

NICOLE SELLESKI

**PREVALÊNCIA DE ALELOS HLA
PREDISPONENTES PARA A DOENÇA CELÍACA
(HLA-DQ2 e HLA-DQ8) EM CRIANÇAS
CELÍACAS E NÃO CELÍACAS**

BRASÍLIA, 2015

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sp

Selleski, Nicole

PREVALÊNCIA DE ALELOS HLA PREDISPOANTES PARA A
DOENÇA CELÍACA (HLA-DQ2 e HLA-DQ8) EM CRIANÇAS
CELÍACAS E NÃO CELÍACAS / Nicole Selleski;
orientador Riccardo Pratesi. -- Brasília, 2015.
71 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências da
Saúde) -- Universidade de Brasília, 2015.

1. Alelos HLA predisponentes para doença celiaca.
I. Pratesi, Riccardo, orient. II. Título.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

NICOLE SELLESKI

**PREVALÊNCIA DE ALELOS HLA PREDISPONETES PARA
A DOENÇA CELÍACA (HLA-DQ2 e HLA-DQ8) EM CRIANÇAS
CELÍACAS E NÃO CELÍACAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Riccardo Pratesi

BRASÍLIA, 2015

NICOLE SELLESKI

**PREVALÊNCIA DE ALELOS HLA PREDISPOANTES PARA A
DOENÇA CELÍACA (HLA-DQ2 e HLA-DQ8) EM CRIANÇAS
CELÍACAS E NÃO CELÍACAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 10 de Julho de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Riccardo Pratesi (Presidente)

UnB

Mariana Machado Hecht (Membro)

UnB

Carlos Eduardo Speck Martins (Membro)

Hospital Sarah Kubitschek

Angelica Amorim Amato (Suplente)

UnB

***Dedico este trabalho a meu avô Frani (Francisco Selleski). por ter me ensinado
que com esforço tudo é possível.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais (Laura e Tito) por ter me criado com muito amor y paciência, por ter me dado uma boa educação e incentivado a cumprir meus sonhos.

Agradeço à minha irmã Michelle por ser a minha companheira de vida, uma amiga incondicional e cúmplice nos momentos mais felizes e nos mais difíceis também.

Ao meu orientador professor Dr. Riccardo Pratesi por ter me dado a oportunidade de cumprir meu sonho e ter me guiado e compartilhado todos os seus conhecimentos nesse curto tempo. Aprendi muito com ele tanto do âmbito laboral como da vida em geral, um verdadeiro exemplo.

À professora Dr. Lenora Gandolfi por ter me recebido e integrado com tanto carinho. Por me permitir fazer parte do mundo da doença celíaca, desde o ambulatório e laboratório. Por ter compartilhado todos os seus conhecimentos e ampla experiência comigo, me ensinando com muita paciência e dedicação.

À professora Dr. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega por ter me ajudado muito inclusive antes de me conhecer, por ter me recebido com muito carinho e ensinado e guiado durante esses dois anos compartilhando seus conhecimentos.

Agradeço aos meus colegas e amigos do laboratório por me deixarem fazer parte desse lindo grupo multidisciplinar que enriquece muito meus conhecimentos e que com muito carinho me ajudam a fazer de cada dia, um dia melhor: Fernanda Coutinho, Isabella Nogueira, Marilen Souza, Lucas Malta, Patricia Fritsch, Eduardo Lourenço, Gabriel Ginani, Zita Lopes , Rosa Uenishi e Renata Simione, Paulo Sergio Azeredo, Luis Claudio Gonçalves, Cristina Simeone e Adriana Pratesi.

Especialmente a Fernanda, Lais, Cristian e Tiago pelo apoio emocional tanto nas alegrias quanto nas tristezas, principalmente nesses últimos tempos de correria e nervosismo.

Ao grupo do ambulatório de doença celíaca, o qual começo sendo uma disciplina mas por ter um ambiente excelente e me ensinar tanto cada terça-feira, nunca quis me desligar: Dra. Inês, Dra. Alessandra, Susy (psicóloga), Simone (psiquiatra) e ao grupo de nutricionistas Priscila, Leandro, Naara, Amanda e principalmente à Dra. Lenora.

Agradeço também ao pessoal dos projetos de saúde integral aos alunos e escolas que alegram as minhas sextas-feiras.

Finalmente agradeço a minha família amigos e professores da escola e faculdade que fizeram parte e contribuíram às minhas conquistas, porque cada um e uma parte essencial da minha vida.

*“Divide as dificuldades que encontras em tantas partes como seja possível para sua
melhor solução”*

(René Descartes)

Resumo

A doença celíaca é uma doença autoimune, de natureza inflamatória, caracterizada por uma intolerância permanente ao glúten em indivíduos geneticamente predispostos. Quase todos os pacientes celíacos possuem genes que codificam os heterodímeros HLA-DQ2.5, DQ8 ou DQ2.2, os quais participam na apresentação de peptídeos específicos derivados do glúten às células T CD4⁺. O objetivo desse trabalho foi determinar a prevalência das variantes predisponentes para DC em grupos de crianças celíacas (n=100) e não celíacas (n=110) da cidade de Brasília, Brasil. No grupo de crianças celíacas, 51% (n=51) apresentaram unicamente a variante DQ2.5, 22% (n=22) DQ2.5 e DQ2.2, 5% (n=5) somente DQ2.2, 7% (n=7) DQ2.5 e DQ8, 6% (n=6) DQ2.2 e DQ8, 6% (n=6) foram positivas unicamente para DQ8, 1% (n=1) somente para o alelo *DQB1*02*, 1% (n=1) apresentaram alelos de baixo risco e 1% (n=1) foram negativas para todos os alelos testados. O padrão evidenciado em crianças não celíacas foi: 14,5% (n=16) foram positivas unicamente para a variante DQ2.5, 3,6% (n=4) para DQ2.5 e DQ2.2, 11,8% (n=13) somente para DQ2.2, 0,9% (n=1) para DQ2.5 e DQ8, 0,9% (n=1) para DQ2.2 e DQ8, 13,6% (n=15) unicamente para DQ8, 1,8% (n=2) somente apresentaram o alelo *DQB1*02*, 26,4% (n=29) foram positivas para alelos de baixo risco e 26,4% (n=29) não apresentou nenhum dos alelos analisados. A prevalência de genótipos predisponentes para doença celíaca encontrada na população de crianças celíacas (DQ2: 80% e DQ8: 19%) foi similar à descrita para populações não europeias. Por outro lado, a proporção total desses alelos achados no grupo de crianças não celíacas (33,6%) mostrou-se semelhante à obtida na população geral europeia. Finalmente, os genes que codificam o heterodímero HLA-DQ2.2 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, o que nos permitiu concluir que a inclusão da variante HLA-DQ2.2 como genótipo predisponente para DC não seria relevante para a população analisada.

Palavras-chave: Doença celíaca; Prevalência, moléculas MHC de classe II; HLA-DQ2; HLA-DQ8.

Abstract

Celiac disease is an autoimmune enteropathy triggered by the ingestion of gluten in genetically susceptible individuals. Almost all celiac patients possess immune recognition genes encoding either HLA-DQ2.5, DQ8, or DQ2.2 heterodimers which facilitate CD4⁺ T-cell recognition of specific gluten-derived peptides. The aim of our study was to determine the prevalence of these predisposing variants in a group of celiac (n=100) and non-celiac (n=110) children from Brasilia, Brazil. Among celiac children, 51% (n=51) were DQ2.5 positives, 22% (n=22) DQ2.5/DQ2.2, 5% (n=5) DQ2.2, 7% (n=7) DQ2.5/DQ8, 6% (n=6) DQ2.2/DQ8 and 6% (n=6) DQ8 positives, 1% (n=1) were positives for *DQB1*02*, 1% (n=1) were only positives for low risk alleles and 1% (n=1) were negative for all the tested alleles. The HLA-DQ pattern in non-celiac children was: 14.5% (n=16) DQ2.5, 3.6% (n=4) DQ2.5/DQ2.2, 11.8% (n=13) DQ2.2, 0.9% (n=1) DQ2.5/DQ8, 0.9% (n=1) DQ2.2/DQ8 and 13.6% (n=15) DQ8 positives, 1.8% (n=2) were only positives for *DQB1*02*, 26.4% (n=29) presented low risk alleles and 26.4% (n=29) were negative for all the tested alleles. The prevalence of celiac disease predisposing alleles (DQ2: 80% and DQ8: 19%) was similar to that of non-European populations. However, the total number of alleles found in non celiac children (33.6%) resembles the European parameters for general population. Finally, the prevalence of genes coding for HLA-DQ2.2 heterodimer was not significantly different between celiac and non-celiac children, thus, suggesting that this variant would not be relevant in the studied population.

Keywords: Celiac disease; Prevalence; MHC class II molecules; HLA-DQ2; HLA-DQ8.

Lista de Figuras

Figura 1. Prevalência a nível mundial de DC, consumo de trigo e haplótipos predisponentes para DC.....	20
Figura 2. O <i>iceberg</i> da doença celíaca.....	21
Figura 3. Esquema do diagnóstico em paciente que apresentam sintomas compatíveis com DC.....	24
Figura 4. Esquema do diagnóstico em pacientes que pertencem a grupos de risco.....	25
Figura 5. Representações de análise histopatológica segundo classificação de Marsh-Oberhuber.....	28
Figura 6. Processo fisiológico do processamento do glúten.....	31
Figura 7. Desamidação dos peptídeos do glúten e união às moléculas de HLA-DQ2 e HLA-DQ8.....	32
Figura 8. Processos imunológicos envolvidos na DC.....	33
Figura 9. Detalhe do sistema de genes MHC com as respectivas subdivisões em classes.....	35
Figura 10. Haplótipos predisponentes para DC e seus correspondentes heterodímeros.....	37
Figura 11. Fotografia de testes anti-endomísio IgA (EMA-IgA).....	42
Figura 12. Curvas de desnaturação dos alelos predisponentes para doença celíaca e do controle endógeno.....	51
Figura 13. Corrida eletroforética de indivíduo portador do haplótipo DR3-DQ2.5	53
Figura 14. Amostra apresentando <i>DQB1*02</i> em heterozigose (Seta) e variantes DQ2.5 e DQ8.....	55
Figura 15. Configurações possíveis para formação de DQ2.5.....	55
Figura 16. Exemplo de amostra positiva para DQ2.2.....	56

Lista de Tabelas

Tabela 1: Classificação de Marsh-Oberhuber.....	28
Tabela 2. Características de <i>primers</i> utilizados para qPCR.....	44
Tabela 3. Componentes utilizados por reação de qPCR.....	45
Tabela 4. Condições de qPCR para os genes <i>DQA1*05</i> , <i>DQB1*02</i> , <i>DQA1*03</i> e HGH	45
Tabela 5 - Condições da qPCR para o alelo <i>DQB1*03:02</i> descritos por Profaizer et al, 2011.....	46
Tabela 6. Resultados obtidos por qPCR.....	50
Tabela 7. Resultados obtidos por PCR-SSP.....	52
Tabela 8. Peso molecular de alelos evidenciados por meio de PCR-SSP.....	54
Tabela 9. Comparação entre resultados obtidos por qPCR e PCR-SSP.....	56

