forty years of clinical experience. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 4, p. 261–269, dez. 2009.

KOTZE, L. M. DA S. et al. Antiendomysium antibodies in brazilian patients with celiac disease and their first-degree relatives. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 94–103, abr. 2001.

KOTZE, L. M. DA S. et al. Absence of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 does not exclude celiac disease in Brazilian patients. **Rev Esp Enferm Dig (Madrid)**, v. 106, n. 8, p. 561–562, 2014.

KRATZER, W. Prevalence of celiac disease in Germany: A prospective follow-up study. **World Journal of Gastroenterology**, v. 19, n. 17, p. 2612, 2013.

KRICKER, A.; ARMSTRONG, B. K.; ENGLISH, D. R. Sun exposure and non-melanocytic skin cancer. **Cancer Causes & Control**, v. 5, n. 4, p. 367–392, 1994.

KRISTIANSSON, K.; NAUKKARINEN, J.; PELTONEN, L. Isolated populations and complex disease gene identification. **Genome Biology**, v. 9, n. 8, p. 1–9, 2008.

KUMAR, V.; WIJMENGA, C.; WITHOFF, S. From genome-wide association studies to disease mechanisms: Celiac disease as a model for autoimmune diseases. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 4, p. 567–580, 2012.

KUOKKANEN, M. et al. Mutations in the translated region of the lactase gene (LCT) underlie congenital lactase deficiency. **American Journal of Human Genetics**, v. 78, n. 2, p. 339–344, 2006.

LABRIE, V. et al. Lactase nonpersistence is directed by DNA-variation-dependent epigenetic aging. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 23, n. 6, p. 566–573, 9 jun. 2016.

LÄHDEAHO, M. L. et al. Glutenase ALV003 attenuates gluten-induced mucosal injury in patients with celiac disease. **Gastroenterology**, v. 146, n. 7, p. 1649–1658, 2014.

LAITINEN, T. Characterization of a Common Susceptibility Locus for Asthma-Related Traits. **Science**, v. 304, n. 5668, p. 300–304, 9 abr. 2004.

LAUER, K. Divergent risk of multiple sclerosis in two anabaptist communities in America. **Medical Hypotheses**, v. 67, n. 4, p. 969–974, 2006.

LAW, D.; CONKLIN, J.; PIMENTEL, M. Lactose intolerance and the role of the lactose breath test. **American Journal of Gastroenterology**, v. 105, n. 8, p. 1726–1728, 2010.

LEFFLER, D. A. et al. Larazotide acetate for persistent symptoms of celiac disease despite a gluten-free diet: A randomized controlled trial. **Gastroenterology**, v. 148, n. 7, p. 1311–1319.e6, 2015.

LEFFLER, D. A.; SCHUPPAN, D. Update on serologic testing in celiac disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 105, n. 12, p. 2520–2524, 2010.

LEITER, U. et al. Incidence, Mortality, and Trends of Nonmelanoma Skin Cancer in Germany. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 137, n. 9, p. 1860–1867, 2017.

LENSKI, C. et al. Novel Truncating Mutations in the Polyglutamine Tract Binding Protein 1 Gene (PQBP1) Cause Renpenning Syndrome and X-Linked Mental Retardation in Another Family with Microcephaly. **The American Journal of Human Genetics**, v. 74, n. 4, p. 777–780, abr. 2004.

LESEVA, M. N. et al. Differences in DNA Methylation and Functional Expression in Lactase Persistent and Non-persistent Individuals. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2018.

LEWINSKY, R. H. et al. T-13910 DNA variant associated with lactase persistence interacts with Oct-1 and stimulates lactase promoter activity in vitro. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 24, p. 3945–3953, 2005.

LEWIS, N. R.; SCOTT, B. B. Systematic review: The use of serology to exclude or diagnose coeliac disease (a comparison of the endomysial and tissue transglutaminase antibody tests). **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, n. 1, p. 47–54, 2006.

LEWIS, N. R.; SCOTT, B. B. Meta-analysis: Deamidated gliadin peptide antibody and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for coeliac disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 31, n. 1, p. 73–81, 2010.

LINDFORS, K. et al. Coeliac disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 3, 10 dez. 2019.

LIONETTI, E.; CATASSI, C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. **International Reviews of Immunology**, v. 30, n. 4, p. 219–231, 2011.

LIU, E.; REWERS, M.; EISENBARTH, G. S. Genetic testing: Who should do the testing and what is the role of genetic testing in the setting of celiac disease? **Gastroenterology**, v. 128, n. 4, p. S33–S37, abr. 2005.

LOMER, M. C. E.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. Review article: Lactose intolerance in clinical practice - Myths and realities. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 27, n. 2, p. 93–103, 2008.

LOPES, F. L. et al. Finding Rare, Disease-Associated Variants in Isolated Groups: Potential Advantages of Mennonite Populations. **Human Biology**, v. 88, n. 2, p. 109–120, 2016.

LOTUFO, P. A. et al. Prevalência de angina do peito pelo questionário de rose na população Brasileira: Análise da pesquisa nacional de saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 123–131, 2015.

LUDVIGSSON, J. F. et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. **Gut**, v. 62, n. 1, p. 43–52, jan. 2013.

MADARIAGA, A. G. et al. The incidence and prevalence of thyroid dysfunction in Europe: A meta-analysis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 99, n. 3, p. 923–931, 2014.

MAGISTRELLI, G. et al. A soluble form of CTLA-4 generated by alternative splicing is expressed by nonstimulated human T cells. **European Journal of Immunology**, v. 29, n. 11, p. 3596–3602, 1999.

MAITI, A. K. et al. Confirmation of an association between rs6822844 at the IL2-IL21 region and multiple autoimmune diseases: Evidence of a general susceptibility locus. **Arthritis and Rheumatism**, v. 62, n. 2, p. 323–329, 2010.

MAKHARIA, G. K. et al. Prevalence of celiac disease in the northern part of India: A community based study. **Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)**, v. 26, n. 5, p. 894–900, 2011.

MAKI, M. et al. Prevalence of celiac disease among children in Finland. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 2517–2524, 2003.

MALAMUT, G. et al. IL-15 trigger an antiapoptotic pathway in human intraepithelial lymphocytes that is a potential new target in celiac disease-associated inflammation and lymphomagenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 6, p. 2131–2143, 2010.

MALTA, D. C. et al. Tendência de fumantes na população Brasileira segundo a pesquisa nacional de amostra de domicílios 2008 e a pesquisa nacional de saúde 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 45–56, 2015a.

MALTA, D. C. et al. Cuidado em saúde em adultos com hipertensão arterial autorreferida no Brasil segundo dados da pesquisa nacional de saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 109–122, 2015b.

MALTA, D. C. et al. A vigilância e o monitoramento das principais doenças crônicas não transmissíveis no Brasil – pesquisa nacional de saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 3–16, 2015c.

MALTA, D. C.; SZWARCOWALD, C. L. Estilos de vida e doenças crônicas não transmissíveis da população brasileira segundo a pesquisa nacional de saúde: Um balanço dos principais resultados. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 133, n. 4, p. 286–289, 2015a.

MALTA, D. C.; SZWARCOWALD, C. L. Pesquisa Nacional de Saúde e a Saúde Pública Brasileira. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. suppl 2, p. 1–2, dez. 2015b.

MARQUES, A. et al. Prevalence of adult overweight and obesity in 20 European countries, 2014. **European Journal of Public Health**, v. 28, n. 2, p. 295–300, 2018.

MARSH, M. N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A Molecular and Immunobiologic Approach to the Spectrum of Gluten Sensitivity ('Celiac Sprue'). **Gastroenterology**, v. 102, n. 1, p. 330–354, 1992.

MARSH, M. N.; CROWE, P. T. 5 Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity. **Bailliere's Clinical Gastroenterology**, v. 9, n. 2, p. 273–293, 1995.

MATTAR, R. et al. Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. **Nutrition Journal**, v. 8, n. 1, p. 1–3, 2009.

MATTAR, R.; FERRAZ, D.; MAZO, C. Biologia Molecular. **Rev. Assoc Med Bras**, v. 56, n. 2, p. 230–236, 2010.

MATTHEWS, S. B. et al. Systemic lactose intolerance: A new perspective on an old problem. **Postgraduate Medical Journal**, v. 81, n. 953, p. 167–173, 2005.

MCGROGAN, A. et al. The incidence of autoimmune thyroid disease: A systematic review of the literature. **Clinical Endocrinology**, v. 69, n. 5, p. 687–696, 2008.

MCKUSICK, V. A. Mendelian Inheritance in Man and its online version, OMIM. **American Journal of Human Genetics**, v. 80, n. 4, p. 588–604, 2007.

MCMANUS, K. et al. An amino acid substitution in the putative second extracellular loop of RBC band 3 accounts for the Froese blood group polymorphism. **Transfusion**, v. 40, n. 10, p. 1246–1249, out. 2000.

MCMILLAN, S. A. et al. Factors associated with serum antibodies to reticulin, endomysium, and gliadin in an adult population. **Gut**, v. 39, n. 1, p. 43–47, 1996.

MEARIN, M. L. The prevention of coeliac disease. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 29, n. 3, p. 493–501, 2015.

MEGIORNI, F.; PIZZUTI, A. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. **Journal of Biomedical Science**, v. 19, n. 1, p. 1, 2012.

MELO, S. B. C. et al. Prevalence and demographic characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. **Digestive diseases and sciences**, v. 51, n. 5, p. 1020–1025, 2006.

MELTON, P. E. et al. Adaptive dimensions of health research among indigenous Siberians. **American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council**, v. 19, n. 2, p. 165–180, 2006.

MENEZES, A. M. B. et al. Prevalência de diagnóstico médico de asma em adultos brasileiros: Pesquisa nacional de saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 204–213, 2015.

MERESSE, B. et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. **Immunity**, v. 21, n. 3, p. 357–366, 2004.

MERESSE, B.; MALAMUT, G.; CERF-BENSUSSAN, N. Celiac Disease: An Immunological Jigsaw. **Immunity**, v. 36, n. 6, p. 907–919, 2012.

MEYER, D. et al. Osteoporosis in a North American adult population with celiac disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 96, n. 1, p. 112–119, 2001.

MIRZAEI, B. et al. Cardiovascular risk in different obesity phenotypes over a decade follow-up: Tehran Lipid and Glucose Study. **Atherosclerosis**, v. 258, p. 65–71, 2017.

MONTALTO, M. et al. Management and treatment of lactose malabsorption. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 2, p. 187–191, 2006.

MOULSON, C. L. et al. Homozygous and compound heterozygous mutations in ZMPSTE24 cause the laminopathy restrictive dermopathy. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, n. 5, p. 913–919, 2005.

MUSTALAHTI, K. et al. The prevalence of celiac disease in Europe: Results of a centralized, international mass screening project. **Annals of Medicine**, v. 42, n. 8, p. 587–595, 2010.

MYLÉUS, A. et al. Celiac disease revealed in 3% of Swedish 12-year-olds born during an epidemic. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 49, n. 2, p. 170–176, 2009.

NAKAMURA, K. et al. A-twinnipeg: Pathogenesis of rare atm missense mutation c.6200c>a with decreased protein expression and downstream signaling, early-onset dystonia, cancer, and life-threatening radiotoxicity. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, v. 2, n. 4, p. 332–340, 2014.

NAUKKARINEN, J. et al. USF1 and dyslipidemias: Converging evidence for a functional intronic variant. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 17, p. 2595–2605, 2005.

NIIMURA, H. et al. Mutations in the Gene for Cardiac Myosin-Binding Protein C and Late-Onset Familial Hypertrophic Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v. 338, n. 18, p. 1248–1257, 30 abr. 1998.

NILSEN, E. M. et al. Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma. **Gut**, v. 37, n. 6, p. 766–776, 1995.

NISTICÒ, L. et al. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac

disease in Italian twins. **Gut**, v. 55, n. 6, p. 803–8, 2006.

OBER, C. et al. Effect of Variation in CHI3L1 on Serum YKL-40 Level, Risk of Asthma, and Lung Function. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 16, p. 1682–1691, 17 abr. 2008.

OBER, C. et al. Immune development and environment: lessons from Amish and Hutterite children. **Current Opinion in Immunology**, v. 48, p. 51–60, 2017.

OBERHUBER, G.; GRANDITSCH, G.; VOGELSANG, H. **The histopathology of coeliac disease: Time for a standardized report scheme for pathologists** **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, 1999.

OJETTI, V. et al. High prevalence of celiac disease in patients with lactose intolerance. **Digestion**, v. 71, n. 2, p. 106–110, 2005.

OLDS, L. C.; SIBLEY, E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: Functional role as a cis regulatory element. **Human Molecular Genetics**, v. 12, n. 18, p. 2333–2340, 2003.

OLERUP, O.; ALDENER, A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. **Tissue Antigens**, v. 41, p. 119–34, 1993.

ORTON, N. C. et al. Unique disease heritage of the Dutch-German mennonite population. **American Journal of Medical Genetics, Part A**, v. 146, n. 8, p. 1072–1087, 2008.

PAJUKANTA, P. et al. Familial combined hyperlipidemia is associated with upstream transcription factor 1 (USF1). **Nature Genetics**, v. 36, n. 4, p. 371–376, 2004.

PALO, O. M. et al. Association of distinct allelic haplotypes of DISC1 with psychotic and bipolar spectrum disorders and with underlying cognitive impairments. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 20, p. 2517–2528, 2007.

PARDO-SECO, J. et al. Genomic continuity of Argentinean Mennonites. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36392, 8 dez. 2016.

PARRA-MEDINA, R. et al. Prevalence of Celiac Disease in Latin America: A Systematic Review and Meta-Regression. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0124040, 5 maio 2015.