Lista de Abreviaturas e Siglas

APC:	<i>Antigen Presenting Cells</i>
CEP-FS:	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde
CLSI:	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DC:	Doença celíaca
DGP:	Gliadina desaminada
DM1:	Diabetes Mellitus tipo 1
DNA:	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
D.O.:	Densidade Óptica
EDTA:	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA:	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMA:	Anticorpo anti-endomísio
ESPGHAN:	<i>European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition</i>
FITC:	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GWAS:	<i>Genome-wide Association Studies</i>
HGH:	<i>Human Growth Hormone</i>
HLA:	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HRP:	<i>Horseradish Peroxidase-Conjugated</i>
h-tTG:	<i>Human Tissue Transglutaminase</i>
HUB:	Hospital Universitário de Brasília

IEL:	<i>Intraepithelial lymphocytes</i>
IFN- γ :	Interferon gama
IgA:	Imunoglobulina A
IgG:	Imunoglobulina G
IL-15:	Interleucina 15
LabDC:	Laboratório de Pesquisa em Doença Celíaca
LD:	<i>linkage disequilibrium</i>
MHC:	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
pb:	Pares de base
PBS:	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-SSP:	<i>Polymerase Chain Reaction - Sequence-Specific Primers</i>
PGRSS:	Programa de Gerenciamento de Resíduos Sólidos em Serviços de Saúde
q-PCR:	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
rpm:	revoluções por minuto
TCR:	<i>T Cell Receptor</i>
TG2:	Transglutaminase 2
Th1:	<i>T helper 1</i>
Th2:	<i>T helper 2</i>
TJ:	<i>Tight Junctions</i>

T _m :	<i>Temperature melting</i>
TMB:	Tetrametilbenzidina
tTG:	Transglutaminase Tecidual
U:	Unidades arbitrárias
ULN:	<i>Upper Limite f Normal</i>
UnB:	Universidade Nacional de Brasília
UV:	<i>Ultraviolet Light</i>
μL:	microlitro
μm:	micrômetros
μM:	micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	DEFINIÇÃO DA DOENÇA CELÍACA	15
1.2	HISTÓRIA DA DOENÇA CELÍACA	15
1.3	EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA CELÍACA	18
1.4	CLÍNICA DA DOENÇA CELÍACA: SINAIS E SINTOMAS	21
1.5	DIAGNÓSTICO	23
1.5.1	.. Testes sorológicos	26
1.5.2	Análise histopatológica	27
1.5.3 Testes genéticos	29
1.6	FISIOPATOLOGIA	30
1.7	BASES GENÉTICAS	34
2	OBJETIVOS	38
2.1	OBJETIVO GERAL	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO E CÁLCULO AMOSTRAL	39
3.2	POPULAÇÃO ESTUDADA	39
3.3	COLETA DE AMOSTRAS	40
3.4	TESTES SOROLÓGICOS	40
3.4.1	Análise de Anticorpos Anti-transglutaminase IgA (tTG-IgA)	40

3.4.2	Análise de Anticorpos Anti-endomísio IgA (EMA-IgA)	41
3.5	TESTES GENÉTICOS	43
3.5.1Extração de DNA	43
3.5.2	Análise do DNA extraído	43
3.5.3	Genotipagem dos genes HLA-DQ predisponentes para DC	43
3.5.4	Técnica de PCR-SSP	47
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
3.7	APROVAÇÃO DA PESQUISA	48
4	RESULTADOS.....	49
4.1	TESTES GENÉTICOS	49
4.1.1	PCR em tempo real (qPCR)	49
4.1.2 PCR-SSP	52
5	DISCUSSÃO	57
6	CONCLUSÃO	57
	REFERENCIAS.....	61
	ANEXO.....	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 DEFINIÇÃO DA DOENÇA CELÍACA

A doença celíaca (DC) é uma doença autoimune, de natureza inflamatória, caracterizada por uma intolerância permanente ao glúten em indivíduos geneticamente predispostos (1). O desenvolvimento da doença é consequente a uma combinação de fatores genéticos, ambientais e imunológicos que podem redundar em variável espectro de manifestações clínicas (1).

1.2 HISTÓRIA DA DOENÇA CELÍACA

O primeiro registro claro da doença celíaca, cujo termo deriva do grego κοιλιακός koiliakós, que significa abdominal, foi encontrado em textos escritos pelo médico grego Areateus, entre o primeiro e o segundo século d.C. Nesstes textos, a DC já tinha sido descrita como um desordem intestinal associado à diarreia e má absorção que acontecia com maior frequência em mulheres do que em homens (2). Porém, a associação da doença com um componente alimentar somente foi descoberta em 1888 por Gee (3). Essa ideia foi posteriormente confirmada por Dicke e colaboradores na década de 1950 (4). Willem Karel Dicke, pediatra holandês, observou que, durante a Segunda Guerra Mundial, em período de grande escassez de alimentos na Holanda, a quase total ausência de derivados de trigo e outros cereais paradoxalmente resultou em nítida melhora das crianças celíacas sob seus cuidados. Sua suspeita foi confirmada pela constatação de que a reintrodução dos farináceos na dieta das mesmas crianças celíacas resultou no reaparecimento paulatino das manifestações clínicas típicas da DC, tornando evidente a relação entre o consumo de cereais e o desencadeamento da doença. No entanto, ainda não eram conhecidos quais cereais continham o fator desencadeante da DC.

Somente após a Segunda Guerra Mundial, em colaboração com van Kamer e Weyers, Dicke identificou que a gliadina, componente do glúten, era responsável pela síndrome mal absorvível característica dos pacientes celíacos. Depois desse achado foi definitivamente implementada a dieta livre de glúten como único tratamento de DC (5). Em 1954, Paulley foi o primeiro a demonstrar que as manifestações clínicas da DC estavam relacionadas à destruição do revestimento intestinal (6). Essa descoberta levou ao desenvolvimento de técnicas para análise da mucosa intestinal de pacientes suspeitos de serem portadores de DC, a principal delas, denominada Cápsula de Crosby, foi desenvolvida pelo engenheiro Heinz H. Kugler e pelo tenente coronel americano W. H. Crosby (7). A classificação histológica das lesões intestinais causadas por DC foi estabelecida por Marsh em 1992 e, mais tarde, atualizada pelo mesmo autor em 1995 (8). Atualmente, recomenda-se usar a classificação estabelecida em trabalho realizado por Oberhuber em 1999, a qual recebeu o nome de classificação de Marsh-Oberhuber (9).

Em 1969, foram estabelecidos, pela primeira vez, os critérios para o diagnóstico da DC pela Sociedade Europeia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica (*ESPGHAN – European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*) (10). Esses critérios recomendavam a realização de três biópsias intestinais: uma realizada se houver suspeita de doença celíaca, devendo evidenciar anormalidades características da afecção; a segunda biópsia seria realizada depois do paciente ter permanecido em dieta livre de glúten por um período prolongado, o que deveria resultar em normalização da histologia da mucosa intestinal e a terceira biópsia deveria ser feita depois de o paciente voltar à dieta com glúten, o que deveria resultar no reaparecimento das alterações da mucosa, firmando definitivamente o diagnóstico. Esses critérios sofreram posteriores modificações, em face ao refinamento dos métodos de diagnóstico, principalmente devido ao surgimento de testes sorológicos sensíveis e específicos, o que em muito diminuiu a importância da biópsia intestinal como único método diagnóstico (11,12).

Os métodos sorológicos desenvolvidos a partir das décadas de 70 e 80 tornaram-se rapidamente de uso corrente no diagnóstico precoce da DC, contribuindo para a diminuição progressiva de biópsias desnecessárias (13). Após a introdução dos testes de anti-gliadina e anti-reticulina (atualmente em desuso), o

primeiro teste sorológico confiável, devido à sua elevada especificidade, foi o método de detecção de anticorpos anti-endomísio (EMA) por imunofluorescência indireta, desenvolvido por Chorzelski e colaboradores em 1983 (14). Em 1997, Dieterich e colaboradores identificaram a enzima transglutaminase tecidual (tTG) como sendo o principal autoantígeno desencadeador da DC (15). Atualmente, a detecção de anticorpos anti-tTG pelo método *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) é uma das principais ferramentas utilizadas no diagnóstico da DC, por tratar-se de um teste de fácil execução e interpretação, apresentar resultado quantitativo e elevada sensibilidade (16).

Os estudos epidemiológicos realizados na época em que grandes avanços sobre a clínica da DC estavam sendo evidenciados revelaram uma incidência maior de DC em gêmeos e outros parentes de primeiro grau de indivíduos celíacos, fato que sugeriu a existência de uma base genética (17–20). Essa suspeita foi confirmada nos trabalhos de Strober (21) e Cooke (22), pioneiros em estabelecer uma ligação entre DC e os alelos HLA (do inglês *Human Leukocyte Antigen* - HLA). Os trabalhos anteriormente citados mostravam que, enquanto 88% dos adultos celíacos estudados apresentavam o HLA-B8, ele só estava presente em 20-30% da população geral. Posteriormente, foi descoberta uma associação maior entre a DC e as variantes HLA-DR3 (23,24) e HLA-DQ2 (25). Finalmente, estudos de clonagem do sistema MHC (do inglês *Major Histocompatibility Complex* - MHC) permitiram evidenciar os verdadeiros genes envolvidos na DC que foram descritos como aqueles que codificam para os heterodímeros HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (26,27). Os detalhes sobre as bases moleculares da associação entre as variantes HLA e a DC só foram elucidados 30 anos depois dos primeiros estudos terem evidenciado a sua importância (28–35).

Durante a época em que foi descoberta a associação da DC com o sistema HLA, Ferguson e colaboradores (36) e Ferguson e MacDonald (37) descreveram uma ligação entre a DC e a resposta imune contra glúten, mediada por linfócitos. Eles demonstraram, por meio de um modelo de rejeição alogênica, que a reação imune mediada por células T era a responsável pela atrofia vilositária e hiperplasia de criptas na mucosa duodenal. Essas observações foram confirmadas em trabalhos posteriores, nos quais testes realizados em biópsias permitiram evidenciar que células T reativas a glúten reconhecem o glúten seletivamente no contexto de

moléculas HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (38,39). Também foi demonstrado que esses tipos de moléculas estavam presentes exclusivamente na mucosa intestinal de pacientes celíacos (40).

A causa pela qual os peptídeos do glúten, que são ricos em glutaminas e pobres em resíduos ácidos, se unem a moléculas como HLA-DQ2 e –DQ8, as quais tem uma marcada preferência por resíduos negativos está associada à enzima tTG. Os trabalhos de Molberg (41) e van de Wal (42) demonstraram que a transglutaminase tecidual (tTG, *tissue Transglutaminase*, transglutaminase 2) tem a capacidade de se unir à peptídeos do glúten como a glutamina, que possuem carga neutra por natureza, transformando-os em peptídeos com carga negativa como o glutamato, por meio de um processo conhecido como desamidação. Paralelamente, Schuppan e colaboradores (15) descobriram que pacientes celíacos apresentavam uma elevada produção de anticorpos dirigidos contra essa mesma enzima. Essa descoberta sugeriu que a DC, além de ser desencadeada por um componente ambiental como o glúten, também é uma doença autoimune.

1.3 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA CELÍACA

A DC foi, durante muitos anos, considerada uma doença rara e restrita a crianças de origem europeia (43). Hoje em dia, com a globalização da informação e aperfeiçoamento das técnicas diagnósticas, sabemos que isso não é correto. Com uma prevalência atual estimada em 1% na população mundial, a DC é considerada uma enteropatia comum que acomete a todas as faixas etárias de diversas origens (43–45). Do mesmo modo que a maioria das doenças autoimunes, a DC se apresenta mais comumente em indivíduos do sexo feminino com uma relação de 1:2,8 (46).

A partir de uma análise mais detalhada, podemos evidenciar que as cifras descritas para as diferentes populações do mundo apresentam variações que vão desde praticamente ausente até os 5,6% (47,48) (Figura 1a). Essa ampla variação pode ser explicada pelo caráter multifatorial da doença, o que nos leva a considerar as associações com, por exemplo, o padrão de consumo de cereais (principalmente o

trigo) (Figura 1b); a distribuição dos alelos HLA predisponentes (Figura 1c-d); entre outros (1). Populações em que a frequência dos alelos HLA predisponentes e a ingestão de trigo são elevadas estão sujeitas a apresentarem uma prevalência de DC aumentada (49). Na Europa, por exemplo, onde a prevalência de DC é considerada alta (aproximadamente 1%) (50,51), cerca de 30% da população apresenta os alelos HLA DQ2 e/ou DQ8 (52) e o consumo de trigo é de aproximadamente 144,2 kg/ano *per capita* (53). Contudo, existem populações que fogem a essa regra como a da Rússia, onde o consumo de trigo e a frequência dos alelos HLA predisponentes são semelhantes a outros países da Europa, porém a prevalência de DC é bem menor (0,2%) (1). Nessas populações, devemos considerar outro tipo de fatores influentes, a variabilidade da microbiota do trato gastrointestinal, infecções intestinais e condições socioeconômicas são os principais fatores que podem influenciar o desenvolvimento de DC e, conseqüentemente, na distribuição da doença em uma determinada população (43,54).

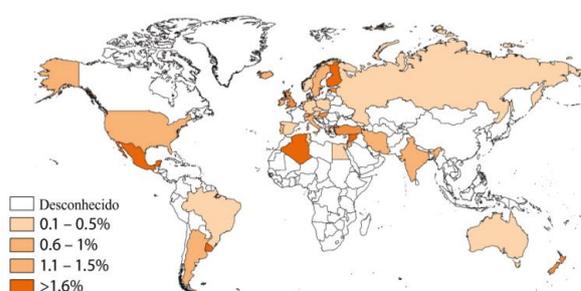
Outras populações que apresentam prevalências que fogem do padrão mundial são as do norte da África, onde foram descritos percentuais que variam entre 0,28% na Tunísia (55) e 5,6% nas crianças da população Saaraui (48). Estudos realizados no Brasil com comunidades quilombolas, descendentes de populações da África Subsaariana, sugerem que a doença não seria comum entre estes indivíduos (56). Porém, estudos de rastreamento realizados no mesmo país descrevem prevalências que variam entre 1:119 a 1:417 na população geral (57,58) e de 1:214 a 1:681 em doadores de sangue (59,60). Esta variação dentro da mesma população pode ser explicada por três principais razões. Primeiramente, sabemos que doadores de sangue pertencem a um grupo de pessoas saudáveis, pelo qual espera-se uma proporção menor de doenças em modo geral. Em segundo lugar devemos considerar a elevada intervariabilidade laboratorial que existe no momento do diagnóstico. Finalmente, lembrando que a população Brasileira apresenta uma elevada porcentagem de miscigenação, podemos ver que diversas regiões estão representadas por diferentes etnias.

As prevalências anteriormente citadas se assemelham às descritas na América Latina em forma geral (61), na população europeia, dos Estados Unidos e Nova Zelândia, de 1-1,2% (62,63). Na Austrália a DC afeta cerca de 0,4% dos habitantes (64), embora a população também seja composta por caucasianos. Em

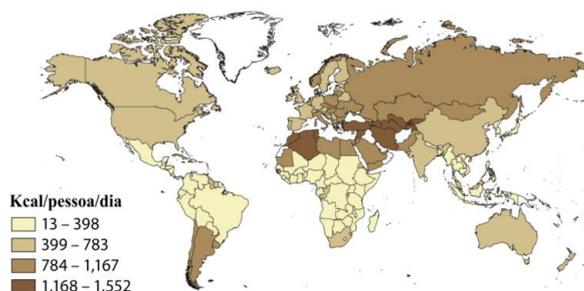
países da Ásia oriental, como Indonésia, Coreia do Sul e Filipinas, a DC é considerada rara (49). Contudo, no norte da Índia a prevalência da doença é de aproximadamente 0,32% (65) e em adultos doadores de sangue da Turquia, foi de 1,15% (66).

Existem grupos de indivíduos considerados de risco, nos quais a prevalência da doença se encontra aumentada. Exemplos disso são parentes de pacientes celíacos, para os quais foram descritas prevalências que vão desde 10-20% em parentes de primeiro grau (62), 11% em gêmeos dizigóticos e 83-86% em gêmeos monozigóticos (20,67). Outros grupos e suas respectivas prevalências incluem, indivíduos com síndrome de Down de 5,2% (68), de Williams e Turner 3,2% (69), bem como crianças com desordens autoimunes, especialmente Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) 3-16% (70), deficiência de Imunoglobulina A (IgA) (71), tireoidite autoimune (72), hepatite autoimune (73), alopecia areata (74), dermatite herpetiforme (75), ataxia (76).

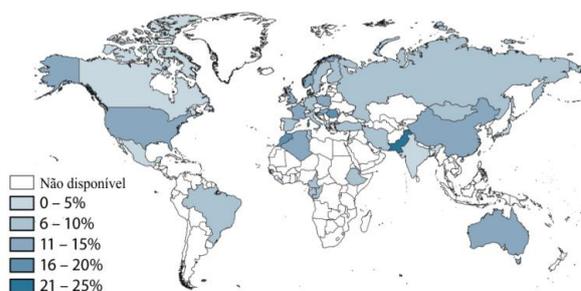
a Prevalência da doença celíaca



b Consumo de trigo



c Prevalência de haplótipo DR3-DQ2



d Prevalência de haplótipo DR4-DQ8



Figura 1. Prevalência a nível mundial de DC, consumo de trigo e haplótipos predisponentes para DC. **a.** Doença celíaca. **b.** Consumo de trigo **c.** Haplótipo predisponente para DC, DR3-DQ2 **d.** Haplótipo predisponente para DC, DR4-DQ8. Adaptado de Abadie, 2011 (1).

1.4 CLÍNICA DA DOENÇA CELÍACA: SINAIS E SINTOMAS

Como já foi mencionado anteriormente, o desenvolvimento da DC é consequente a uma combinação de fatores genéticos, ambientais e imunológicos que podem redundar em variável espectro de manifestações clínicas (1). Para facilitar o entendimento dessa ampla gama de sintomas, os pesquisadores costumam classificar a DC em quatro formas clínicas: clássica ou típica, atípica ou não clássica, silenciosa ou assintomática e potencial (11,43,77). Essas formas são comumente representadas fazendo analogia a um *iceberg* (Figura 2) no qual a ponta sobressalente da superfície da água, de menor tamanho, representa os casos típicos, mais aparentes e mais facilmente diagnosticados, a parte submersa na água estaria constituída pelas formas clínicas menos aparentes e de mais difícil diagnóstico, porém, mais frequentes (1).

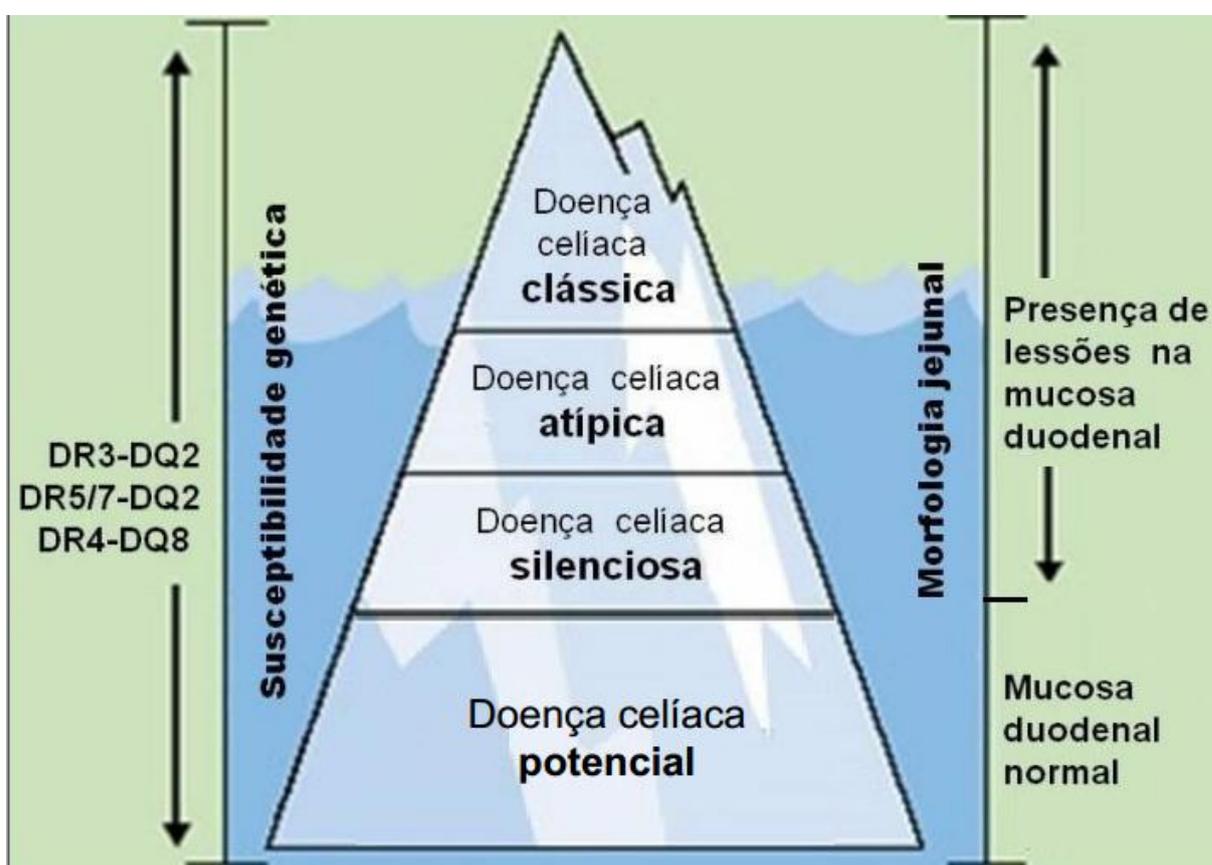


Figura 2. O *iceberg* da doença celíaca. Representação gráfica de uma doença complexa. Adaptado de Mäki, 1997 (78).

A DC clássica ou típica se caracteriza por manifestações gastrointestinais, as quais incluem principalmente diarreia, dor e distensão abdominal, vômito, flatulência, constipação e má absorção. Essa forma aparece mais frequentemente em crianças. As manifestações podem surgir após semanas, meses ou até anos após a introdução de alimentos que contenham glúten na alimentação. As lesões histológicas são de variável gravidade, frequentemente caracterizadas por hipotrofia ou atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas e infiltração de linfócitos intraepiteliais (43,77,79).

A forma atípica da DC, ou não clássica, pode surgir em qualquer idade; contudo, é mais frequente em adolescentes e adultos (43). Manifestações gastrointestinais são mínimas ou ausentes (16). Já as manifestações extra intestinais são mais comuns tais como: anemia ferropriva (resistente a tratamentos convencionais), dermatite herpetiforme, alopecia areata, osteoporose, complicações neurológicas, abortos de repetição, infertilidade, além de anormalidades na menarca e na menopausa, (43,79–81).