PARSONS, M. J. et al. A dopamine D2 receptor gene-related polymorphism is associated with schizophrenia in a Spanish population isolate. **Psychiatric Genetics**, v. 17, n. 3, p. 159–163, 2007.

PAULS JR, P. Mennoniten in Brasilien: Gedenkschrift zum 50 Jahr-Jubiläum ihrer Einwanderung 1930-1980. **Palmeira: Witmarsum**, 1980.

PAULS JUNIOR., P. Witmarsum. **Mennoniten in Brasilien**, 1980.

PELTONEN, L.; JALANKO, A.; VARILO, T. Molecular genetics of the Finnish disease heritage. **Human Molecular Genetics**, v. 8, n. 10, p. 1913–1923, 1999.

PELTONEN, L.; PALOTIE, A.; LANGE, K. Use of population isolates for mapping complex traits. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, n. 3, p. 182–190, dez. 2000.

PENNER, H.; GERLACH, H.; QUIRING, H. Weierhof: Mennonitischer Geschichtsverein. **Weltweite Bruderschaft**, p. 1984, 1984.

PEREIRA, M. A. G. Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 40, p. 6546, 2006.

PITTSCHIELER, K.; GENTILI, L.; NIEDERHOFER, H. Onset of coeliac disease: a prospective longitudinal study. **Acta paediatrica**, v. 92, n. 10, p. 1149–1152, 2003.

PLAZA-IZURIETA, L. et al. Revisiting genome wide association studies (GWAS) in coeliac disease: replication study in Spanish population and expression analysis of candidate genes. **Journal of Medical Genetics**, v. 48, n. 7, p. 493–496, 2011.

PROFAIZER, T.; ECKELS, D.; DELGADO, J. C. Celiac disease and HLA typing using real-time PCR with melting curve analysis. **Tissue Antigens**, v. 78, n. 1, p. 31–37, jul. 2011.

RAELSON, J. V. et al. Genome-wide association study for Crohn's disease in the

Quebec Founder Population identifies multiple validated disease loci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 37, p. 14747–14752, 2007.

REINER, A. P. et al. USF1 gene variants, cardiovascular risk, and mortality in European Americans: Analysis of two US cohort studies. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 27, n. 12, p. 2736–2742, 2007.

RICAÑO-PONCE, I.; WIJMENGA, C.; GUTIERREZ-ACHURY, J. Genetics of celiac disease. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 29, n. 3, p. 399–412, jun. 2015.

RIDEFELT, P.; HÅKANSSON, L. D. Lactose intolerance: lactose tolerance test versus genotyping. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 40, n. 7, p. 822–826, 2005.

ROMAGNUOLO, J.; SCHILLER, D.; BAILEY, R. J. Using breath tests wisely in a gastroenterology practice: An evidence-based review of indications and pitfalls in interpretation. **American Journal of Gastroenterology**, v. 97, n. 5, p. 1113–1126, 2002.

ROMANOS, J. et al. Analysis of HLA and Non-HLA Alleles Can Identify Individuals at High Risk for Celiac Disease. **Gastroenterology**, v. 137, n. 3, p. 834- 840.e3, 2009.

RUBIO-TAPIA, A. et al. American College of Gastroenterology Clinical Guideline : Diagnosis and Management of Celiac. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 2013, n. 5, p. 656–677, 2013.

SAHI, T. Hypolactasia and Lactase Persistence. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 29, n. S202, p. 1–6, 1994.

SALVATI, V. M. et al. Interleukin 18 and associated markers of T helper cell type 1 activity in coeliac disease. **Gut**, v. 50, n. 2, p. 186–190, 2002.

SANNA, S. et al. Common variants in the GDF5-UQCC region are associated with variation in human height. **Nature Genetics**, v. 40, n. 2, p. 198–203, 2008.

SARENEVA, T.; JULKUNEN, I.; MATIKAINEN, S. IFN- α and IL-12 induce IL-18 receptor gene expression in human NK and T cells. **Journal of immunology**, v. 165, n.

4, p. 1933–1938, 2000.

SAUNDERS-PULLMAN, R. et al. Variant ataxia-telangiectasia presenting as primary-appearing dystonia in Canadian Mennonites. **Neurology**, v. 78, n. 9, p. 649–657, 2012.

SCHUPPAN, D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 119, n. 1, p. 234–242, 2000.

SCUTERI, A. et al. Genome-wide association scan shows genetic variants in the FTO gene are associated with obesity-related traits. **PLoS Genetics**, v. 3, n. 7, p. 1200–1210, 2007.

SERFAS, K. D. et al. Comparison of the Segregation of the RYR1 C1840T Mutation with Segregation of the Caffeine/Halothane Contracture Test Results for Malignant Hyperthermia Susceptibility in a Large Manitoba Mennonite Family. **Anesthesiology**, v. 84, n. 2, p. 322–329, fev. 1996.

SHAMIR, R. et al. The use of a single serological marker underestimates the prevalence of celiac disease in Israel: a study of blood donors. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 97, n. 10, p. 2589–2594, 2002.

SHAN, L. et al. Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue. **Science**, v. 297, n. 5590, p. 2275–2279, 27 set. 2002.

SHAUKAT, A. et al. Annals of Internal Medicine NIH Conference Systematic Review : Smoking Cessation Intervention Strategies for. **Annals of Internal medicine**, v. 152, p. 797–803, 2010.

SHIHAB, H. M. et al. Body mass index and risk of incident hypertension over the life course: The Johns Hopkins precursors study. **Circulation**, v. 126, n. 25, p. 2983–2989, 2012.

SIDORE, C. et al. Genome sequencing elucidates Sardinian genetic architecture and augments association analyses for lipid and blood inflammatory markers. **Nature Genetics**, v. 47, n. 11, p. 1272–1281, 14 nov. 2015.

SILVA, G. A. E. et al. Modos de vida entre pessoas que tiveram câncer no Brasil em 2013. **Ciencia e Saude Coletiva**, v. 21, n. 2, p. 379–388, 2016.

SINGH, P. et al. Risk of Celiac Disease in the First- and Second-Degree Relatives of Patients With Celiac Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. **American Journal of Gastroenterology**, v. 110, n. 11, p. 1539–1548, nov. 2015.

SINGH, P. et al. Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 16, n. 6, p. 823–836.e2, jun. 2018.

SOLLID, L.; LIE, B. Celiac Disease Genetics: Current Concepts and Practical Applications. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 9, p. 843–851, 2005.

SOLLID, L. M. et al. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. **The Journal of experimental medicine**, v. 169, n. January, p. 345–350, 1989.

SOLLID, L. M.; JABRI, B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 4, p. 294–302, 2013.

STACEY, S. N. et al. Common variants on chromosomes 2q35 and 16q12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. **Nature Genetics**, v. 39, n. 7, p. 865–869, 2007.

STACEY, S. N. et al. Common variants on chromosome 5p12 confer susceptibility to estrogen receptor-positive breast cancer. **Nature Genetics**, v. 40, n. 6, p. 703–706, 2008.

STEINTHORSDDOTTIR, V. et al. A variant in CDKAL1 influences insulin response and risk of type 2 diabetes. **Nature Genetics**, v. 39, n. 6, p. 770–775, 2007.

STYRKARSDOTTIR, U. et al. Multiple genetic loci for bone mineral density and fractures. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 22, p. 2355–2365, 2008.

SU, A. et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. **PNAS**, v. 101, n. 16, p. 6062–7, 2004.

SUCHY, F. J. et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference: Lactose Intolerance and Health. **Annals of Internal Medicine**, v. 152, n. 12, p. 792, 15 jun. 2010.

SULEM, P. et al. Genetic determinants of hair, eye and skin pigmentation in Europeans. **Nature Genetics**, v. 39, n. 12, p. 1443–1452, 2007.

SULEM, P. et al. Two newly identified genetic determinants of pigmentation in Europeans. **Nature Genetics**, v. 40, n. 7, p. 835–837, 2008.

SWALLOW, D. M. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. **Annual review of genetics**, v. 37, p. 197–219, 2003.

SYAGE, J. A. et al. Latiglutenase Improves Symptoms in Seropositive Celiac Disease Patients While on a Gluten-Free Diet. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 62, n. 9, p. 2428–2432, 2017.

SZWARCWALD, C. L. et al. Determinantes da autoavaliação de saúde no Brasil e a influência dos comportamentos saudáveis: Resultados da pesquisa nacional de saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 33–44, 2015.

TADIBOYINA, V. T. et al. Novel mutation in DGUOK in hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome associated with cystathioninuria. **American Journal of Medical Genetics**, v. 135 A, n. 3, p. 289–291, 2005.

TAHA KHALAF, A. et al. CTLA-4 gene polymorphism and the risk of systemic lupus erythematosus in the Chinese population. **Journal of biomedicine & biotechnology**, v. 2011, p. 167395, 2011.

THEME FILHA, M. M. et al. Prevalência de doenças crônicas não transmissíveis e associação com autoavaliação de saúde: Pesquisa nacional de saúde, 2013. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 25000, p. 83–96, 2015.

THORGEIRSSON, T. E. et al. A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease. **Nature**, v. 452, n. 7187, p. 638–642, 2008.

THORLEIFSSON, G. et al. Common sequence variants in the LOXL1 gene confer susceptibility to exfoliation glaucoma. **Science**, v. 317, n. 5843, p. 1397–1400, 2007.

TING-TING ZHANG, M. et al. Obesity as a Risk Factor for Low Back Pain. **Clinical Spine Surgery**, v. 00, n. 00, p. 1–6, 2016.

TISHKOFF, S. A et al. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. **Nature genetics**, v. 39, n. 1, p. 31–40, 2007.

TOSCANINI, U. et al. Charting the Y-chromosome ancestry of present-day Argentinean Mennonites. **Journal of Human Genetics**, v. 61, n. 6, p. 507–513, 4 jun. 2016.

TROELSEN, J. T. Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1723, n. 1–3, p. 19–32, 2005.

TRYNKA, G. et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. **Nature Genetics**, v. 43, n. 12, p. 1193–1201, 2012.

TURSI, A. et al. Prevalence of celiac disease and symptoms in relatives of patients with celiac disease. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 14, n. 6, p. 567–72, jun. 2010.

UTIYAMA, S. R. D. R. et al. Triagem sorológica de familiares de pacientes com doença celíaca: Anticorpos anti-endomísio, antitransglutaminase ou ambos? **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 44, n. 2, p. 156–161, 2007.

VADER, W. et al. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 21, p. 12390–12395, 2003.

VAN HEEL, D. A. et al. Genetics in coeliac disease. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 19, n. 3, p. 323–339, jun. 2005.

VEGA, H. et al. Roberts syndrome is caused by mutations in ESCO2, a human homolog of yeast ECO1 that is essential for the establishment of sister chromatid cohesion. **Nature Genetics**, v. 37, n. 5, p. 468–470, 2005.

VENKEN, T. et al. Genomewide scan for affective disorder susceptibility loci in families of a northern Swedish isolated population. **American Journal of Human Genetics**, v. 76, n. 2, p. 237–248, 2005.

VERNIA, P.; DI CAMILLO, M.; MARINARO, V. Lactose malabsorption, irritable bowel syndrome and self-reported milk intolerance. **Digestive and liver disease : official**

journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver, v. 33, n. Lm, p. 234–239, 2001.

VIJGEN, S. et al. Seroprevalence of celiac disease in Belgian children and adolescents. **Acta gastro-enterologica Belgica**, v. 75, n. 3, p. 325–30, set. 2012.

VILPPULA, A. et al. Undetected coeliac disease in the elderly. **Digestive and Liver Disease**, v. 40, n. 10, p. 809–813, out. 2008.

VOLTA, U. et al. IgA anti-endomysial antibodies on human umbilical cord tissue for celiac disease screening. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 40, n. 9, p. 1902–1905, set. 1995.

VÖLZKE, H. et al. The prevalence of undiagnosed thyroid disorders in a previously iodine-deficient area. **Thyroid**, v. 13, n. 8, p. 803–810, 2003.

WARREN, R. B. et al. A systematic investigation of confirmed autoimmune loci in early-onset psoriasis reveals an association with IL2/IL21. **British Journal of Dermatology**, v. 164, n. 3, p. 660–664, 2011.

WILSON, R. C. et al. A genetic defect resulting in mild low-renin hypertension. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 17, p. 10200–10205, 1998.

WITHOFF, S. et al. Understanding Celiac Disease by Genomics. v. xx, p. 1–14, 2016.

ZHOU, G. et al. CBFA1 mutation analysis and functional correlation with phenotypic variability in cleidocranial dysplasia. **Human Molecular Genetics**, v. 8, n. 12, p. 2311–2316, 1999.

ZIMMET, P. et al. Epidemic T2DM, early development and epigenetics: implications of the Chinese Famine. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 14, n. 12, p. 738–746, 2018.