A DC na sua forma silenciosa ou assintomática se caracteriza por ausência de sinais e manifestações comumente associados à doença, acompanhadas de sorologia positiva e biópsia compatível. Os pacientes são comumente diagnosticados ocasionalmente em programas de rastreamento ou por pertencerem a grupos de risco (portadores de doenças autoimunes ou parentes de celíacos). As principais características encontradas são: distúrbios de comportamento (irritabilidade, tendências à depressão e prejuízo no desempenho escolar), sensação de cansaço, aptidão física comprometida, fadiga crônica e redução da densidade mineral óssea. Muitos desses pacientes, apesar de não terem apresentado sintomatologia significativa antes do diagnóstico, relatam melhor disposição tanto física como emocional após o início da dieta isenta de glúten. Essa forma também pode ser reclassificada como subclínica (11,43,77,79).

Finalmente, a forma potencial, apresenta sorologia positiva para DC, genotipagem dos alelos HLA compatível com DC, mucosa intestinal normal ou com anormalidades sutis (aumento de linfócitos intraepiteliais) e ausência de enteropatia significativa. O paciente pode ou não apresentar manifestações, assim como pode ou não desenvolver lesões na mucosa no futuro (11,43,79,82,83).

1.5 DIAGNÓSTICO

Segundo o último comunicado oficial publicado em 2012 pela *ESPGHAN* sobre o diagnóstico da DC (11), quatro critérios devem ser levados em conta para a correta realização do diagnóstico da doença: testes sorológicos positivos, análise histopatológica de biópsia de duodeno com padrão de lesões sugestivas de DC (com algumas exceções), testes genéticos positivos, melhora dos sinais e sintomas (se houver) após início do tratamento, e negatividade de testes sorológicos depois de 12-24 meses em dieta livre de glúten. As figuras 3 e 4 mostram a sequência e vias recomendadas para o diagnóstico de pacientes com doença celíaca partindo dos sintomas sugestivos de DC ou de indivíduos pertencentes a grupos de risco, respectivamente.

Indivíduos que devem ser testados para doença celíaca incluem aqueles que apresentam um quadro clínico compatível com a DC (descrito na seção Clínica da doença celíaca) e indivíduos pertencentes a grupos de risco (parentes de primeiro grau de indivíduos celíacos, portadores de doenças autoimunes associadas a DC ou síndrome de Down, Turner ou Williams, entre outros).

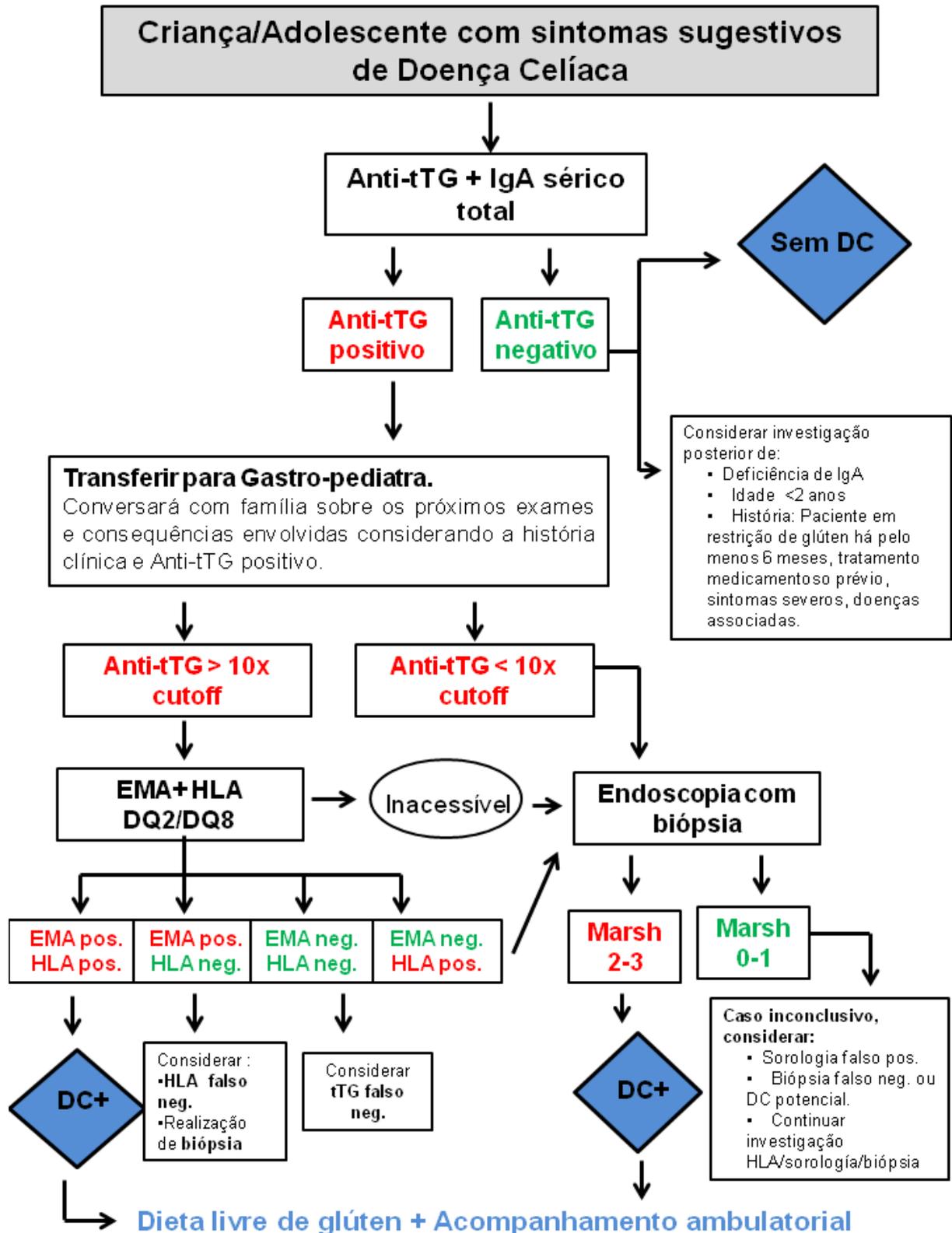


Figura 3. Esquema do diagnóstico em paciente que apresentam sintomas compatíveis com DC. Adaptado de Husby, 2012 (11).

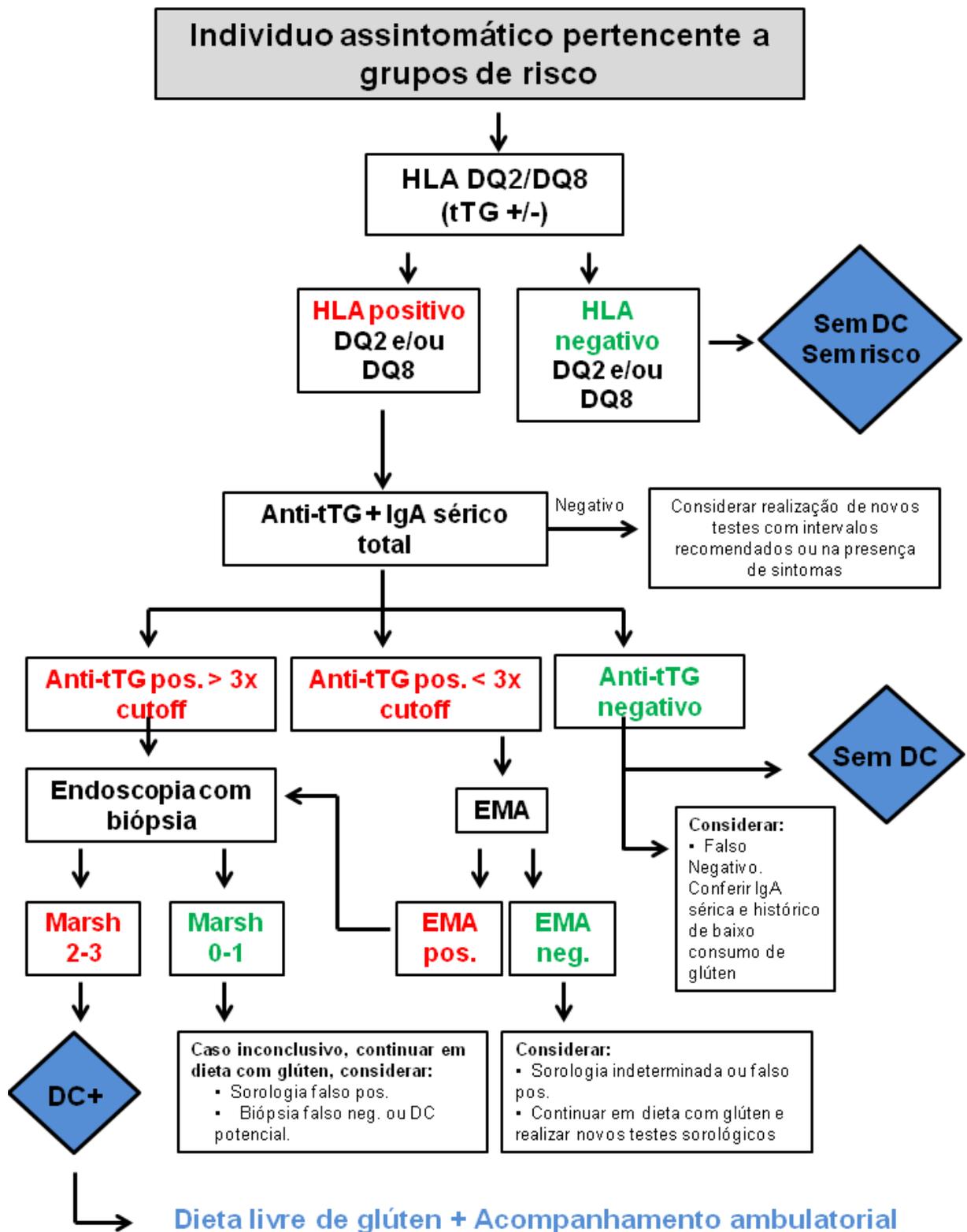


Figura 4. Esquema do diagnóstico em pacientes que pertencem a grupos de risco. Adaptado de Husby, 2012 (11).

1.5.1 Testes sorológicos

Os testes sorológicos são indicados como a primeira ferramenta a ser utilizada na procura de prováveis celíacos devido a sua sensibilidade, especificidade e por serem pouco invasivos. Os pacientes devem estar consumindo glúten no momento da coleta de amostras de sangue, já que os anticorpos mensurados no soro dos mesmos são produzidos durante o processo de patogênese da DC (84,85). O processo inicia-se com o teste para anticorpos anti-tTG IgA, acompanhado de uma pesquisa de IgA sérica total. Em indivíduos que apresentem deficiência de IgA, seja esta primária ou secundária, pelo menos um teste de tipo IgG, entre os mencionados a seguir, deve ser realizado: anti-tTG IgG, anti-DGP IgG (*deamidated gliadin peptide - DGP*) ou EMA-IgG. Os testes que medem anticorpos anti-DGP devem também ser realizados em pacientes com sorologia convencional negativa, mas com marcados sintomas, principalmente quando a idade do paciente for abaixo de dois anos.