11 APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO EM COMUNIDADES MENONITAS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Dra. Angelica Beate Winter Boldt (Professora do Departamento de Genética), Dra. Maria Luiza Petzl-Erler (Professora do Departamento de Genética), Dra. Danielle Mallheiros Ferreira (Professora do Departamento de Genética), Dr. Rodrigo Coutinho de Almeida (Pós-doutorando, Laboratório de Genética Molecular Humana), Msc. Caroline Grisbach Meissner, Msc. Luana Caroline Oliveira, Msc. Yvana Cristina Jorge e Gabriela Canalli Kretzschmar (Doutorandas do Programa de Pós-Graduação em Genética) da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você a participar de um estudo intitulado “LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DOS FENÓTIPOS E DOENÇAS COMPLEXAS EXISTENTES NAS COMUNIDADES MENONITAS”. Esta pesquisa é muito importante para a capacitação de famílias que tem sofrido psicologicamente e economicamente com doenças, para as quais herdaram um grau mais elevado de predisposição.

a) O objetivo desta pesquisa é realizar um levantamento epidemiológico de características e doenças, cuja herança se dá pela contribuição de muitos genes, e cuja manifestação depende da interação destes genes com o ambiente (características e doenças “complexas”). Durante a vigência do projeto, estes dados serão utilizados para fins de pesquisa científica e para capacitação das famílias para prevenção da manifestação destas doenças, quando apresentarem predisposição para as mesmas.

b) Para isto, lhe faremos perguntas sobre o seu estado de saúde, os seus hábitos e problemas de saúde crônicos, como hipertensão e diabetes, e a história de sua família, em uma entrevista de aproximadamente 30 minutos. Além da entrevista, faremos medidas de peso, altura, circunferência da cintura, e pressão arterial, se o(a) sr(a) consentir.

c) Para a entrevista, você receberá uma visita de membros da equipe em seu domicílio, ou, caso prefira, deverá comparecer no Laboratório Genética Molecular Humana (Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR), para ser entrevistado por aproximadamente 30 minutos.

d) É possível que você experimente algum desconforto relacionado ao fornecimento de informações pessoais.

e) Neste sentido, pode haver sofrimento psicológico associado à evocação de lembranças dolorosas, relacionadas a entes queridos ou a sua própria história pessoal. Você nunca será pressionado para responder a perguntas que considerar altamente desconfortáveis. Outro risco é a geração de ansiedade, devido a dúvidas acerca da natureza das doenças complexas avaliadas. Para reduzir este risco, você receberá material informativo sobre as doenças e características pesquisadas, após a realização da entrevista.

f) O(a) sr(a) receberá no momento da entrevista todos os resultados das medidas feitas na pesquisa, de forma totalmente gratuita. Lhe dando a oportunidade de conhecer a sua situação em relação à hipertensão e as necessidades de prevenção e/ou encaminhado(a) a um serviço de saúde pela própria equipe da pesquisa. Além disso,

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Orientador _____

tratamento. Se notarmos algum problema, o(a) sr(a) será avisado(a) e pretende-se capacitar as famílias participantes, para prevenir, retardar e/ou amenizar a manifestação de doenças complexas, quando apresentarem predisposição para as mesmas. Nestes casos, os participantes da pesquisa com propensão a determinada doença, receberão informações de estratégias de Medicina Preventiva e serão convidados a participar de workshops, grupos online e/ou presenciais administrados pelos pesquisadores, com o intuito de trocar ideias e experiências com outras pessoas, que busquem capacitação neste mesmo sentido. A comunidade como um todo, será beneficiada com o conhecimento de suas características epidemiológicas, por meio de palestras e campanhas de conscientização para prevenção. Embora nem sempre você seja diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, a sua participação também poderá contribuir para o avanço científico na área.

g) A pesquisadora Dra. Angelica Beate Winter Boldt, responsável por este estudo poderá ser localizada no Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas (Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR), no e-mail angelicaboldt@gmail.com e telefone (041) 3361-1553, no horário comercial (8:00-18:00), para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira, antes, durante ou depois de encerrado o estudo.

h) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

i) A sua participação será mantida em completo sigilo. Todas as informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais. Seu nome, Endereço e outras informações pessoais serão transformados em um código de identificação único. As informações coletadas na entrevista serão identificadas apenas através do código, sem nenhuma identificação pessoal. Os dados pessoais e os termos de consentimento serão mantidos em total segurança, e apenas a coordenação da pesquisa terá acesso a essas informações. Se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade**).

j) As respostas aos questionários serão utilizadas unicamente para essa pesquisa. Os dados, vinculados a um código para proteger a sua identidade, ficarão armazenados no biorepositório do Laboratório de Genética Molecular Humana do Departamento Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), com sede em Curitiba, na Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, nº 210, Bairro Jardim das Américas, no Campus II do Centro Politécnico, pelo prazo de 5 anos. Se necessário, serão solicitados mais 5 anos para o Comitê de Ética, sendo descartadas após este período. Contudo, a qualquer momento você poderá solicitar que seus dados não sejam mais utilizados e que sejam descartados, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ou constrangimento a você. Caso haja necessidade de utilizar os dados no futuro, você será contatado para consentir ou não sobre a inclusão de seus dados em uma nova pesquisa. Nesse caso, seu consentimento será formalizado através de um novo TCLE específico. Quando isso não for possível, o fato será justificado perante o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

Toda nova pesquisa a ser feita com os seus dados será submetida à apreciação do CEP e sempre que couber também da CONEP, em conformidade com as normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução CNS nº 441/2011).

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal _____
Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____
Orientador _____

k) As despesas necessárias para a realização da pesquisa, como o transporte ao local da coleta, não são de sua responsabilidade e você não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

l) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

m) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

O sr(a) aceita participar dessa pesquisa? () Sim () Não. recusou

Agora, vamos precisar do seu consentimento para cada uma das etapas:

O sr(a) consente fazer a entrevista? Sim Não

O sr(a) consente em fazer as medidas:

de peso? Sim Não

de altura? Sim Não

de circunferência da cintura? Sim Não

de pressão arterial? Sim Não

Eu, _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

_____, ____ de _____ de _____

[Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal]

[Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE]

APÊNDICE B - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO EM COMUNIDADES MENONITAS

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DOS FENÓTIPOS E DOENÇAS COMPLEXAS EXISTENTES NAS COMUNIDADES MENONITAS

Pesquisadora Responsável: Profa. Dra. Angelica Beate Winter Boldt

Local da Pesquisa:
Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH)
Departamento de Genética. Sala 60
Setor de Ciências Biológicas
Centro Politécnico

Telefone: (41) 3361 1553

Endereço:
Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos. 210 - Jardim das Américas
CEP 81530-900. Curitiba/PR

O que significa assentimento?

Assentimento significa que você, menor de idade, concorda em fazer parte de uma pesquisa. Você terá seus direitos respeitados e receberá todas as informações sobre o estudo, por mais simples que possam parecer. Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informação ao participante

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, com o objetivo de realizar um levantamento das características físicas e doenças, cuja herança se dá pela contribuição de muitos genes, e cuja manifestação depende da interação destes genes com o ambiente (características e doenças "complexas"). Esta pesquisa é muito importante para o acompanhamento de famílias que tem sofrido psicologicamente e economicamente com doenças, para as quais herdaram um grau mais elevado de predisposição. Durante a vigência do projeto, estes dados serão utilizados para fins de pesquisa científica e para capacitar as famílias que desejem prevenir a manifestação destas doenças, quando apresentarem predisposição para as mesmas.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal _____ Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____ Orientador _____

Para isto, lhe faremos perguntas sobre o seu estado de saúde e os seus hábitos. Os benefícios da pesquisa são a avaliação da sua probabilidade de desenvolver doenças complexas ao longo da vida, assim como de seus parentes. Se este for o caso e você assim o desejar, receberá capacitação quanto às ações preventivas que poderá tomar, visando retardar ou impedir o aparecimento de sintomas. Benefícios indiretos incluem a caracterização epidemiológica e campanhas de conscientização da população, visando a adoção de estratégias de prevenção. Embora nem sempre você seja diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, a sua participação também poderá contribuir para o avanço científico na área.

Que devo fazer se eu concordar voluntariamente em participar da pesquisa?

Caso você participe da pesquisa, será necessário responder um questionário sobre a sua saúde, que será aplicado pessoalmente por membros da equipe em seu domicílio. Caso prefira, você também poderá comparecer no Laboratório Genética Molecular Humana (Sala 60, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR). A duração da entrevista é de aproximadamente 30 minutos.

É possível que você experimente algum desconforto, principalmente relacionado ao fornecimento de informações pessoais. Um risco relacionado a esta etapa do estudo, pode ser o sofrimento psicológico associado à evocação de lembranças dolorosas, relacionadas a entes queridos ou a sua própria história pessoal. Você nunca será pressionado para responder a perguntas que considerar altamente desconfortável. Outro risco é a geração de ansiedade, devido a dúvidas acerca da natureza das doenças avaliadas. Para reduzir este risco, você receberá material informativo sobre as doenças e características pesquisadas, após a realização da entrevista.

A sua participação é voluntária e a qualquer momento você poderá solicitar que suas informações não sejam mais utilizadas e que sejam descartadas, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ou constrangimento a você.

Contato para dúvidas

Se você ou os responsáveis por você tiverem dúvidas com relação ao estudo ou aos riscos relacionados a ele, você deve contatar o pesquisador principal, Dra. Angelica Beate Winter Boldt (Professora do Departamento de Genética), ou membros de sua equipe, Dra. Maria Luiza Petzler (Professora do Departamento de Genética), Dra. Danielle Mallheiros Ferreira (Professora do Departamento de Genética), Dr. Rodrigo Coutinho de Almeida (Pós-doutorando, Laboratório de Genética Molecular Humana), Msc. Caroline Grisbach Meissner, Msc. Luana Caroline Oliveira, Msc. Yvana Cristina Jorge (Doutorandas do Programa de Pós-Graduação em Genética) e Gabriela Canalli Kretzschmar (Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética), pelos telefones (41) 3361-1553 (Profa. Angelica) ou 3361-1724 (LGMH) ou no endereço Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 210 - Jardim das Américas, CEP 81530-900, Curitiba/PR (Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética), no horário comercial (8:00-18:00).

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal _____ Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____ Orientador _____

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PARTICIPANTE

Eu li e discuti com o pesquisador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste documento.

_____. ____ de _____ de _____

[Assinatura do Adolescente]

[Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TALE]

APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA DOENÇA CELÍACA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nós, Dra. Angelica Beate Winter Boldt (Professora do Departamento de Genética), Dra. Maria Luiza Petzl-Erler (Professora do Departamento de Genética), Dra. Danielle Mallheiros Ferreira (Professora do Departamento de Genética), Dr. Rodrigo Coutinho de Almeida (Pós-doutorando, Laboratório de Genética Molecular Humana), Msc. Caroline Grisbach Meissner, Msc. Luana Caroline Oliveira, Msc. Yvana Cristina Jorge (Doutorandas do Programa de Pós-Graduação em Genética) e Gabriela Canalli Kretzschmar (Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética) da Universidade Federal do Paraná, estamos convidando você, pertencente a uma família Menonita, a participar de um estudo intitulado RASTREAMENTO SOROLÓGICO E ANÁLISE GENÉTICA DA DOENÇA CELÍACA NA POPULAÇÃO MENONITA. A comunidade menonita no Brasil tem sofrido psicologicamente e economicamente com perdas de entes queridos, acometidos por doenças fortemente associadas a herança genética, como é o caso da doença celíaca familiar. Além disso, a doença celíaca é descrita predominantemente em indivíduos descendentes de caucasóides e apresenta uma prevalência elevada no sul do Brasil, em função do alto grau de miscigenação da nossa população. Até o momento, não foi realizada nenhuma investigação sistemática para levantar o número de casos de doença celíaca que estão afetando a comunidade, tampouco realizado aconselhamento genético das famílias acometidas.

a) O objetivo desta pesquisa é, portanto, realizar um levantamento dos casos de doença celíaca na comunidade Menonita do Brasil, a começar por Curitiba e região, identificando os fatores genéticos causadores (isto é, se existem fatores que aumentam a chance de aparecimento da doença celíaca) em relação à sua pessoa e outros membros de sua família que assim desejarem, os quais serão utilizados para fins de pesquisa científica e para futuro aconselhamento genético àqueles que voluntariamente se dispuserem a participar da pesquisa.

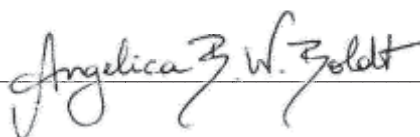
b) Caso você participe da pesquisa, será necessário descrever a história de sua família, através de respostas a questionários que serão aplicados pessoalmente por membros da equipe. Para a análise dos genes será necessário realizar a coleta de sangue. O teste genético, normalmente, requer 5 ml (cinco mililitros) de sangue periférico coletados de uma veia periférica do braço, através de material estéril, descartável e não reutilizável. Em raras situações, quando a primeira amostra não for suficiente ou adequada, você será chamado para realizar nova coleta.

c) Para a entrevista, você receberá uma visita de membros da equipe em seu domicílio, ou, caso prefira, deverá comparecer no Laboratório Genética

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal: _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE: _____

Orientador: _____



Molecular Humana (Departamento de Genética. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná. Centro Politécnico. Jardim das Américas. Curitiba. PR). para ser entrevistado por aproximadamente 40 minutos. Para a coleta de sangue você deverá comparecer no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (Departamento de Genética. Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná.

Centro Politécnico. Jardim das Américas. Curitiba. PR). para realizar a coleta de sangue. o que levará aproximadamente 15 minutos.

d) É possível que você experimente algum desconforto relacionado a coleta de sangue e ao fornecimento de informações pessoais.

e) Alguns riscos relacionados à coleta de sangue são: dor no local devido à punção com agulha. sangramento mínimo. hematoma (marca arroxeadada transitória na pele) e infecção. Outro risco relacionado ao estudo é a ansiedade com relação ao possível resultado. Para evitar isso. você pode optar em fazer o teste de forma anônima. decidindo não obter o conhecimento se tem ou não uma alteração em um gene associado à doença celíaca.

f) Os benefícios diretos esperados com essa pesquisa são o fornecimento de uma estimativa mais precisa do risco de desenvolver a doença celíaca ao longo da vida. tanto seu. quanto de seus parentes (incluindo seus filhos) e a determinação de possíveis alterações em genes associados ao desenvolvimento da doença celíaca. que possam ser transmitidas aos seus filhos ou estar presentes em seus parentes. Se este for o caso e você assim o desejar. receberá aconselhamento quanto às opções de diagnóstico e tratamento precoce. possibilitando uma melhor abordagem clínico-terapêutica e redução dos riscos de complicações por ausência de tratamento. Benefícios indiretos incluem a caracterização da população Menonita do Brasil. inclusive os membros de sua família. quando estes assim o desejarem. quanto ao risco de desenvolver a doença celíaca. Tais informações poderão auxiliar a identificar indivíduos em risco. acompanhar e a tratar diferencialmente sua pessoa e seus familiares. assim como outros pacientes. Portanto. embora nem sempre você seja diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa. a sua participação também poderá contribuir para o avanço científico na área.

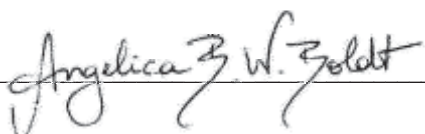
g) A pesquisadora Dra. Angelica Beate Winter Boldt. responsável por este estudo poderá ser localizada no Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas (Universidade Federal do Paraná. Centro Politécnico. Jardim das Américas. Curitiba. PR). no e-mail angelicaboldt@gmail.com e telefone (041) 3361-1555. no horário comercial (8:00-18:00). para esclarecer eventuais dúvidas que você possa ter e fornecer-lhe as informações que queira. antes. durante ou depois de encerrado o estudo.

h) A sua participação neste estudo é voluntária e se você não quiser mais fazer parte da pesquisa poderá desistir a qualquer momento e solicitar que lhe devolvam este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal:

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE:

Orientador:



i) As informações relacionadas ao estudo poderão ser conhecidas por pessoas autorizadas pela Dra. Angelica Beate Winter Boldt (Pesquisadora Principal e Professora do Departamento de Genética). No entanto, se qualquer informação for divulgada em relatório ou publicação, isto será feito sob forma codificada, para que a **sua identidade seja preservada e mantida sua confidencialidade**).

j) As amostras biológicas e os questionários serão utilizados unicamente para essa pesquisa. As amostras obtidas a partir deste material, com finalidade de realizar este estudo, ficarão armazenadas no biobanco do Laboratório de Genética Molecular Humana do Departamento Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR), com sede em Curitiba, na Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, nº 210, Bairro Jardim das Américas, no Campus II do Centro Politécnico, pelo prazo de 5 anos. Se necessário, serão solicitados mais 5 anos para o Comitê de Ética, sendo descartadas após este período. Contudo, a qualquer momento você poderá solicitar que seu material biológico não seja mais utilizado e que seja descartado, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ou constrangimento a você. Caso haja necessidade de utilizá-lo no futuro, você será contatado para consentir ou não sobre o novo uso de sua amostra. Nesse caso, seu consentimento será formalizado através de um novo TCLE específico. Quando isso não for possível, o fato será justificado perante o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). Toda nova pesquisa a ser feita com o seu material será submetida à apreciação do CEP e sempre que couber também da CONEP, em conformidade com as normas do Conselho Nacional de Saúde (Resolução CNS nº 441/2011).

k) As despesas necessárias para a realização da pesquisa, como o transporte ao local da coleta, não são de sua responsabilidade e você não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação.

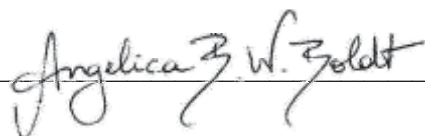
l) Quando os resultados forem publicados, não aparecerá seu nome, e sim um código.

m) Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal: _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE: _____

Orientador:

_____ 

Eu. _____ li esse Termo de Consentimento e compreendi a natureza e objetivo do estudo do qual concordei em participar. A explicação que recebi menciona os riscos e benefícios. Eu entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem qualquer prejuízo para mim.

Eu concordo voluntariamente em participar deste estudo.

_____. ____ de _____ de _____

[Assinatura do Participante de Pesquisa ou Responsável Legal]

[Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE]

APÊNDICE D - TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA DOENÇA CELÍACA

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: RASTREAMENTO SOROLÓGICO E ANÁLISE GENÉTICA DA DOENÇA CELÍACA NA POPULAÇÃO MENONITA

Pesquisadora Responsável: Profa. Dra. Angelica Beate Winter Boldt

Local da Pesquisa:

Laboratório de Genética Molecular Humana (LGMH)
Departamento de Genética. Sala 60
Setor de Ciências Biológicas
Centro Politécnico

Telefone: (41) 3361 1724

Endereço:

Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos. 210 - Jardim das Américas
CEP 81530-900. Curitiba/PR

O que significa assentimento?

Assentimento significa que você, menor de idade, concorda em fazer parte de uma pesquisa. Você terá seus direitos respeitados e receberá todas as informações sobre o estudo, por mais simples que possam parecer.

Pode ser que este documento denominado TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO contenha palavras que você não entenda. Por favor, peça ao responsável pela pesquisa ou à equipe do estudo para explicar qualquer palavra ou informação que você não entenda claramente.

Informação ao participante

Você está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa, com o objetivo de realizar um levantamento dos casos de doença celíaca nas comunidades Menonitas do Brasil, a começar por Curitiba e região, identificando os fatores genéticos causadores (isto é, se existem fatores que aumentam a chance de aparecimento da doença celíaca) em relação à sua pessoa e outros membros de sua família que assim desejarem. Os quais serão utilizados para fins de pesquisa científica e para futuro aconselhamento genético àqueles que voluntariamente se dispuserem a participar da pesquisa.

Esta pesquisa é importante porque a comunidade menonita no Brasil tem sofrido psicologicamente e economicamente com perdas de entes queridos, acometidos por doenças fortemente associadas a herança genética, como é o caso da doença celíaca familiar. Além disso, a doença celíaca é descrita predominantemente em indivíduos descendentes de

caucasoides e apresenta uma prevalência elevada no sul do Brasil, em função do alto grau de miscigenação da nossa população. Até o momento, não foi realizada nenhuma investigação sistemática para levantar o número de casos de doença celíaca que estão afetando a comunidade, tampouco realizado aconselhamento genético das famílias acometidas.

Os benefícios da pesquisa são o fornecimento de uma estimativa mais precisa do risco de desenvolver a doença celíaca ao longo da vida, tanto seu, quanto de seus parentes e a determinação de possíveis alterações em genes associados ao desenvolvimento da doença celíaca, que podem estar presentes em seus parentes. Se este for o caso e você assim o desejar, receberá aconselhamento quanto às opções de diagnóstico e tratamento precoce, possibilitando uma melhor abordagem clínico-terapêutica e redução dos riscos de complicações por ausência de tratamento. Benefícios indiretos incluem a caracterização da população Menonita do Brasil, inclusive os membros de sua família, quando estes assim o desejarem, quanto ao risco de desenvolver a doença celíaca. Tais informações poderão auxiliar a identificar indivíduos em risco, acompanhar e a tratar você diferencialmente e seus familiares, assim como outros pacientes. Portanto, embora nem sempre você seja diretamente beneficiado com o resultado da pesquisa, a sua participação também poderá contribuir para o avanço científico na área.

Que devo fazer se eu concordar voluntariamente em participar da pesquisa?

Caso você participe da pesquisa, será necessário descrever a história de sua família, através de respostas a questionários que serão aplicados pessoalmente por membros da equipe em seu domicílio, ou, caso prefira, poderá comparecer no Laboratório Genética Molecular Humana (Sala 60, Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba, PR). Para as análises sorológicas e genéticas será necessário coletar cerca de 6 ml (seis mililitros) de sangue periférico a partir de uma veia periférica do braço, utilizando material estéril, descartável e não reutilizável. Em raras situações, quando a primeira amostra não for suficiente ou adequada, você será chamado para realizar nova coleta. A duração da entrevista é de aproximadamente 30 minutos e a coleta de sangue levará cerca de 15 minutos.

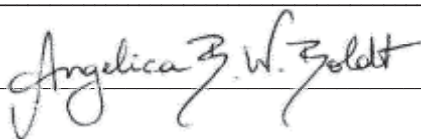
Alguns riscos relacionados à coleta de sangue são: dor no local devido à punção com agulha, sangramento mínimo, hematoma (marca arroxeadada transitória na pele) e infecção. Outro risco relacionado ao estudo é a ansiedade com relação ao possível resultado. Para evitar isso, você pode optar em fazer o teste de forma anônima, decidindo não obter o conhecimento se tem ou não uma alteração em um gene associado à doença celíaca.

A sua participação é voluntária a qualquer momento você poderá solicitar que seu material biológico não seja mais utilizado e que seja descartado, sem que isso acarrete qualquer prejuízo ou constrangimento a você.

Participante da Pesquisa e/ou Responsável Legal _____

Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TCLE _____

Orientador



Contato para dúvidas

Se você ou os responsáveis por você tiverem dúvidas com relação ao estudo ou aos riscos relacionados a ele, você deve contatar o pesquisador principal, Dra. Angelica Beate Winter Boldt (Professora do Departamento de Genética), ou membros de sua equipe, Dra. Maria Luiza Petzl-Erler (Professora do Departamento de Genética), Dra. Danielle Mallheiros Ferreira (Professora do Departamento de Genética), Dr. Rodrigo Coutinho de Almeida (Pós-doutorando, Laboratório de Genética Molecular Humana), Msc. Caroline Grisbach Meissner, Msc. Luana Caroline Oliveira, Msc. Yvana Cristina Jorge (Doutorandas do Programa de Pós-Graduação em Genética) e Gabriela Canalli Kretzschmar (Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética), pelos telefones (41) 3361-1555 (Profa. Angelica) ou 3361-1724 (LGMH) ou no endereço Av. Coronel Francisco Heráclito dos Santos, 210 - Jardim das Américas, CEP 81530-900, Curitiba/PR (Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Genética), no horário comercial (8:00-18:00).

Se você tiver dúvidas sobre seus direitos como participante de pesquisa, você pode contatar também o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP/SD) do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pelo telefone 3360-7259.

DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO DO PARTICIPANTE

Eu li e discuti com o pesquisador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que eu sou livre para aceitar ou recusar e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Eu concordo que os dados coletados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Eu entendi a informação apresentada neste TERMO DE ASSENTIMENTO. Eu tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Eu receberei uma cópia assinada e datada deste documento.

_____. ____ de _____ de _____

[Assinatura do Adolescente]

[Assinatura do Pesquisador Responsável ou quem aplicou o TALE]

APÊNDICE E – QUESTIONÁRIO DE AVERIGUAÇÃO DE DOENÇAS GASTROINTESTINAIS E CONTROLES

QUESTIONÁRIO DE AVERIGUAÇÃO

CÓDIGO DO INDIVÍDUO	LOCAL	DATA DA AVERIGUAÇÃO	AVERIGUADOR

DADOS CADASTRAIS E SOCIODEMOGRÁFICOS

Nome: _____
 Sexo: () Feminino () Masculino
 Telefone: _____ email: _____
 Pessoa para contato: _____ Telefone: _____
 Data de nascimento: _____ Município de nascimento: _____
 Município de nascimento: _____

Medidas biométricas

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

Esse questionário foi respondido por:

(1) próprio sujeito da pesquisa (2) responsável pelo sujeito da pesquisa

ESCOLARIDADE E OCUPAÇÃO

Grau de escolaridade: _____ grau completo/incompleto

Grau de instrução:

- | | |
|----------------------------|-------------------------|
| (1) Analfabeto | (5) Médio completo |
| (2) Fundamental incompleto | (6) Superior incompleto |
| (3) Fundamental completo | (7) Superior completo |
| (4) Médio incompleto | (8) Pós-graduação |

Ocupação: _____

ANCESTRALIDADE E DADOS FAMILIARES

Vamos iniciar esta entrevista. fazendo perguntas sobre a sua ancestralidade:

1. Classificação fenotípica :

(1) Euro-br. menonita (2) Euro-br. não menonita (3) Afro-br. (4) Amer. (5) Ásia (6) Misto
 Obs.: _____

2. Ascendência materna:

Nome da mãe: _____

Município de nascimento: _____ UF: _____

(1) Euro-br. Menonita (2) Euro-br. não Menonita (3) Afri (4) Indig (5) Ásia

Obs.: _____

3. Ascendência paterna:

Nome do pai: _____

Município de nascimento: _____ UF: _____

(1) Euro-br. Menonita (2) Euro-br. não Menonita (3) Afri (4) Indig (5) Ásia

Obs.: _____

Pais consanguíneos: ()

Nº total de irmãos: () Número de irmãos vivos: (...) Filhos dos mesmos pais: ()

Algum aborto: () Quantas vezes sua esposa engravidou: () Algum aborto: ()

INVESTIGAÇÃO CLÍNICA DA DOENÇA CELÍACA

Tem sintomas de Doença Celíaca? (0) Não (1) Sim

Tem diagnóstico de Doença Celíaca? (0) Não (1) Sim

Qual a idade do diagnóstico? _____

Você já fez algum dos exames abaixo?

a. Genético

(0) Não

(1) HLA-DQ2

(2) HLA-DQ8

(3) Ambos

Resultado: _____

b. Sorológico

(0) Não

(1) Dosagem de anticorpos transglutaminase (TTG)

(2) Dosagem de anticorpos anti-endomisio (EmA)

(3) Dosagem de anticorpos antigliadina (AAG)

(4) Outro(s): _____

Resultado: _____

c. Biópsia Intestinal

(0) Não

(1) Sim

Resultado

() Marsh 0

() Marsh 1

() Marsh 2

() Marsh 3

() Marsh 4

d. Realiza algum tratamento?

(0) Não

(1) Dieta isenta de glúten

(2) Outros: _____

INVESTIGAÇÃO CLÍNICA DA INTOLERÂNCIA A LACTOSE

Tem sintomas de Intolerância a Lactose? (0) Não (1) Sim

Tem diagnóstico de Intolerância a Lactose? (0) Não (1) Sim

Qual a idade do diagnóstico? _____

Você já fez algum dos exames abaixo?

a. Genético

- (0) Não
(1) LCT-13190 C>T

Resultado: _____

b. Teste de ingestão da lactose

- (0) Não
(1) Sim

Resultado: _____

d. Realiza algum tratamento?