Se o resultado de anti-tTG for negativo, com níveis normais de IgA sérico, ou com anti-DGP IgG negativo, a DC dificilmente será a causa dos sintomas apresentados pelo paciente. No entanto, algumas condições do indivíduo podem gerar resultados falso negativo como: dieta pobre em glúten, enteropatias que envolvem perda de proteínas, medicamentos imunossupressores e idade abaixo de 2 anos. Em crianças menores de 2 anos com suspeita de DC e anti-tTG negativas, recomenda-se a medição de outros anticorpos específicos para DC somente após serem testados contra alergia a proteína do leite de vaca ou com sintomas persistentes após dieta hipoalergênica (livre de leite de vaca e outras proteínas) (11,85).

Se o resultado do teste de anti-tTG for positivo, um segundo teste confirmatório deve ser realizado EMA-IgA. Falsos positivos podem acontecer em situações onde o paciente possui uma enteropatia, diferente de DC, que também causa o aumento da permeabilidade intestinal, nesses casos, os anticorpos anti-tTG IgA podem estar aumentados, mas o teste de EMA-IgA será negativo.

Pacientes com níveis de anticorpos anti-tTG maiores a 10 vezes o valor de *cutoff* ou *Upper Limit of Normal* (ULN) e EMA positivo, podem evitar a realização de

biópsias de duodeno e mesmo assim serem considerados celíacos. O procedimento a seguir é a procura de um médico especialista para indicação e orientação sobre o tratamento adequado. Atualmente, o único tratamento aceito e eficaz para a DC é a dieta livre de glúten. Indivíduos que apresentem EMA positivo, mas níveis de tTG menores ou iguais a 10 vezes o ULN dado pelo fabricante do kit diagnóstico utilizado, são orientados a realizar uma endoscopia alta com biópsias de duodeno.

1.5.2 Análise histopatológica

Considerada como padrão ouro do diagnóstico da DC durante muitos anos, a biópsia de duodeno tem perdido esse protagonismo desde 2012. No entanto, ainda é considerada uma ferramenta relevante no diagnóstico da doença.

Existem vários fatores a serem levados em conta na hora de analisar os resultados de uma biópsia na pesquisa de DC. As características histológicas do intestino delgado em pacientes com DC são extremamente variáveis enquanto ao grau de severidade, as lesões podem às vezes estar limitadas a áreas pequenas ou inclusive restritas ao bulbo duodenal. Também devemos lembrar que as alterações encontradas no duodeno não são específicas da DC e podem ser evidenciadas em outras enteropatias. Porém, se a biópsia for utilizada como uma ferramenta no diagnóstico da DC, como ainda é recomendado nos casos anteriormente citados, existem certas regras a serem levadas em conta.

As biópsias devem ser coletadas preferencialmente durante uma endoscopia alta: pelo menos uma amostra do bulbo duodenal e pelo menos quatro amostras da segunda e terceira porção do duodeno. O laudo patológico deve incluir uma descrição macroscópica e microscópica da orientação, presença de vilosidades normais ou grau de atrofia das mesmas, alongamento de criptas, relação cripta-vilosidade, número de linfócitos intraepiteliais (IELs do inglês *Intraepithelial lymphocytes*) e grau geral de lesão segundo classificação de Marsh-Oberhuber (11).

A classificação de Marsh-Oberhuber pode ser dividida em 3 fases, detalhadas na tabela 1, e representadas por imagens de análises macroscópicas de

biópsias de pacientes celíacos na Figura 4, com a última sendo composta por 3 graus diferentes de lesão (9).

Tabela 1: Classificação de Marsh-Oberhuber

Fase	Denominação	Descrição
Marsh 0	Pré-infiltrativa	Mucosa normal.
Marsh 1	Infiltrativa	Aumento de IELs (>30 cada 100 enterócitos).
Marsh 2	Hiperplásica	Aumento de IELs e hiperplasia de criptas.
Marsh 3A	Destrutiva	Aumento de IELs, hiperplasia de criptas a atrofia vilositária discreta.
Marsh 3B	Destrutiva	Aumento de IELs, hiperplasia de criptas a atrofia vilositária parcial.
Marsh 3C	Hipoplásica	Atrofia vilositária total com hipoplasia de criptas.

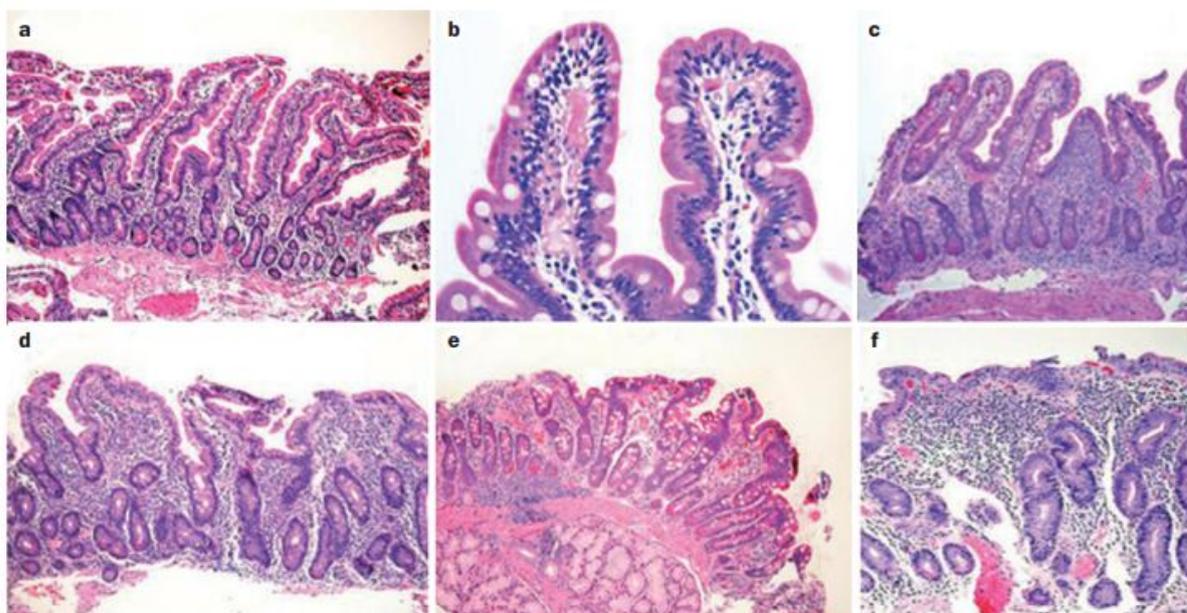


Figura 5. Representações de análise histopatológica segundo classificação de Marsh-Oberhuber. **a.** Marsh 0 **b.** Marsh 1 **c.** Marsh 2 **d.** Marsh 3A **e.** Marsh 3B **f.** Marsh 3C. Adaptado de Husby e Murray 2014 (86).

1.5.3 Testes genéticos

A genotipagem de alelos HLA predisponentes para DC é indicada em todos os indivíduos suspeitos de DC e inclusive naqueles que não apresentam indícios da doença, mas fazem parte do grupo de risco como: os parentes em primeiro grau de indivíduos celíacos, portadores de doenças autoimunes associadas a DC ou síndrome de Down, Turner ou Williams, entre outros.

Embora os testes genéticos não sejam capazes de informar se o indivíduo possui ou não a doença, a pesquisa de alelos HLA predisponentes é uma ferramenta de suma importância em situações de diagnóstico duvidoso. Foi comprovado em vários estudos que pacientes celíacos raramente desenvolvem a doença na ausência de pelo menos um conjunto de alelos que codificam os heterodímeros HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8 (1). Por essa razão, a ausência das variantes predisponentes poderia excluir a probabilidade de DC quando as demais ferramentas diagnósticas apresentarem resultados discordantes. Podemos dizer então que uma das características mais importantes da análise genética é seu elevado valor preditivo negativo (aproximadamente 100%) (87).

Chang e Green (88) chegaram a sugerir que a genotipagem do HLA deveria ser realizada antes dos testes sorológicos para reduzir a quantidade de resultados falsos positivos e, assim, diminuir o número de biópsias requeridas. No entanto, a ESPGHAN recomenda que o teste de HLA seja realizado previamente aos testes sorológicos somente nos casos de pacientes assintomáticos pertencentes a grupos de risco (11). Nesses pacientes, a ausência de marcadores genéticos pouparia ao indivíduo de ter que se submeter a testes sorológicos sucessivos. Por outro lado, quem apresentasse esses alelos, deveria realizar testes de anticorpos anti-tTG IgA e EMA-IgA periódicos para evitar uma possível falha na detecção de formas subclínicas ou silenciosas da doença (87,89,90).

Por outro lado, cerca de 30% da população geral é portadora das variantes predisponentes para DC. Visto que a prevalência da DC é de aproximadamente 1% no mundo inteiro interpretamos que a presença das variantes predisponentes é necessária, mas não suficiente para o desenvolvimento da doença. Por isso,

devemos lembrar que os marcadores genéticos são indicadores de predisposição ao desenvolvimento da DC, entretanto esta enteropatia precisa de outros fatores ambientais e imunológicos para ser desencadeada.

1.6 FISIOPATOLOGIA

A DC é uma enteropatia complexa cujo desenvolvimento depende de uma combinação de fatores genéticos, imunológicos e ambientais. O principal agente ambiental associado à doença é o consumo de glúten (44). O glúten é um complexo protéico presente no trigo, cevada, centeio e aveia (embora existam algumas controvérsias a respeito desse último) (91,92). Devido ao elevado conteúdo de prolinas e glutaminas presentes no complexo, o corpo humano não consegue digerir o glúten totalmente, deixando peptídeos residuais circulantes no lúmen do intestino delgado.

Em condições fisiológicas, onde a integridade das junções celulares estreitas (*tight junctions* - TJ) está conservada, poucos peptídeos do glúten conseguem atravessar a barreira epitelial por via paracelular. Ao alcançar a lâmina própria, peptídeos hidrofóbicos como: a gliadina do trigo, secalina da cevada, hordeína do centeio e avenina da aveia, tornam-se excelentes substratos da enzima tTG, (41,42), a qual se une e modifica os mesmos por meio de um processo denominado desamidação (15). O complexo glúten-TTG é posteriormente reconhecido e processado por Células Apresentadoras de Antígeno (*Antigen Presenting Cells*-APC). As APCs são as responsáveis por apresentarem este complexo aos linfócitos T. Em indivíduos não-celíacos, essa apresentação desencadeará uma reação imune tolerogênica (Figura 5).