- (0) Não
(1) Dieta isenta de lactose
(2) Outros: _____

INVESTIGAÇÃO CLÍNICA DA SÍNDROME DO INTESTINO IRRITÁVEL

Tem sintomas de Síndrome do Intestino Irritável? (0) Não (1) Sim

Tem diagnóstico de Síndrome do Intestino Irritável? (0) Não (1) Sim

Qual a idade do diagnóstico? _____

SINTOMATOLOGIA ANTES DO TRATAMENTO/ DIETA RESTRITIVA

Como é seu hábito intestinal?

- (1) Menos de 1x ao dia
(2) 1 a até 2x/dia
(3) Mais de 3x/dia ou diarreia

Você apresenta ou já apresentou no passado diarreia por mais de 1 mês. sem uma causa definida?

- (0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou intestino preso sem uma causa definida?

- (0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou plenitude sem uma causa definida?

- (0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou empachamento ou excesso de gases sem uma causa definida?

- (0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou no passado emagrecimento expressivo (acima de 10% do seu peso corporal)?

- (0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou no passado anemia sem uma causa definida?

- (0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou no passado dores abdominais sem uma causa definida?

(0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou no passado dores articulares sem uma causa definida?

(0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou no passado dor de cabeça/ enxaqueca sem uma causa definida?

(0) Não (1) Sim

SINTOMATOLOGIA COM O TRATAMENTO/ DIETA RESTRITIVA

A quanto tempo está em tratamento/ dieta restritiva: _____

Evolução dos exames:

Como é seu hábito intestinal?

- (1) Menos de 1x ao dia
- (2) 1 a até 2x/dia
- (3) Mais de 3x/dia ou diarreia

Você apresenta ou já apresentou no passado diarreia por mais de 1 mês. sem uma causa definida?

(0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou intestino preso sem uma causa definida?

(0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou plenitude sem uma causa definida?

(0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou empachamento ou excesso de gases sem uma causa definida?

(0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou no passado emagrecimento expressivo (acima de 10% do seu peso corporal)?

(0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou no passado anemia sem uma causa definida?

(0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou no passado dores abdominais sem uma causa definida?

(0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou no passado dores articulares sem uma causa definida?

(0) Não (1) Sim

Você apresenta ou já apresentou no passado dor de cabeça/ enxaqueca sem uma causa definida?

(0) Não (1) Sim

Você apresenta alguma doença como:

- (1) Diabetes tipo I
 (2) Doenças de Tireoide (hipo ou hipertireoidismo)
 (3) Doença das Glândulas Suprarrenais
 (4) Doenças de pele como Psoríase
 (5) Alopecia Areata (queda de pelos formando halos circulares)
 (6) Dermatite herpetiforme
 (7) Síndrome de Sjögren
 (8) Fibromialgia
 (9) Outra(s): _____
 (10) Nenhuma

Idade do diagnóstico: _____

Faz uso contínuo de algum medicamento: _____

FALIMIARES E DOENÇAS

Algum parente próximo do(a) sr.(a). pais. irmãos. avós. tios. primos incluindo vivos e mortos. têm ou já tiveram:

Doença Celíaca?

(0) Não (1) Sim

Familiar: _____

Intolerância a lactose?

(0) Não (1) Sim

Familiar: _____

Síndrome do Intestino Irritável?

(0) Não (1) Sim

Familiar: _____

Diarreia sem causa definida?

(0) Não (1) Sim

Familiar: _____

Emagrecimento sem causa definida?

(0) Não (1) Sim

Familiar: _____

Anemia sem causa definida?

(0) Não (1) Sim

Familiar: _____

Diabetes tipo I?

(0) Não (1) Sim

Familiar: _____

Disfunção na tireoide?

(0) Não (1) Sim

Familiar:

Doença nas glândulas suprarenais?

(0) Não (1) Sim

Familiar:

Psoríase?

(0) Não (1) Sim

Familiar:

Alopecia areata?

(0) Não (1) Sim

Familiar:

Dermatite herpetiforme?

(0) Não (1) Sim

Familiar:

Síndrome Sjogren?

(0) Não (1) Sim

Familiar:

Fibromialgia?

(0) Não (1) Sim

Familiar:

Câncer de intestino?

(0) Não (1) Sim

Familiar:

Câncer de estômago?

(0) Não (1) Sim

Familiar:

Outra?

(0) Não (1) Sim

Familiar:

HÁBITOS ALIMENTARES**Com que frequência o(a) Sr.(a) normalmente come:****a. Alimentos enlatados/em conserva como milho. ervilha. palmito. azeitona. salsicha. massa de tomate. etc.**

|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

b. Frios. tais como presunto. mortadela. salame. presuntada. linguiça defumada. etc.
|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

c. Alimentos preparados na brasa. tipo churrasco
|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

d. Leite. incluindo achocolatados. mingaus e vitaminas preparadas com leite
|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca
Com lactose ou sem: _____

e. Derivados de leite. como iogurte. chocolate. sorvete. queijos. pudins e outros
|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca
Com lactose ou sem: _____

f. Alimentos com aveia. cevada. trigo ou centeio como pão. tortas. biscoitos. bolos
|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

g. Alimentos com muito açúcar. como refrigerantes. balas. sorvete. chocolate ao leite. bolachas. bolos
|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

h. Frutas e sucos de frutas preparados a partir da fruta. polpa ou concentrado (não considere os refrescos ou refrigerantes).
|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

i. Hortaliças e legumes crus - agrião. alface. brócolis. chicória. cenoura. espinafre. repolho. etc.
|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

j. Feijões preto. mulatinho. fradinho. roxo etc.. lentilha. ervilha seca ou grão de bico
|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

Alguma observação:

APÊNDICE F - QUESTIONÁRIO DO LEVANTAMENTO EPIDEMIOLÓGICO DAS COMUNIDADES MENONITAS

Questionário sobre Exposição ambiental e Doenças crônicas

Nome:

Endereço:

Telefone:

E-mail:

Data:

Código N°: _____

Peso: _____ **Altura:** _____ **IMC:** _____

Circunferência da cintura:

6. Pressão arterial:

Esse questionário foi respondido por:

() próprio sujeito da pesquisa () responsável pelo sujeito da pesquisa

Data de nascimento do sujeito da pesquisa: ____ \ ____ \ ____ **Sexo:** [] F [] M

Local de nascimento: _____ **Estado:** _____

Grau de escolaridade: _____ grau completo/incompleto

Religião:

Praticante: 1. Sim 2. Não

Vamos iniciar esta entrevista. fazendo perguntas sobre a sua ancestralidade (consideramos “Menonitas”. todos que compartilham a origem étnica menonita. no século XVI. por parte de pelo menos um dos genitores):

1. Classificação étnica :

(1) Euro-br. menonita (2) Euro-br. não menonita (3) Afro-br. (4) Amer. (5) Asia (6) Misto

Obs.: _____

2. Ascendência materna:

Nome da mãe: _____

Município de nascimento: _____ UF: _____

(1) Euro-br. menonita (2) Euro-br. não menonita (3) Afro-br. (4) Amer. (5) Asia (6) Misto

Obs.: _____

Caso seja ascendência Menonita:

Rota de fuga da avó materna (sobrenome de solteira:

(1). Rússia -> Alemanha -> Brasil

(2). Rússia -> Alemanha -> Paraguai

(3). Rússia -> Alemanha -> Canadá

(4). Rússia -> China -> Brasil

(5). Rússia -> China -> Paraguai

(6). Outra: _____

(7). Não sei

Rota de fuga do avô materno (sobrenome):

- (1). Rússia -> Alemanha -> Brasil
- (2). Rússia -> Alemanha -> Paraguai
- (3). Rússia -> Alemanha -> Canadá
- (4). Rússia -> China -> Brasil
- (5). Rússia -> China -> Paraguai
- (6). Outra: _____
- (7). Não sei

3. Ascendência paterna:

Nome do pai: _____

Município de nascimento: _____ UF: _____

- (1) Euro-br. menonita (2) Euro-br. não menonita (3) Afro-br. (4) Amer. (5) Asia (6) Misto
Obs.: _____

Caso seja ascendência Menonita (heredograma):**Rota de fuga da avó paterna (sobrenome de solteira):**

- (1). Rússia -> Alemanha -> Brasil
- (2). Rússia -> Alemanha -> Paraguai
- (3). Rússia -> Alemanha -> Canadá
- (4). Rússia -> China -> Brasil
- (5). Rússia -> China -> Paraguai
- (6). Outra: _____
- (7). Não sei

Rota de fuga do avô paterno (sobrenome):

- (1). Rússia -> Alemanha -> Brasil
- (2). Rússia -> Alemanha -> Paraguai
- (3). Rússia -> Alemanha -> Canadá
- (4). Rússia -> China -> Brasil
- (5). Rússia -> China -> Paraguai
- (6). Outra: _____
- (7). Não sei

7. Qual foi a ocupação que o(a) sr.(a) teve por mais tempo? Por exemplo: auxiliar de escritório. arquiteto. enfermeiro. bombeiro hidráulico. etc.

8. Onde o(a) sr.(a) trabalhava ou tinha esta atividade? Por exemplo: fábrica de cimento. faculdade particular. seção de radiologia de um hospital. laboratório de análise clínicas. etc).

9. O(a) sr.(a) tem ou já teve alguma atividade de trabalho em que ficava em contato ou respirava fumaças ou fumos. incluindo fumaça de cigarros e até de seu próprio cigarro. se for o caso?

1. Sim 2. Não (passe a 14)

10. Com que tipo de fumaças ou fumos. o(a) sr.(a) está ou esteve em contato?

a. Fumaça de Cigarro

1. Sim 2. Não (siga 10b)

b. Fumos metálicos (como exemplo: trabalho de soldagem. queima de solda)

1. Sim 2. Não (siga 10c)

c. Outras fumaças

1. Sim _____ (especifique) 2. Não
(Se 10.1 = Sim. siga para 11; caso contrário. passe ao 14)

11. Atualmente o(a) sr.(a) trabalha em ambiente fechado?

1. Sim 2. Não (siga para 14)

12. No seu local de trabalho. alguém fuma dentro da sua sala?

1. Sim 2. Não (siga para 14)

13. Quantas pessoas fumam em sua sala ou ambiente onde o(a) sr.(a) trabalha?

|_|_|_| Pessoas

14. O(a) sr.(a) tem ou já teve alguma atividade de trabalho em que ficava em contato com poeira?

1. Sim 2. Não (passe a 16)

15. Que tipo de poeira?

a. Poeira de obra

1. Sim 2. Não (siga 15b)

b. Poeira de cerâmica

1. Sim 2. Não (siga 15c)

c. Poeira de vidro

1. Sim 2. Não (siga 15d)

d. Poeira de pedreira

1. Sim 2. Não (siga 15e)

e. Poeira de rua

1. Sim 2. Não (siga 15f)

f. Poeira de tecido

1. Sim 2. Não (siga 15g)

g. Poeira de carpete

1. Sim 2. Não (siga 15h)

h. Poeira de madeira

1. Sim 2. Não (siga 15i)

i. Outras poeiras

1. Sim _____ (especifique) 2. Não

16. O(a) sr.(a) tem ou já teve alguma atividade de trabalho. em que ficava em contato com produtos químicos?

1. Sim 2. Não (siga 18)

17. Que tipos de produtos químicos?

a. Tintas

1. Sim 2. Não (siga 17b)

b. Resinas

1. Sim 2. Não (siga 17c)

c. Corantes e pigmentos

1. Sim 2. Não (siga 17d)

d. Solvente

1. Sim 2. Não (siga 17e)

e. Combustíveis/Lubrificante

1. Sim 2. Não (siga 17f)

f. Inseticidas. pesticidas e herbicidas

1. Sim 2. Não (siga 17g)

g. Preservativos de madeira

1. Sim 2. Não (siga 17h)

h. Ácidos e Cáusticos fortes

1. Sim 2. Não (siga 17i)

i. Produto para fabricação de plásticos

1. Sim 2. Não (siga 17j)

j. Produto para fabricação de borracha

1. Sim 2. Não (siga 17k)

k. Outros produtos químicos

1. Sim _____ (especifique) 2. Não

18. O(a) sr.(a) tem ou já teve alguma atividade de trabalho em que teve contato com metais pesados, como cromo, cádmio, níquel ou outros?

1. Sim 2. Não (siga a 20)

19. Que tipo de metais pesados?

a. Cromo

1. Sim 2. Não (siga 19b)

b. Cádmio

1. Sim 2. Não (siga 19c)

c. Níquel

1. Sim 2. Não (siga 19d)

d. Mercúrio

1. Sim 2. Não (siga 19e)

e. Chumbo

1. Sim 2. Não (siga 19f)

f. Outros metais pesados

1. Sim _____ (especifique) 2. Não

20. O(a) sr.(a) tem ou já teve alguma atividade de trabalho em que teve contato com algum tipo de radiação, incluindo radiação solar?

1. Sim 2. Não (siga para 22)

21. Que tipo de radiação?

a. Solar

1. Sim 2. Não (siga 21b)

b. Raio X e outras radiações ionizantes

1. Sim 2. Não (siga 21c)

c. Outras radiações

1. Sim _____ (especifique) 2. Não

22. O(a) sr.(a) fica em ambientes ensolarados por qualquer motivo, por exemplo, lazer/educação física, trabalho, atividades do lar ou quando está andando de um lugar para o outro por pelo menos 30 minutos, mesmo que de vez em quando?

1. Sim (siga 23) 2. Não (siga 24)

23. Quando o(a) sr.(a) está em um ambiente ensolarado, por mais de 30 minutos, com que frequência o(a) sr.(a) usa protetor solar ou boné, chapéu com abas ou qualquer tipo de proteção contra o sol?

1. Sempre

2. Quase sempre

3. Algumas vezes

4. Raramente

5. Nunca (siga para 24)

24. Em quantos dias de uma semana comum o(a) sr.(a) caminha por pelo menos 10 minutos seguidos em casa. no trabalho. como forma de transporte para ir de um lugar para outro. por lazer ou como forma de exercício?

Dia(s) na semana (Caso >0. siga para 25)

25. Nos dias em que o(a) sr.(a) caminha. por pelo menos 10 minutos seguidos. quanto tempo no total o(a) sr.(a) gasta caminhando?

: Horas e minutos por dia (siga 26)

26. Além da caminhada. o(a) sr.(a) faz atividades moderadas ou vigorosas. por pelo menos 10 minutos seguidos. no trabalho. por lazer. esporte. exercício ou como parte das suas atividades em casa. no quintal ou qualquer outra atividade que aumente a sua respiração ou batimentos do coração?

Alguns exemplos de atividades moderadas ou vigorosas são: andar de bicicleta. nadar. dançar. fazer ginástica aeróbica. correr. fazer esportes. carregar pesos. fazer serviços domésticos na casa ou no quintal. como varrer. aspirar. cuidar do jardim ou trabalhos como soldar. operar máquinas. empilhar caixas. usar enxada. britadeira. marreta etc.

1. Sim 2. Não (siga 27)

27. Em quantos dias de uma semana comum. o(a) sr.(a) faz essas atividades moderadas ou vigorosas. por pelo menos 10 minutos seguidos?

Dia(s) na semana (siga 28)

28. Nos dias em que o(a) sr (a) faz essas atividades moderadas ou vigorosas. por pelo menos 10 minutos seguidos. quanto tempo ao todo. o(a) sr.(a) gasta fazendo essas atividades?

: Horas e minutos por dia

Agora. vou fazer algumas perguntas sobre seus **hábitos alimentares**. Para responder. por favor. pense na sua alimentação. Lembre-se de todas as refeições - café da manhã. almoço. jantar e lanches. que o(a) Sr.(a) faz em casa ou fora de casa.

29. Quando o(a) sr.(a) come frango. o que normalmente faz com a pele:

- a. Sempre retira a pele antes de comer
- b. Na maioria das vezes retira
- c. Algumas vezes retira
- d. Quase nunca retira
- e. Nunca retira
- f. Já vem preparado sem a pele
- g. Não come frango (siga a 30)

30. Quando o(a) sr.(a) come carne vermelha. o que normalmente faz com a gordura visível:

- a. Sempre retira
- b. Na maioria das vezes retira
- c. Algumas vezes retira
- d. Quase nunca retira
- e. Nunca retira
- f. Não come carne que tenha muita gordura
- g. Não come carne nunca (siga a 30b)

30b. O(a) sr.(a) come peixe?

1. Sim 2. Não (siga 30d)

30c. Com que frequência o(a) sr.(a) come peixe?

(Preencher apenas uma opção segundo a resposta do informante (por dia, por semana ou por mês).

|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca (siga 30d)

30d. Sem contar saladas, com que frequência o(a) sr.(a) costuma colocar sal no prato de comida?

- a. Nunca coloco sal no prato de comida
 - b. Provo e coloco se estiver sem sal
 - c. Coloco quase sempre mesmo sem provar
- (siga 30e)

30e. Com que frequência o(a) Sr.(a) normalmente come...

a. Alimentos enlatados/em conserva como milho, ervilha, palmito, azeitona, salsicha, massa de tomate, etc.

|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

b. Frios, tais como presunto, mortadela, salame, presuntada, linguiça defumada, etc.

|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

c. Alimentos preparados na brasa, tipo churrasco

|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

d. Leite, incluindo achocolatados, mingaus e vitaminas preparadas com leite

|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

e. Derivados de leite, como iogurte, chocolate, sorvete, queijos, pudins e outros

|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

f. Alimentos com aveia, cevada, trigo ou centeio como pão, tortas, biscoitos, bolos

|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

g. Alimentos com muito açúcar, como refrigerantes, balas, sorvete, chocolate ao leite, bolachas, bolos

|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

h. Frutas e sucos de frutas preparados a partir da fruta, polpa ou concentrado (não considere os refrescos ou refrigerantes).

|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

i. Hortaliças e legumes crus - agrião, alface, brócolis, chicória, cenoura, espinafre, repolho, etc.

|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

j. Feijões preto, mulatinho, fradinho, roxo etc., lentilha, ervilha seca ou grão de bico

|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

k. Frituras

|_|_| vezes por |_| Dia |_| Semana |_| Mês |_| Rara./Nunca

Agora farei perguntas sobre outros hábitos.

31. Alguma vez o(a) sr.(a) já experimentou ou tentou fumar cigarros, mesmo uma ou duas tragadas?

1. Sim (passe a 32) 2. Não (passe a 37)

32. Somando todos os cigarros que o(a) sr.(a) fumou na vida inteira, o total chega a 5 maços ou 100 cigarros?

1. Sim (passe a 33) 2. Não (passe a 37)

33. Há quanto tempo o(a) sr.(a) começou a fumar cigarros, regularmente, quer dizer, pelo menos 1 cigarro por semana? (mesmo que já tenha parado)

|_|_| Anos |_|_| Meses (passe a 34)

34. Atualmente. o(a) sr.(a) fuma cigarros?

1. Sim 2. Não

(Se 34=sim. passe a 35. se 34=não. passe 36)

35. Atualmente. o(a) sr.(a) fuma cigarros diariamente?

1. Sim 2. Não

36. Em média. quantos cigarros o(a) sr.(a) fuma ou fumava por dia?

(Preencher apenas uma opção segundo a resposta do informante: Cigarros ou Maços).

1 Cigarros por dia

2 Maços por dia

37. Nos últimos 30 dias. o(a) sr.(a) consumiu alguma bebida alcoólica como cerveja. vinho. cachaça. uísque. licorês. etc?

1. Sim 2. Não (passe a 41)

38. Durante os últimos 30 dias. em quantos dias. por semana ou por mês. aproximadamente. o(a) sr.(a) consumiu bebidas alcoólicas?

1 Dias por semana

2 Dias por mês (siga a 39)

39. Nesta entrevista. consideramos uma dose de bebida alcoólica uma lata de cerveja. uma taça de vinho. um drinque ou cocktail ou uma dose de cachaça ou uísque. Sendo assim. nos dias em que o(a) sr.(a) bebeu. quantas doses. em média. o(a) sr.(a) ingeriu por dia?

Doses por dia

40. Levando em consideração todos os tipos de bebidas alcoólicas. quantas vezes nos últimos 30 dias. o(a) sr.(a) consumiu cinco ou mais copos ou doses em uma única ocasião?

Vezes Nenhuma

40b. Você se ocupa com atividades que envolvem música (cantar. ouvir. tocar)?

1. Sim. Especifique a atividade: _____ 2. Não (passe a 40)

40c. Você canta ou assobia...

vezes por Dia Semana Mês Rara./Nunca

40d. Você toca um instrumento musical...

vezes por Dia Semana Mês Rara./Nunca

40e. Você ouve música...

vezes por Dia Semana Mês Rara./Nunca

40f. Você dança...

vezes por Dia Semana Mês Rara./Nunca

40g. Você aprendeu o gosto pela música com a sua família?

1. Sim 2. Não (passe a 40h)

40h. Como você classifica o ambiente familiar da sua infância?

a. Caloroso (muito carinho e abraços)

b. Moderado (disciplinado)

c. Frio (distante) (passe a 40i)

40i. Você fala uma língua diferente do português?

1. Sim. Especifique a(s) língua(s): _____ 2. Não (passe a 40h)

Agora farei perguntas sobre sua saúde.

41. De um modo geral, em comparação a pessoas da sua idade, como o(a) Sr.(a) considera o seu próprio estado de saúde?

- a. Excelente
- b. Muito Bom
- c. Bom
- d. Regular
- e. Ruim

42. Algum médico já lhe disse que o(a) sr.(a) tem ou teve algumas das seguintes doenças infecciosas?

- a. Hepatite B
 1. Sim 2. Não (passe a 42b)
- b. Hepatite C
 1. Sim 2. Não (passe a 42c)
- c. Tuberculose
 1. Sim 2. Não (passe a 42d)
- d. Malária
 1. Sim 2. Não (passe a 42e)
- e. Hanseníase
 1. Sim 2. Não (passe a 42f)
- f. HIV/AIDS
 1. Sim 2. Não (passe a 42g)
- g. Dengue
 1. Sim 2. Não (passe a 42h)
- h. Zica
 1. Sim 2. Não (passe a 42i)
- i. Chikungunya
 1. Sim 2. Não (passe a 42j)
- j. Doença de Chagas
 1. Sim 2. Não (passe a 42k)
- k. HTLV
 1. Sim 2. Não (passe a 42l)

k. Outra _____ (especifique) (passe a 42m)

42m. Quando foi a última vez que o(a) sr(a) avaliou o funcionamento do fígado, por um exame laboratorial (por ex., níveis de alcalino fosfatase (ALP), aspartatoaminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT), ou a bilirrubina no sangue)?

1. Há menos de 6 meses
2. Entre 6 meses e menos de 1 ano
3. Entre 1 ano e menos de 2 anos
4. Entre 2 anos e menos de 3 anos
5. Há 3 anos ou mais
6. Nunca fez (passe a 42n)

42n. Quando foi a última vez que o(a) sr(a) avaliou o funcionamento do rim, medindo a creatinina no sangue?

1. Há menos de 6 meses

2. Entre 6 meses e menos de 1 ano
3. Entre 1 ano e menos de 2 anos
4. Entre 2 anos e menos de 3 anos
5. Há 3 anos ou mais
6. Nunca fez (passe a Q1)

Q1. Quando foi a última vez que o(a) sr(a) teve sua pressão arterial medida?

1. Há menos de 6 meses
2. Entre 6 meses e menos de 1 ano
3. Entre 1 ano e menos de 2 anos
4. Entre 2 anos e menos de 3 anos
5. 3 anos ou mais
6. Nunca

(Se Q1=1 a 5. siga Q2. Se Q1=6. passe ao Q29.)

Q2. Algum médico já lhe deu o diagnóstico de hipertensão arterial (pressão alta)?

1. Sim
2. Apenas durante a gravidez (só para mulheres)
3. Não

(Se Q2=1. siga Q3. Se Q2=2 ou 3. passe ao Q29.)

Q3. Que idade o(a) sr(a) tinha no primeiro diagnóstico de hipertensão arterial (pressão alta)?

0. Menos de 1 ano

___ Anos (siga Q6)

Q6. Nas duas últimas semanas. o(a) sr(a) tomou medicamentos por causa da hipertensão arterial (pressão alta)?

1. Sim 2. Não (siga Q19)

Q19. Em algum dos atendimentos para hipertensão arterial foi pedido algum exame?

a. Exame de sangue (colesterol. glicemia. triglicérides)

1. Sim 2. Não (siga Q19b)

b. Exame de urina

1. Sim 2. Não (siga Q19c)

c. Eletrocardiograma

1. Sim 2. Não (siga Q19d)

d. Teste de esforço

1. Sim 2. Não (siga Q19e)

e. 1. Sim _____ (especifique) 2. Não

(Se todos os itens forem 2. siga Q26. Caso contrário. passe ao Q20)

Q20. O(A) sr(a) fez todos os exames solicitados?

1. Sim 2. Não (siga ao Q26)

Q26. Alguma vez o(a) sr(a) se internou por causa da hipertensão ou de alguma complicação?

1. Sim 2. Não

(Se Q26=1. siga a Q27. Se Q26=2. passe ao Q28.)

Q27. Há quanto tempo foi a última internação por causa da hipertensão ou de alguma complicação?

1. Há menos de 6 meses
2. Entre 6 meses e menos de 1 ano
3. Entre 1 ano e menos de 2 anos

4. Entre 2 anos e menos de 3 anos

5. Há 3 anos ou mais

(siga Q28)

Q28. Em geral, em que grau a hipertensão ou alguma complicação da hipertensão limita as suas atividades habituais (como trabalhar, estudar, realizar afazeres domésticos, etc)?

1. Não limita

2. Um pouco

3. Moderadamente

4. Intensamente

5. Muito intensamente

(siga Q28b)

Q28b. Algum parente próximo do(a) sr.(a), avós, pais e irmãos incluindo vivos e mortos, têm ou já tiveram hipertensão?

1. Sim 2. Não (siga Q28c)

Q28c. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique) (siga Q29)

Q29. Quando foi a última vez que o(a) sr(a) fez exame de sangue para medir a glicemia, isto é, o açúcar no sangue?

1. Há menos de 6 meses

2. Entre 6 meses e menos de 1 ano

3. Entre 1 ano e menos de 2 anos

4. Entre 2 anos e menos de 3 anos

5. Há 3 anos ou mais

6. Nunca fez

(Se Q29=1 a 5, siga Q30. Se Q29=6, passe ao Q59.)

Q30. Algum médico já lhe deu o diagnóstico de diabetes?

1. Sim

2. Apenas durante a gravidez (só para mulheres)

3. Não

(Se Q30=1, siga Q31. Se Q30=2 ou 3, passe ao Q59.)

Q31. Que idade o(a) sr(a) tinha no primeiro diagnóstico de diabetes?

0. Menos de 1 ano

___ Anos (siga Q31b)

Q31b. Qual o tipo de diabetes?

1. Tipo 1
2. Tipo 2
3. Não sei

(Se Q32=1 ou 2. passe ao Q34. se Q32=3. passe ao Q59)

Q34. Nas duas últimas semanas. por causa do diabetes. o(a) sr(a):

a. Tomou medicamentos orais para baixar o açúcar?

1. Sim 2. Não (siga Q34b)

b. Usou insulina?

1. Sim 2. Não (passe ao Q39)

Q39. Quando foi a última vez que o(a) sr(a) recebeu assistência médica por causa do diabetes?