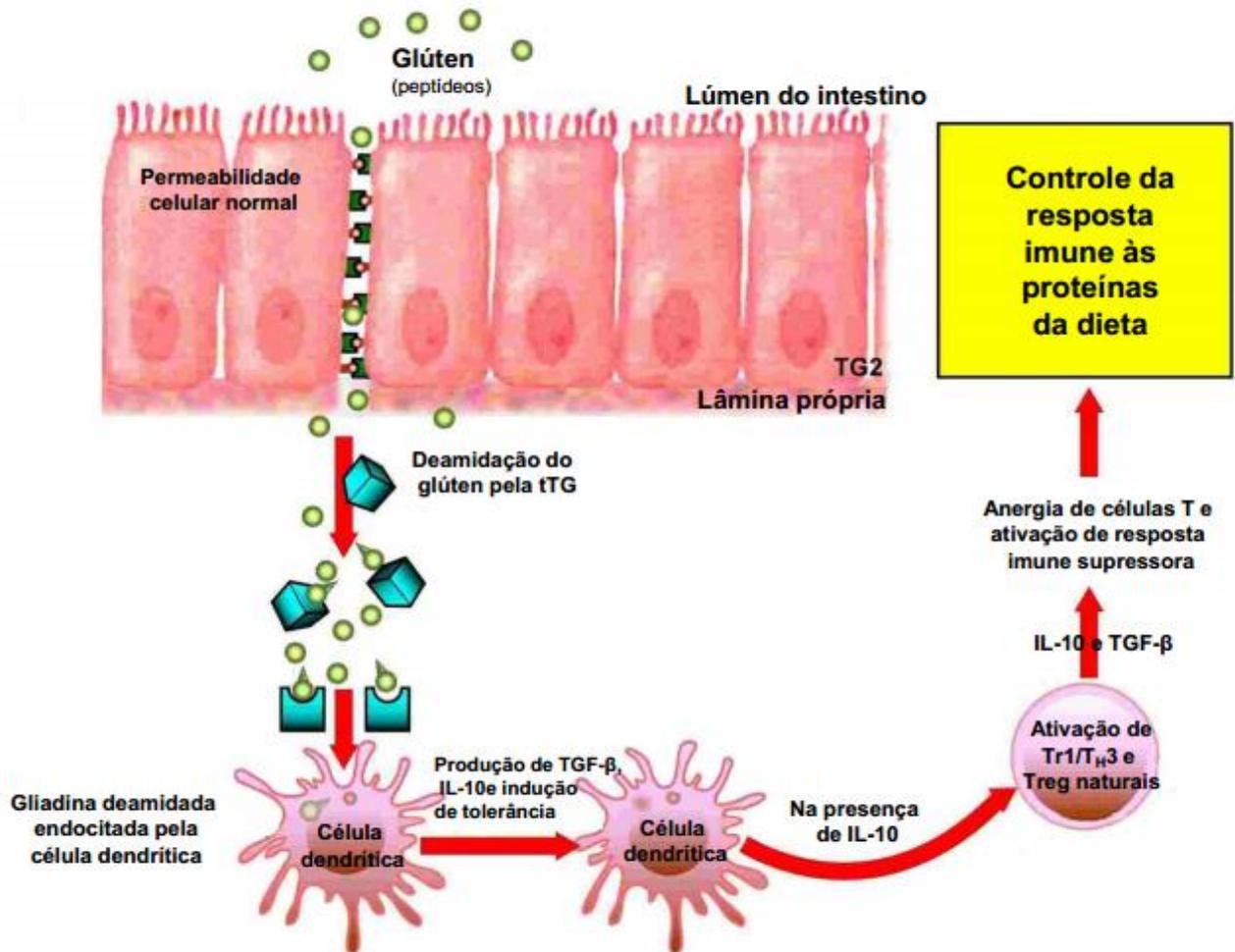


Figura 6. Processo fisiológico do processamento do glúten. Adaptado de Vodjani, 2007(93).

Em situações de estresse, tanto mecânico quanto químico, como ocorre em infecções, DC ou outras enteropatias, a perda da integridade das TJ permite que uma quantidade maior de peptídeos atravesse a barreira epitelial. A desamidação mediada pela enzima tTG, modifica peptídeos originalmente neutros, tornando-os negativos e consequentemente aumentando a afinidade por moléculas HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (Figura 6) (1). Estes heterodímeros fazem parte do amplo espectro de moléculas de MHC de classe II que são expressas na membrana celular de APCs.

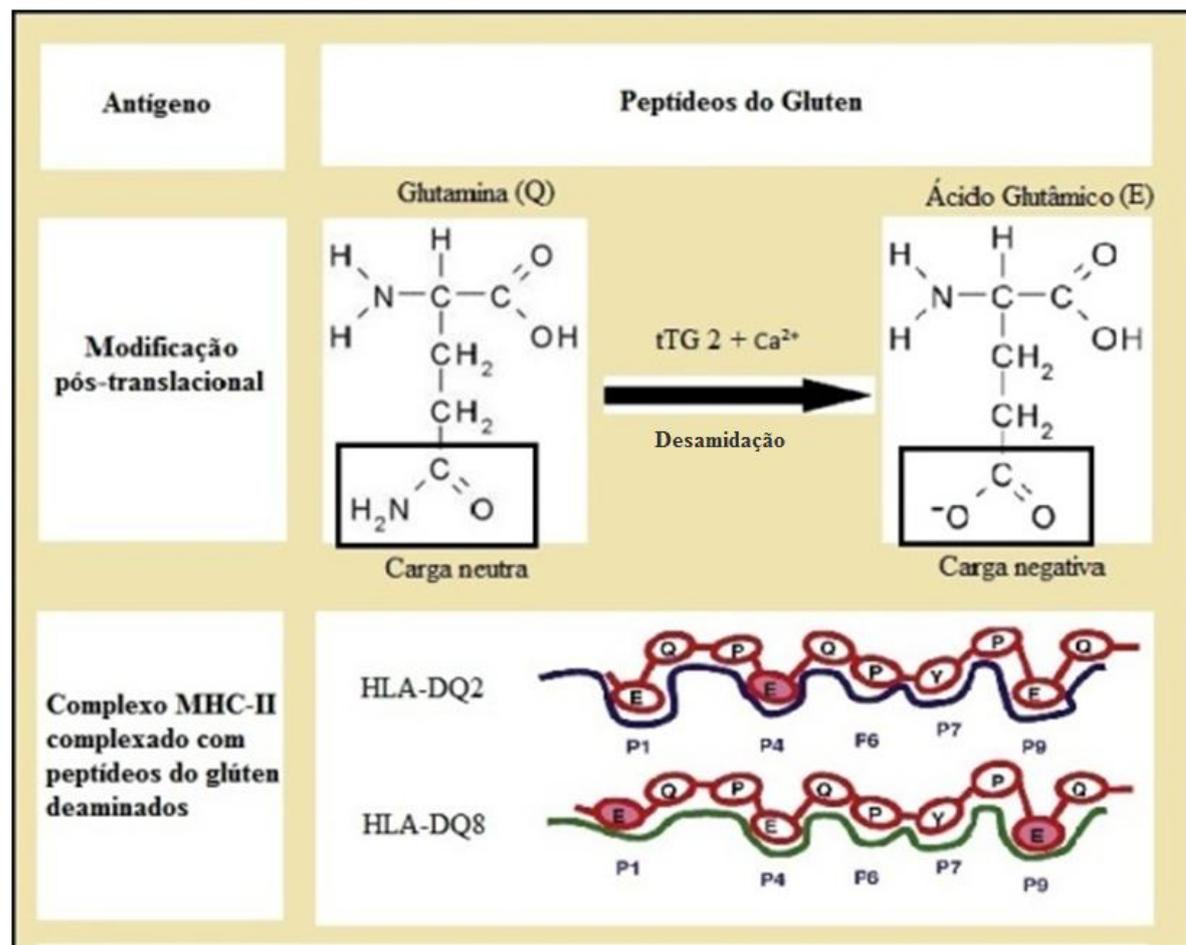


Figura 7. Desamidação dos peptídeos do glúten e união às moléculas de HLA-DQ2 e HLA-DQ8. Adaptado de Abadie, 2011(1) e Qiao, 2009 (94).

Quando os peptídeos são apresentados aos linfócitos T CD4⁺ no contexto de moléculas HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8, dois tipos de resposta imune são ativadas: a) via células TH1, com produção de citocinas inflamatórias e consequente lesão da mucosa intestinal por destruição celular, contribuindo para a autoimunidade, b) via TH2, com ativação e expansão clonal de linfócito B que se diferenciam em plasmócitos produtores de anticorpos anti-DGP, anti-tTG, anti-gliadina-tTG e contra diversos antígenos teciduais como o endomísio (1,15).

Outros mecanismos que são ativados no processo patológico da DC envolvem a imunidade inata (95). A interleucina 15 (IL-15) produzida por células dendríticas e macrófagos, atua como fator de crescimento dos IELs (96). Sob condições de estresse e inflamação, como na DC, os IELs são ativados e passam a

adquirir funções efetoras citotóxicas. O aumento da população de IELs e sua ativação podem causar graves lesões na mucosa intestinal levando inclusive à atrofia vilositária (95,97) (Figura 7).

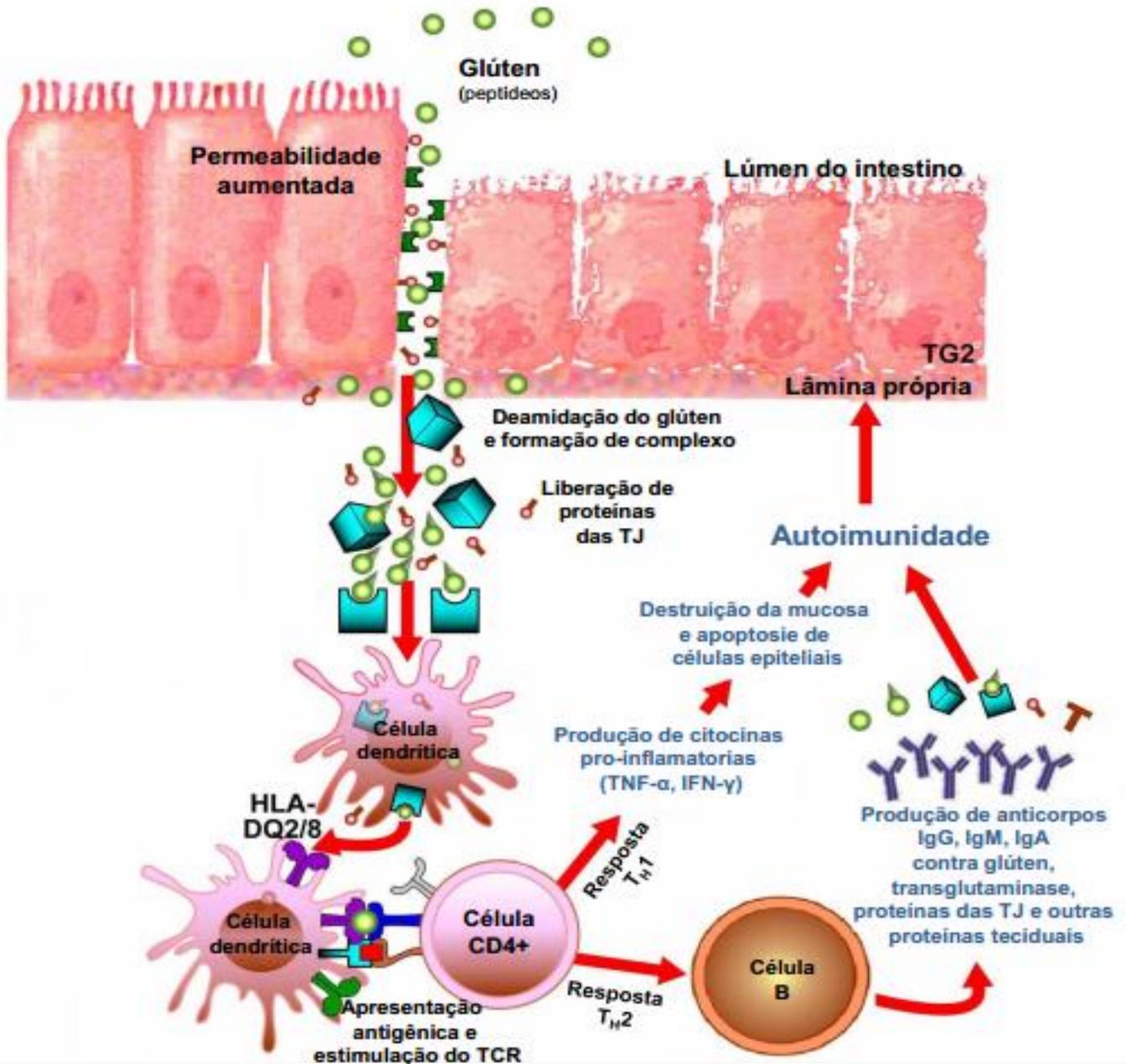


Figura 8. Processos imunológicos envolvidos na DC. Adaptado de Vodjani, 2007(93).