1. Há menos de 6 meses
2. Entre 6 meses e menos de 1 ano
3. Entre 1 ano e menos de 2 anos
4. Entre 2 anos e menos de 3 anos
5. Há 3 anos ou mais
6. Nunca recebeu

(siga Q46)

Q46. Em algum dos atendimentos para diabetes. algum médico ou outro profissional de saúde lhe deu alguma dessas recomendações?

a. Manter uma alimentação saudável (com frutas e vegetais)

1. Sim 2. Não (siga Q46b)

b. Manter o peso adequado

1. Sim 2. Não (siga Q46c)

c. Praticar atividade física regular

1. Sim 2. Não (siga Q46d)

d. Não fumar

1. Sim 2. Não (siga Q46e)

e. Não beber em excesso

1. Sim 2. Não (siga Q46f)

f. Diminuir o consumo de carboidratos (massas. pães etc.)

1. Sim 2. Não (siga Q46g)

g. Medir a glicemia em casa

1. Sim 2. Não (siga Q46h)

h. Examinar os pés regularmente

1. Sim 2. Não (siga Q46i)

i. Outra recomendação

1. Sim _____ (especifique) 2. Não (siga Q47)

Q47. Em algum dos atendimentos para diabetes foi pedido algum exame?

a. Exame de sangue (colesterol. glicemia. triglicerídeos)

1. Sim 2. Não (siga Q47b)

b. Hemoglobina glicada

1. Sim 2. Não (siga Q47c)

c. Curva glicêmica

1. Sim 2. Não (siga Q47d)

d. Exame de urina

1. Sim 2. Não (siga Q47e)

e. Outra recomendação

1. Sim _____ (especifique) 2. Não

(Se todos os itens forem = 2. passe ao Q50. Caso contrário. siga Q48)

Q48. O(A) sr(a) fez todos os exames solicitados?

1. Sim 2. Não (passe ao Q53)

Q53. Quando foi a última vez que realizaram um exame de vista ou fundo de olho em que dilataram sua pupila?

1. Há menos de 6 meses

2. Entre 6 meses e menos de 1 ano

3. Entre 1 ano e menos de 2 anos

4. Entre 2 anos e menos de 3 anos

5. Há 3 anos ou mais

6. Nunca fez

(siga Q54)

Q54. Quando foi a última vez que um médico ou profissional de saúde examinou seus pés para verificarsensibilidade ou presença de feridas ou irritações?

1. Há menos de 6 meses

2. Entre 6 meses e menos de 1 ano

3. Entre 1 ano e menos de 2 anos

4. Entre 2 anos e menos de 3 anos

5. Há 3 anos ou mais

6. Nunca teve os pés examinados (siga Q55)

Q55. O(A) sr(a) tem ou teve alguma destas complicações por causa do diabetes?

a. Problemas na vista

1. Sim 2. Não (siga Q55b)

b. Infarto

1. Sim 2. Não (siga Q55c)

c. AVC (Acidente Vascular cerebral) ou derrame

1. Sim 2. Não (siga Q55d)

d. Outro problema circulatório

1. Sim 2. Não (siga Q55e)

e. Problema nos rins

1. Sim 2. Não (siga Q55f)

f. Úlcera/ferida nos pés

1. Sim 2. Não (siga Q55g)

g. Amputação de membros (pés. pernas. mãos ou braços)

1. Sim 2. Não (siga Q55h)

h. Coma diabético

1. Sim 2. Não (siga Q55i)

i. Outra complicação

1. Sim _____ (especifique) 2. Não (siga Q56)

Q56. Alguma vez o(a) sr(a) se internou por causa do diabetes ou de alguma complicação?

1. Sim 2. Não

(Se Q56=1. siga Q57. Se Q56=2. passe ao Q58.)

Q57. Há quanto tempo foi a última internação por causa do diabetes ou de alguma complicação?

1. Há menos de 6 meses
2. Entre 6 meses e menos de 1 ano
3. Entre 1 ano e menos de 2 anos
4. Entre 2 anos e menos de 3 anos
5. Há 3 anos ou mais

(siga Q58)

Q58. Em geral, em que grau o diabetes ou alguma complicação do diabetes limita as suas atividades habituais (tais como trabalhar, realizar afazeres domésticos, etc.)?

1. Não limita
2. Um pouco
3. Moderadamente
4. Intensamente
5. Muito intensamente

(siga Q58b)

Q58b. Algum parente próximo do(a) sr.(a), avós, pais e irmãos incluindo vivos e mortos, têm ou já tiveram este tipo de diabetes?

1. Sim 2. Não (siga Q59)

Q58c. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique) (siga Q59)

Q59. Quando foi a última vez que o(a) sr(a) fez exame de sangue para medir o colesterol e triglicerídeos?

1. Há menos de 6 meses
2. Entre 6 meses e menos de 1 ano
3. Entre 1 ano e menos de 2 anos
4. Entre 2 anos e menos de 3 anos
5. Há 3 anos ou mais
6. Nunca fez

(Se Q59=1 ao 5. siga Q60. Se Q59=6. passe ao Q63.)

Q60. Algum médico já lhe deu o diagnóstico de colesterol alto?

1. Sim 2. Não

(Se Q60=1. siga Q61. Se Q60=2. passe ao Q63.)

Q61. Que idade o(a) sr(a) tinha no primeiro diagnóstico de colesterol alto?

0. Menos de 1 ano

___ Anos (siga Q62)

Q62. Algum médico ou outro profissional de saúde lhe deu algumas das seguintes recomendações por causa do colesterol alto?

a. Manter uma alimentação saudável (com frutas e vegetais)

1. Sim 2. Não (siga Q62b)

b. Manter o peso adequado

1. Sim 2. Não (siga Q62c)

c. Prática de atividade física

1. Sim 2. Não (siga Q62d)

d. Tomar medicamentos

1. Sim 2. Não (siga Q62e)

e. Não fumar

1. Sim 2. Não (siga Q62f)

f. Fazer acompanhamento regular

1. Sim 2. Não (siga Q63)

Q63. Algum médico já lhe deu o diagnóstico de uma doença do coração, tais como infarto, angina, insuficiência cardíaca ou outra?

1. Sim 2. Não

(Se Q63= 2. passe ao Q68. Caso contrário. siga para os itens abaixo.)

a. Infarto

1. Sim 2. Não (siga Q63b)

b. Angina

1. Sim 2. Não (siga Q63c)

c. Insuficiência cardíaca

1. Sim 2. Não (siga Q63d)

d. Outro diagnóstico

1. Sim _____ (especifique) 2. Não

(Se todas = 2. passe ao Q68. Caso contrário. siga Q64.)

Q64. Que idade o(a) sr(a) tinha no primeiro diagnóstico da doença do coração?

0. Menos de 1 ano

___ Anos

Q65. O que o(a) sr(a) faz atualmente por causa da doença do coração?

a. Dieta

1. Sim 2. Não (siga Q65b)

b. Prática de atividade física

1. Sim 2. Não (siga Q65c)

c. Toma medicamentos

1. Sim 2. Não (siga Q65d)

d. Outra atitude

1. Sim _____ (especifique) 2. Não (siga Q66)

Q66. O(A) sr(a) já fez alguma cirurgia de ponte de safena ou colocação de stent ou angioplastia?

1. Sim 2. Não (siga Q67)

Q67. Em geral, em que grau a doença do coração limita as suas atividades habituais (tais como trabalhar, realizar afazeres domésticos, etc.)?

1. Não limita
2. Um pouco
3. Moderadamente
4. Intensamente
5. Muito intensamente

(siga Q67b)

Q67b. Algum parente próximo do(a) sr.(a). avós, pais e irmãos incluindo vivos e mortos, têm ou já tiveram doenças do coração?

1. Sim 2. Não (siga Q68)

Q68c. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique) (siga Q68)

Q68. Algum médico já lhe deu o diagnóstico de AVC (Acidente Vascular cerebral) ou derrame?

1. Sim 2. Não

(Se Q68=2, passe ao Q74. Se Q68=1, siga Q69.)

Q69. Quantos derrames (ou AVC) o(a) sr(a) já teve?

___ Derrames (siga Q70)

Q70. Que idade o(a) sr(a) tinha no primeiro diagnóstico do derrame (ou AVC)?

0. Menos de 1 ano

___ Anos (siga Q71)

Q71. Por causa do derrame (ou AVC), o(a) sr(a) realizou tomografia ou ressonância da cabeça?

1. Sim 2. Não (siga Q72)

Q72. O que o(a) sr(a) faz atualmente por causa do derrame (ou AVC)?

a. Dieta

1. Sim 2. Não (siga Q72b)

b. Fisioterapia

1. Sim 2. Não (siga Q72c)

c. Outras terapias de reabilitação

1. Sim 2. Não (siga Q72d)

d. Toma aspirina

1. Sim 2. Não (siga Q72e)

e. Toma outros medicamentos

1. Sim 2. Não (siga Q72f)

f. Outra atitude

1. Sim _____ (especifique) 2. Não (siga Q73)

Q73. Em geral, em que grau o derrame (ou AVC) limita as suas atividades habituais (tais como trabalhar, realizar afazeres domésticos, etc.)?

1. Não limita

2. Um pouco

3. Moderadamente

4. Intensamente

5. Muito intensamente

(Siga Q73b)

Q73b. Algum parente próximo do(a) sr.(a). avós, pais e irmãos incluindo vivos e mortos, têm ou já tiveram AVC?

1. Sim 2. Não (siga Q78)

Q73c. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique) (siga Q74)

Q74. Algum médico já lhe deu o diagnóstico de asma (ou bronquite asmática)?

1. Sim 2. Não

(Se Q74=1. siga Q75. Se Q74=2. passe ao Q79.)

Q75. Que idade o(a) sr(a) tinha no primeiro diagnóstico de asma?

0. Menos de 1 ano

___ Anos (siga Q76)

Q76. Nos últimos 12 meses, o(a) sr(a) teve alguma crise de asma?

1. Sim 2. Não

(Se Q76=1. siga Q77. Se Q76=2. passe ao Q79.)

Q77. O que o(a) sr(a) faz atualmente por causa da asma?

a. Usa medicamentos (inaladores, aerossol ou comprimidos)

1. Sim 2. Não (siga Q77a)

b. Outra atitude

1. Sim _____ (especifique) 2. Não (siga Q78)

Q78. Em geral, em que grau a asma limita as suas atividades habituais (tais como trabalhar, realizar afazeres domésticos, etc.)?

1. Não limita
2. Um pouco
3. Moderadamente
4. Intensamente
5. Muito intensamente

(siga Q78b)

Q78b. Algum parente próximo do(a) sr.(a). avós, pais e irmãos incluindo vivos e mortos, têm ou já tiveram asma?

1. Sim 2. Não (siga Q79)

Q78c. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique) (siga Q79)

Q79. Algum médico já lhe deu o diagnóstico de artrite ou reumatismo?

1. Sim 2. Não

(Se Q79=1, siga Q80. Se Q79=2, passe ao Q84.)

Q80. Que idade o(a) sr(a) tinha no primeiro diagnóstico de artrite ou reumatismo?

0. Menos de 1 ano

___ Anos (siga Q81)

Q81. O que o(a) sr(a) faz atualmente por causa da artrite ou reumatismo?

a. Exercício ou atividade física

1. Sim 2. Não (siga Q81b)

b. Fisioterapia

1. Sim 2. Não (siga Q81c)

c. Usa medicamentos ou injeções

1. Sim 2. Não (siga Q81d)

d. Faz acupuntura

1. Sim 2. Não (siga Q81e)

e. Outra atitude

1. Sim _____ (especifique) 2. Não (siga Q82)

Q82. O(A) sr(a) já fez alguma cirurgia por causa da artrite ou reumatismo?

1. Sim 2. Não (siga Q83)

Q83. Em geral, em que grau a artrite ou reumatismo limita as suas atividades habituais (tais como trabalhar, realizar afazeres domésticos, etc.)?

1. Não limita
2. Um pouco
3. Moderadamente
4. Intensamente
5. Muito intensamente

(siga Q83b)

Q83b. Algum parente próximo do(a) sr.(a). avós, pais e irmãos incluindo vivos e mortos, têm ou já tiveram artrite?

1. Sim 2. Não (siga Q84)

Q83c. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique) (siga Q84)

Q84. O(a) sr(a) tem algum problema crônico de coluna, como dor crônica nas costas ou no pescoço, lombalgia, dor ciática, problemas nas vértebras ou disco?

1. Sim 2. Não

(Se Q84=1, siga ao Q85. Se Q84=2, passe ao Q88.)

Q85. Que idade o(a) sr(a) tinha quando começou o problema na coluna?

0. Menos de 1 ano

___ Anos (siga Q86)

Q86. O que o(a) sr(a) faz atualmente por causa do problema na coluna?

a. Exercício ou fisioterapia

1. Sim 2. Não (siga Q86b)

b. Usa medicamentos ou injeções

1. Sim 2. Não (siga Q86c)

c. Faz acupuntura

1. Sim 2. Não (siga Q86d)

d. Outra atitude

1. Sim _____ (especifique) 2. Não (siga Q87)

Q87. Em geral, em que grau o problema na coluna limita as suas atividades habituais (tais como trabalhar, realizar afazeres domésticos, etc.)?

1. Não limita
2. Um pouco
3. Moderadamente
4. Intensamente
5. Muito intensamente

(siga Q87b)

Q87b. Algum parente próximo do(a) sr.(a). avós, pais e irmãos incluindo vivos e mortos, têm ou já tiveram problemas na coluna?

1. Sim 2. Não (siga Q88)

Q87c. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique) (siga Q88)

Q88. Algum médico já lhe deu o diagnóstico de DORT (distúrbio osteomuscular relacionado ao trabalho)?

1. Sim 2. Não

(Se Q88=1, siga Q89. Se Q88=2, passe ao Q92.)

Q89. Que idade o(a) sr(a) tinha no primeiro diagnóstico de DORT?

0. Menos de 1 ano

___ Anos (siga Q90)

Q90. O que o(a) sr(a) faz atualmente por causa do DORT?

a. Exercício ou fisioterapia

1. Sim 2. Não (siga Q90b)

b. Usa medicamentos ou injeções

1. Sim 2. Não (siga Q90c)

c. Faz acupuntura

1. Sim 2. Não (siga Q90d)

d. Outra atitude

1. Sim _____ (especifique) 2. Não (siga Q91)

Q91. Em geral, em que grau o DORT limita as suas atividades habituais (tais como trabalhar, realizar afazeres domésticos, etc.)?

1. Não limita

2. Um pouco
 3. Moderadamente
 4. Intensamente
 5. Muito intensamente
- (siga Q91b)

Q91b. Algum parente próximo do(a) sr.(a). avós, pais e irmãos incluindo vivos e mortos, têm ou já tiveram DORT?

1. Sim 2. Não (siga Q92)

Q91c. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique) (siga Q92)

Q92. Algum médico ou profissional de saúde mental (como psiquiatra ou psicólogo) já lhe deu o diagnóstico de depressão?

1. Sim 2. Não

(Se Q92=1. siga Q93. Se Q92=2. passe ao Q110.)

Q93. Que idade o(a) sr(a) tinha no primeiro diagnóstico de depressão?

0. Menos de 1 ano

___ Anos (siga Q94)

Q94. O(A) sr(a) vai ao médico/serviço de saúde regularmente por causa da depressão?

1. Sim

2. Não. só quando tem algum problema

3. Nunca vai

(siga Q96)

Q96. Quais tratamentos o(a) sr(a) faz atualmente por causa da depressão?

a. Faz psicoterapia

1. Sim 2. Não (siga Q96b)

b. Toma medicamentos

1. Sim 2. Não (siga Q96c)

c. Outro tratamento

1. Sim _____ (especifique) 2. Não (siga Q101)

Q101. Quando foi a última vez que o(a) sr(a) recebeu assistência médica por causa da depressão?

1. Há menos de 6 meses

2. Entre 6 meses e menos de 1 ano
3. Entre 1 ano e menos de 2 anos
4. Entre 2 anos e menos de 3 anos
5. Há 3 anos ou mais
6. Nunca recebeu

(Se Q101=1 ao 5. siga ao Q106. Se Q101=6. passe ao Q109.)

Q106. Em algum dos atendimentos para depressão, houve encaminhamento para algum acompanhamento com profissional de saúde mental, como psiquiatra ou psicólogo?

1. Sim
 2. Não
 3. Não houve encaminhamento, pois todas as consultas para depressão foram com profissional de saúde mental
- (siga Q109)

Q109. Em geral, em que grau a depressão limita as suas atividades habituais (tais como trabalhar, realizar afazeres domésticos, etc.)?

1. Não limita
2. Um pouco
3. Moderadamente
4. Intensamente
5. Muito intensamente

(siga Q109b)

Q109b. Algum parente próximo do(a) sr.(a), avós, pais e irmãos incluindo vivos e mortos, têm ou já tiveram depressão?

1. Sim 2. Não (siga Q110)

Q109c. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique) (siga Q110)

Q110. Algum médico ou profissional de saúde mental (como psiquiatra ou psicólogo) já lhe deu o diagnóstico de outra doença mental, como esquizofrenia, transtorno bipolar, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, psicose ou TOC (Transtorno Obsessivo Compulsivo)?

1. Sim 2. Não

(Se Q110=2. passe ao Q116. Caso contrário, siga para os itens abaixo.)

- a. Esquizofrenia

1. Sim 2. Não (siga Q110b)

b. Transtorno bipolar

1. Sim 2. Não (siga Q110c)

c. TOC (Transtorno obsessivo compulsivo)

1. Sim 2. Não (siga Q110d)

d. Doença de Alzheimer

1. Sim 2. Não (siga Q110e)

d. Doença de Parkinson

1. Sim 2. Não (siga Q110f)

f. Outra doença

1. Sim _____ (especifique) 2. Não

(Se todas = 2. passe ao Q116. Caso contrário. siga Q111.)

Q111. Que idade o(a) sr(a) tinha no primeiro diagnóstico desta doença mental?

0. Menos de 1 ano

___ Anos (siga a Q112)

Q112. O(A) sr(a) visita o médico/serviço de saúde regularmente por causa dessa doença mental?

1. Sim 2. Não 3. Não. só quando tenho algum problema (siga Q114)

Q114. Quais tratamentos o(a) sr(a) faz atualmente por causa da doença mental?

a. Faz psicoterapia

1. Sim 2. Não (siga Q114b)

b. Usa medicamentos ou injeções

1. Sim 2. Não (siga Q114c)

c. Outro tratamento

1. Sim _____ (especifique) 2. Não

Q115. Em geral, em que grau essa doença mental limita as suas atividades habituais (tais como trabalhar, realizar afazeres domésticos, etc.)?

1. Não limita

2. Um pouco

3. Moderadamente

4. Intensamente

5. Muito intensamente

(siga Q115b)

Q115b. Algum parente próximo do(a) sr.(a). avós, pais e irmãos incluindo vivos e mortos, têm ou já tiveram esta mesma doença mental?

1. Sim 2. Não (siga Q116)

Q115c. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique) (siga Q116)

Q116. Algum médico já lhe deu o diagnóstico de alguma doença no pulmão. tais como enfisema pulmonar, bronquite crônica ou DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica)?

1. Sim 2. Não

(Se Q116= 2. passe ao Q120. Caso contrário. siga para os itens abaixo.)

a. Enfisema pulmonar

1. Sim 2. Não (siga Q116b)

b. Bronquite crônica

1. Sim 2. Não (siga Q116c)

c. Outro (Especifique: _____)

1. Sim 2. Não

(Se todas = 2. passe ao Q120. Caso contrário. siga Q117.)

Q117. Que idade o(a) sr(a) tinha no primeiro diagnóstico da doença no pulmão?

0. Menos de 1 ano

___ Anos (siga Q118)

Q118. O que o(a) sr(a) faz atualmente por causa da doença no pulmão?

a. Usa medicamentos (inaladores, aerossol ou comprimidos)

1. Sim 2. Não (siga Q118b)

b. Usa oxigênio

1. Sim 2. Não (siga Q118c)

c. Fisioterapia respiratória

1. Sim 2. Não (siga Q118d)

d. Outro tratamento

1. Sim _____ (especifique) 2. Não (siga Q119)

Q119. Em geral, em que grau a doença do pulmão limita as suas atividades habituais (tais como trabalhar, realizar afazeres domésticos etc.)?

1. Não limita

2. Um pouco

3. Moderadamente

4. Intensamente

5. Muito intensamente

(siga Q119b)

Q119b. Algum parente próximo do(a) sr.(a). avós, pais e irmãos incluindo vivos e mortos, têm ou já tiveram doença do pulmão?

1. Sim 2. Não (siga Q120)

Q119c. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique) (siga Q120)

Q120. Algum médico já lhe deu algum diagnóstico de câncer?

1. Sim 2. Não

(Se Q120=1. siga Q121. Se Q120=2. passe ao Q124.)

Q121. No primeiro diagnóstico de câncer. que tipo de câncer o(a) sr(a) tem ou teve?

1. Pulmão

2. Intestino

3. Estômago

4. Mama (só para mulheres)

5. Colo de útero (só para mulheres)

6. Próstata (só para homens)

7. Pele

8. Outro (Especifique: _____)

(siga Q122)

Q122. Que idade o(a) sr(a) tinha no primeiro diagnóstico de câncer?

0. Menos de 1 ano

___ Anos (siga Q123)

Q123. Em geral. em que grau o câncer ou algum problema provocado pelo câncer limita as suas atividades habituais (tais como trabalhar. realizar afazeres domésticos. etc.)?

1. Não limita

2. Um pouco

3. Moderadamente

4. Intensamente

5. Muito intensamente

(siga Q123b)

Q123b. Algum parente próximo do(a) sr.(a). avós. pais e irmãos incluindo vivos e mortos. têm ou já tiveram câncer?

1. Sim 2. Não (siga Q124)

Q123c. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique)

Q124. Algum médico já lhe deu o diagnóstico de insuficiência renal crônica?

1. Sim 2. Não

(Se Q124=1. siga Q125. Se Q124=2. passe ao Q127b.)

Q125. Que idade o(a) sr(a) tinha no primeiro diagnóstico de insuficiência renal crônica?

0. Menos de 1 ano

___ Anos (siga Q126)

Q126. O que o(a) sr(a) faz ou fez por causa da insuficiência renal crônica?

a. Toma medicamentos

1. Sim 2. Não (siga Q126b)

b. Hemodiálise

1. Sim 2. Não (siga Q126c)

c. Diálise peritoneal

1. Sim 2. Não (siga Q126d)

d. Fez transplante de rim

1. Sim 2. Não (siga Q126e)

e. Outra atitude

1. Sim _____ (especifique) 2. Não (siga Q127)

Q127. Em geral, em que grau a insuficiência renal crônica limita as suas atividades habituais (tais como trabalhar, realizar afazeres domésticos, etc.)?

1. Não limita

2. Um pouco

3. Moderadamente

4. Intensamente

5. Muito intensamente

(siga Q127b)

Q127b. Algum parente próximo do(a) sr.(a), avós, pais e irmãos incluindo vivos e mortos, têm ou já tiveram insuficiência renal crônica?

1. Sim 2. Não (siga Q128)

Q127c. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique) (siga Q127b)

Q127b. *Algum médico já lhe deu o diagnóstico de Doença Celíaca?*

1. Sim 2. Não (siga Q127c)

Q127c. *Como é seu hábito intestinal ?*

a. Menos de 1 x ao dia

b. 1 a até 2x/dia

c. Mais de 3x/dia ou diarreia (siga Q127d)

Q127d. *Você apresenta ou já apresentou no passado diarreia por mais de 1 mês. sem uma causa definida?*

1. Sim 2. Não (siga Q127e)

Q127e. *Você apresenta ou já apresentou no passado emagrecimento expressivo (acima de 10% do seu peso corporal)?*

1. Sim 2. Não (siga Q127f)

Q127f. *Você apresenta ou já apresentou no passado anemia sem uma causa definida?*

1. Sim 2. Não (siga Q127g)

Q127g. *Você possui sintomas como: plenitude. empachamento ou excesso de gases. dores abdominais ou intestino preso?*

1. Sim. Especifique: _____ 2. Não (siga Q127h)

Q127h. *Você apresenta alguma doença como: Diabetes tipo I. Doenças de Tireoide (hipo ou hipertireoidismo). Doença das Glândulas Suprarrenais. Doenças de pele como Psoríase. Alopecia Areata (queda de pelos formando halos circulares). dermatite herpetiforme?*

1. Sim. Especifique: _____ 2. Não (siga Q127i)

Q127i. *Você já apresentou dores articulares (dores nas juntas) ou artrite (aumento de volume. com dor e aumento de temperatura nas articulações) por um período superior a 1 mês. sem uma causa definida?*

1. Sim 2. Não (siga Q127j)

Q127j. *Atualmente você utiliza algum medicamento de uso contínuo ?*

1. Sim. Especifique: _____ 2. Não (siga Q127k)

Q127k. *Algum parente próximo do(a) sr.(a). avós. pais e irmãos incluindo vivos e mortos. têm ou já tiveram doença celíaca?*

1. Sim 2. Não (siga Q127m)

Q127l. *Que parentes?*

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique) (siga Q127m)

Q127m. Algum parente próximo do(a) sr.(a). avós. pais e irmãos incluindo vivos e mortos. têm ou já tiveram histórico de diarreia sem uma causa definida. emagrecimento sem uma causa definida? Anemia sem causa definida. ou doenças articulares (nas juntas). de tireoide. diabetes tipo I ou de pele como psoríase?

1. Sim Especifique: _____ 2. Não (siga Q127o)

Q127n. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique) (siga Q127o)

Q127o. Algum médico já lhe deu o diagnóstico de intolerância à lactose?

1. Sim 2. Não (siga Q127p)

Q127p. Você já fez um teste de intolerância à lactose?

1. Sim 2. Não (siga Q127q)

Q127q. Algum médico já lhe deu o diagnóstico de síndrome do intestino irritável?

1. Sim 2. Não (siga Q128)

Q128. Algum médico já lhe deu algum diagnóstico de outra doença crônica. física ou mental. ou doença de longa duração (de mais de 6 meses de duração)?

1. Sim 2. Não

(Se Q128=1. siga Q129. Se Q128=2. passe ao Q132.)

Q129. O(A) sr(a) pode me dizer qual? (No caso de mais de uma. escolha a principal)

(siga Q130)

Q130. Que idade o(a) sr(a) tinha no primeiro diagnóstico?

0. Menos de 1 ano

____ Anos (siga Q131)

Q131. Em geral. em que grau esta doença limita suas atividades habituais (tais como trabalhar. realizar afazeres domésticos. etc.)?

1. Não limita
2. Um pouco
3. Moderadamente
4. Intensamente
5. Muito intensamente

(siga Q131b)

Q131b. Algum parente próximo do(a) sr.(a). avós. pais e irmãos incluindo vivos e mortos. têm ou já tiveram esta doença?

1. Sim 2. Não (siga Q132)

Q131c. Que parentes?

a. Pai

1. Sim 2. Não 3. Não sei

b. Mãe

1. Sim 2. Não 3. Não sei

c. Avô materno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

d. Avó materna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

e. Avô paterno

1. Sim 2. Não 3. Não sei

f. Avó paterna

1. Sim 2. Não 3. Não sei

g. Irmão/Irmã

1. Sim 2. Não 3. Não sei

h. Outro: _____ (especifique)