1.7 BASES GENÉTICAS

Estudos realizados com parentes de indivíduos celíacos evidenciaram que a DC possui um forte componente genético (detalhes na seção Epidemiologia da Doença Celíaca). Atualmente, com o surgimento dos estudos de associação genômica ampla (*Genome-wide Association Studies* - GWAS), foi possível a identificação de aproximadamente 40 genes envolvidos na DC (98). Foi demonstrado que 60% do componente genético está representado por genes não HLA, porém a sua função é pouco conhecida e/ou de natureza inespecífica, já que estão presentes na maioria das enteropatias inflamatórias (genes que codificam citocinas, quimiocinas e seus receptores, interleucinas, moléculas de adesão celular, ativadores de células B e T, entre outros) (98). Os outros 40% estão representados por genes que codificam os heterodímeros HLA-DQ2 ou HLA-DQ8, cuja função foi especificada na seção anterior. Embora representem uma proporção menor da base genética da doença, os genes anteriormente mencionados estão presentes em quase todos os indivíduos afetados (31,34,38,39,99,100), fato que os torna de suma relevância no estudo da DC (101). Estudos sobre prevalência mostraram que 90-95% dos indivíduos celíacos são portadores dos alelos que codificam o heterodímero DQ2 e metade dos restantes carregam as variantes para DQ8 (100,102).

Como toda molécula de MHC de classe II, HLA-DQ2 e HLA-DQ8, são formadas por duas cadeias diferentes (α e β), produzidas de forma independente. Isto significa que, para poder formar cada heterodímero, será necessária a presença de dois genes (HLA-DQA e HLA-DQB). Esses genes encontram-se no braço curto do cromossomo seis (*locus* 6p21.3), fazendo parte de um sistema de genes conhecido como MHC (do inglês *Major Histocompatibility Complex*-MHC) de forma genérica, para todas as espécies e comumente chamado de HLA (Human Leucocyte Antigen) quando referido a seres humanos (77,103,104) (Figura 8). Os heterodímeros HLA de classe II expressos na membrana das APCs estão envolvidos na apresentação dos antígenos exógenos aos linfócitos T, mediante a interação tanto com o antígeno quanto com os receptores de células T (*T cell receptor*-TCRs).

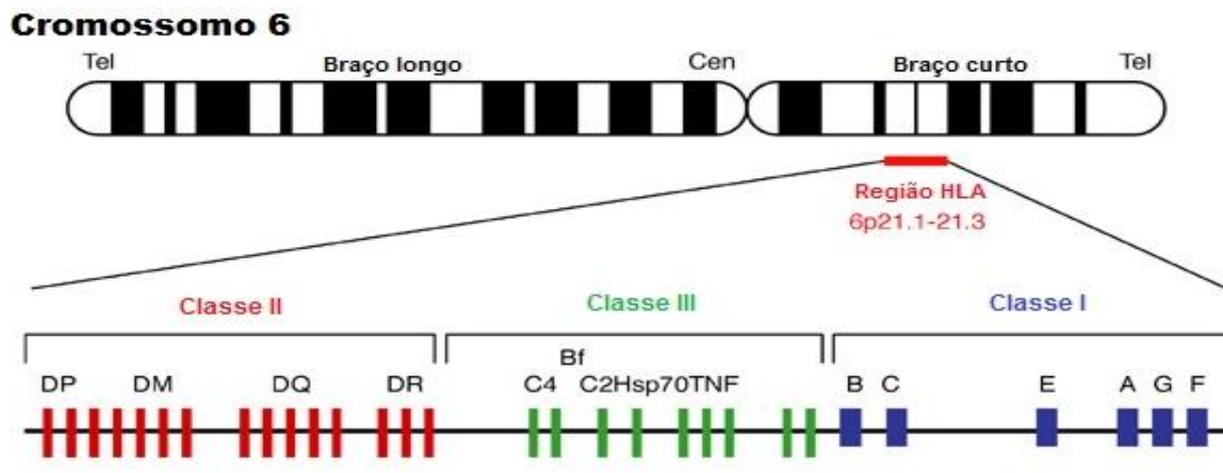


Figura 9. Detalhe do sistema de genes MHC com as respectivas subdivisões em classes. Adaptado de Expert Reviews in Molecular Medicine ©2003 Cambridge University Press (105).

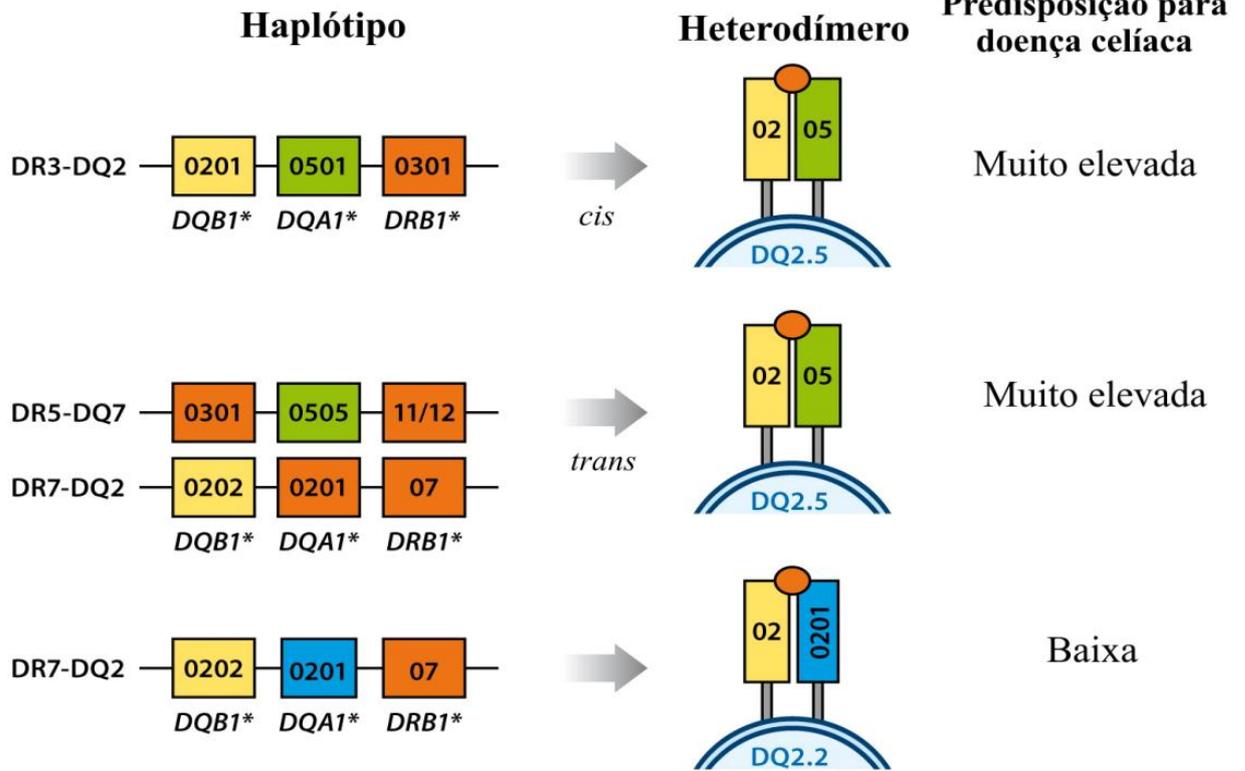
Os genes HLA-DQA e HLA-DQB são de expressão codominante e polimórficos (106). No entanto, somente alguns alelos estão associados à DC. Existe um forte desequilíbrio de ligamento (*linkage disequilibrium* - LD) entre esses genes, o que implica que certas combinações de alelos sejam herdadas juntas com uma frequência maior à esperada. O conjunto de alelos presentes no mesmo cromossomo, fazendo parte de sítios que evidenciam LD é conhecido como haplótipo. Os portadores de DQ8, por exemplo, geralmente apresentam o haplótipo DR4 (*DRB1*04-DQA1*03:01-DQB1*03:02*). O heterodímero DQ2 é resultante dos alelos *DQA1*05* e *DQB1*02* (variante DQ2.5) tanto na sua conformação *cis* (ambos genes no mesmo cromossomo) no haplótipo DR3 (*DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01*) quanto na conformação *trans* (genes presentes em cromossomos diferentes) representada pelos haplótipos DR5/DR7 (*DRB1*11/12-DQA1*05:05-DQB1*03:01*; *DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:02*) (26,101). A figura 9 é uma representação gráfica dos haplótipos predisponentes para DC e seus correspondentes heterodímeros.

Trabalhos recentes demonstram que a variante DQ2.2 (*DQA1*02:01* e *DQB1*02:02*) poderia também ser considerada como predisponente para DC devido à estreita similaridade que existe entre os heterodímeros DQ2.5 e DQ2.2. Esse haplótipo mostrou, ademais, ser a característica mais prevalente entre os pacientes celíacos que não são portadores de DQ2.5 nem DQ8, de alguns países europeus

(99). No entanto, existem algumas controvérsias sobre o anteriormente citado. Diversos estudos afirmam que a apresentação antigênica por parte da molécula DQ2.2 não seria eficiente devido a uma união pouco estável do heterodímero com os peptídeos deamidados do glúten (107,108). Trabalhos anteriores à inclusão da variante como predisponente já mostravam elevadas prevalências do alelo *DQB1*02* sozinho, presente em ambas variantes DQ2.5 e DQ2.2 (100,109). Por não ter sido pesquisado o alelo *DQA1* correspondente, os pacientes DQ2.2 podem ter sido erroneamente classificados como apenas $\beta 2$. Mais estudos precisam ser realizados a respeito do tema para que possamos entender a relevância do heterodímero DQ2.2 na DC.

A prevalência das variantes predisponentes foi descrita em várias populações do mundo e comparadas entre elas. Porém, no Brasil, ainda não há informação suficiente para poder estabelecer esse tipo de comparações. Além disso, estudos que incluam a variante DQ2.2 ainda são inexistentes, o que faz o presente estudo inserir relevância na literatura científica sobre o tema no que tange ao Brasil, e mais especificamente a Brasília, onde os estudos do nosso grupo são realizados.

HLA-DQ2



HLA-DQ8

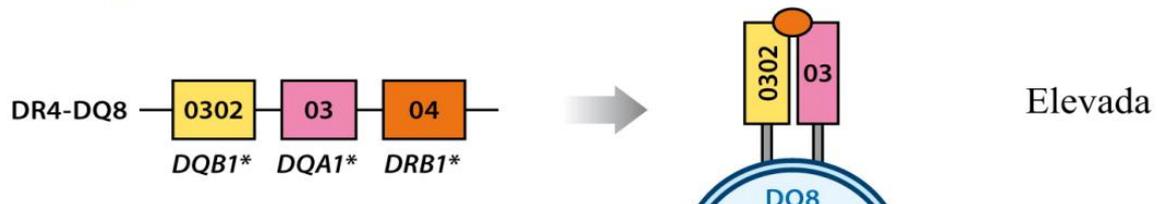


Figura 10. Haplótipos predisponentes para DC e seus correspondentes heterodímeros. Adaptado de Abadie et al, 2011 (1)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência de genótipos HLA-DQ predisponentes para DC em crianças celíacas e não celíacas de Brasília, Brasil.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Testar a concordância entre os resultados obtidos pela técnica de qPCR, desenvolvida no Laboratório de Pesquisas em Doença Celíaca, e a técnica de PCR-SSP realizada com kit comercial.

Avaliar a relevância da inclusão de HLA-DQ2.2 como um genótipo predisponente para DC.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E CÁLCULO AMOSTRAL

Para o cálculo do tamanho da amostra (n), tanto de crianças celíacas quanto não-celíacas, foi utilizando o programa Epilnfo versão 3.5.3, levando em consideração a prevalência aproximada de 30% descrita na literatura para a presença de alelos predisponentes para DC na população geral (87). O intervalo de confiança escolhido foi de 95%.

3.2 POPULAÇÃO ESTUDADA

Foram incluídas na pesquisa 100 crianças celíacas (41 de sexo masculino e 59 de sexo feminino) e 110 crianças não-celíacas (47 de sexo masculino e 63 de sexo feminino). A faixa etária das crianças participantes foi de 1 a 15 anos em ambos os grupos.

Os critérios de inclusão adotados para o grupo de crianças celíacas foram: estar dentro da faixa etária previamente estipulada no momento da coleta das amostras e ter o diagnóstico confirmado de doença celíaca de acordo com os critérios estabelecidos pela Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN) (11). O diagnóstico foi realizado no ambulatório de Doença Celíaca do Hospital Universitário de Brasília (HUB).

As amostras de crianças não celíacas foram coletadas no “Laboratório de Patologia Clínica” do HUB. Foram excluídas as crianças que apresentassem hemograma alterado e/ou testes sorológicos, Anti-transglutaminase IgA (tTG-IgA) e Anti-endomísio IgA (EMA-IgA), positivos.

3.3 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de sangue total dos pacientes, cerca de 5ml, foram coletadas por punção venosa e em seguida distribuídas em dois tubos, o primeiro contendo EDTA como anticoagulante (para posterior extração de DNA) e, o segundo, com gel separador (permite o isolamento do soro sanguíneo). A coleta foi realizada conforme as normas do padrão H1-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). O soro sanguíneo obtido pela centrifugação a 4500 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos foi enviado, catalogado e estocado a aproximadamente -20°C no Laboratório de Pesquisa em Doença Celíaca (LabDC) para posterior realização dos testes sorológicos tTG-IgA e EMA-IgA. Após a realização dos exames, todos os soros coletados foram descartados em lixo biológico conforme o Programa de Gerenciamento de Resíduos Sólidos em Serviços de Saúde (PGRSS), adotado pela UnB.

3.4 TESTES SOROLÓGICOS

3.4.1 Análise de Anticorpos Anti-transglutaminase IgA (tTG-IgA)

A presença de anticorpos tTG-IgA nas amostras de soro coletadas foi mensurada por meio do teste imunoenzimático *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) usando um Kit comercial QUANTA Lite® h-tTG IgA ELISA (*INOVA Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA*). A análise foi feita à temperatura ambiente (20 a 26°C), seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de soro dos pacientes foram diluídas (1:100) em Tampão fosfato-salino ou *Phosphate Buffered Saline* (PBS) pH 7,2 e homogeneizadas em agitador mecânico. Após a diluição, 100 µl de cada amostra foram pipetada em uma placa de poliestireno (96 poços) sensibilizado com transglutaminase tecidual humana (h-tTG). A placa foi incubada por 30 minutos. Após este procedimento, foram realizados três ciclos de lavagens

automatizadas da placa com 300µl de tampão de lavagem (tampão fosfato-salino com 0,05% de Tween 20). Posteriormente, foram adicionados 100µl de anticorpo de detecção de anti-IgA humana, seguidos de 100µl de anti-anticorpo IgA de cabra conjugado com uma peroxidase de rábano ou *Horseradish Peroxidase-Conjugated* (HRP). Foi realizada uma nova incubação da placa por 30 minutos, seguida de lavagens como descrito anteriormente.

Para a revelação da reação, foram adicionados 100 µl da solução de substrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB 3,3,5,5') com peróxido de hidrogênio a cada poço e foram incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 0,334 molar (H₂SO₄). Em seguida, foi realizada a leitura da reação no espectrofotômetro *Thermo Plate Reader (TP-Reader™)* usando filtro de 450 nm.

Os resultados foram quantificados por meio da comparação entre a densidade óptica (D.O.) de um padrão pré-estabelecido e seu respectivo valor numérico em Unidades arbitrárias (U) com a D.O. das amostras. Aqueles resultados com valor menor que 20U foram considerados negativos, entre 21 e 30U indeterminados ou limítrofes, e maiores que 30U positivos, conforme sugere o fabricante.

3.4.2 Análise de Anticorpos Anti-endomísio IgA (EMA-IgA)

A técnica de imunofluorescência indireta foi escolhida para a avaliação da presença de anticorpos anti-endomísio da classe IgA (EMA-IgA). O teste foi realizado usando o kit comercial QUANTA Lite® *Endomysial Primate Distal Esophageous* (INOVA Diagnostics, Inc. San Diego, CA, USA), cujas lâminas possuem quatro poços com secções criostáticas de 4 micrômetros (µm) de espessura da porção distal do terço inferior do esôfago de primata. Se o paciente for celíaco, os anticorpos específicos presentes no soro reagirão com o endomísio que recobre as fibras lisas da camada muscular do esôfago. O processo foi realizado seguindo as recomendações do fabricante.

Foram utilizadas amostras de soro diluídas 1:5 em solução PBS (pH 7,2) e incubadas em lâmina por 30 min em câmara úmida à temperatura ambiente (15 a 30°C). Cada lâmina foi lavada 3 vezes com tampão PBS por meio de esguichos utilizando pipeta Pasteur. Em seguida, foram imersas em cubeta contendo o mesmo tampão por 5 min. Após este tempo, o tampão foi descartado e uma nova lavagem foi realizada com PBS.

Posteriormente, foram adicionados 30 µL do anticorpo de detecção, anticorpo anti-IgA humano marcado com fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) procedente do *kit* comercial (*INOVA Diagnostics, Inc. San Diego, CA, USA*), a cada poço. As lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 min. e lavadas com tampão PBS, como descrito anteriormente.

Após a secagem e montagem com lamínula, analisou-se as lâminas em microscópio de fluorescência, Zeiss Axiophot 2 com filtro de excitação 450nm à 490nm e emissão de 520nm, e aumento de 400x. A análise foi feita por dois observadores experientes, de forma independente. Consideraram-se negativas as amostras que não evidenciaram fluorescência (Figura 10-A) e positivas aquelas que apresentaram fluorescência de cor verde brilhante em forma de rendilhado ou favo de mel no tecido conjuntivo que envolve cada fibra do feixe de musculatura lisa próximo à mucosa do esôfago (*mucularis mucosae*) (Figura 10-B).

Foram utilizados controles negativos e positivos em cada lote de amostras processadas para garantir que todos os reagentes e procedimentos tenham atuado corretamente.

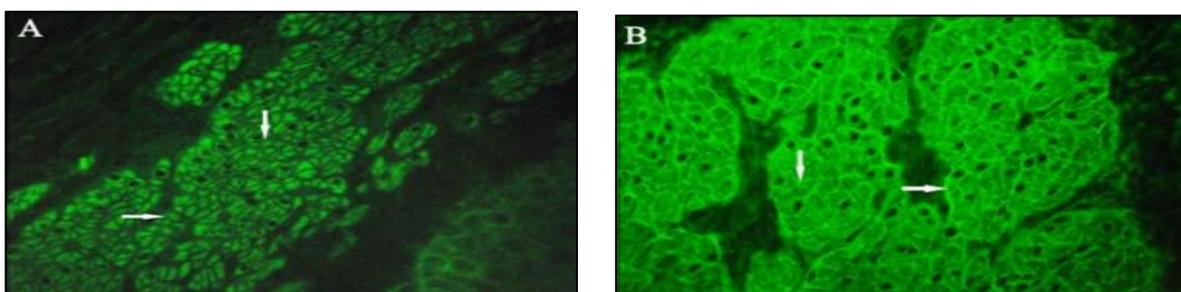


Figura 11. Fotografia de testes anti-endomísio IgA (EMA-IgA) **a.** EMA-IgA Negativo: ausência de fluorescência (seta). **b.** EMA-IgA positivo: fluorescência de cor verde brilhante (seta). Imagem cedida por Laboratório de Pesquisa em Doença Celíaca-FM-UnB.

3.5 TESTES GENÉTICOS

3.5.1 Extração de DNA

Amostras de sangue total foram utilizadas para extração do DNA pelo método de *Salting out* (110) por meio de coluna de sílica, usando *kit* comercial *Illustra™ Blood genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) seguindo as recomendações do fabricante. A concentração final de cada amostra de DNA variou entre 10ng/μL e 100ng/μL. Todas as amostras de DNA foram armazenadas a uma temperatura de -20° C. Após a extração do DNA, as amostras de sangue foram devidamente tratadas e descartadas como resíduos biológicos.

3.5.2 Análise do DNA extraído

A concentração de DNA extraído foi determinada através do equipamento *Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer* (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA), que utiliza a leitura espectrofotométrica nas densidades óticas (D.O.) 260 nm e 280 nm. Quando a razão dessas densidades óticas (A260/A280) foi entre 1.8 e 2.0, o grau de pureza do DNA foi considerado adequado para a realização dos experimentos. Após análise, a concentração das amostras foi ajustada para 15ng/μL.

3.5.3 Genotipagem dos genes HLA-DQ predisponentes para DC

3.5.3.1 PCR em tempo real (qPCR)

As amostras de DNA extraído foram utilizadas para amplificação de dois conjuntos de alelos *DQA1*05 - DQB1*02* (DQ2), e *DQA1*03 - DQB1*03:02* (DQ8). A amplificação desses alelos foi realizada pelo método de PCR em tempo real (qPCR ou *real time* PCR), utilizando o aparelho *Step-One Instrument* (Applied BioSystems – Life Technologies™, Carlsbad, USA). Foram utilizadas sequencias específicas de *primers* para os alelos *DQA1*05*, *DQB1*02* e *DQA1*03* previamente descritas por

Olerup e colaboradores em 1993 (111), e para o alelo *DQB1*03:02* de acordo como o descrito por Profaizer e colaboradores em 2011 (112) (Tabela 2). Como controle endógeno da reação de PCR, foi usado um par de *primers* de uma região conservada do gene HGH, o Hormônio do Crescimento Humano (*human growth hormone*) conforme descrito por Profaizer e colaboradores (112). Todos os *primers* foram usados em uma concentração de 10µM.

Tabela 2. Características de *primers* utilizados para qPCR

Alelo	Sequencia		Produto de PCR
	Forward	Reverse	
<i>DQA1*05</i>	5'-ACG GTC CCT CTG GCC AGT A-3'	5'-AGT TGG AGC GTT TAA TCA GAC-3'	186pb
<i>DQB1*02</i>	5'-GTG CGT CTT GTG AGC AGA AG -3'	5'-GCA AGG TCG TGC CGA GCT- 3'	205pb
<i>DQA1*03</i>	5'-TTC ACT CGT CAG CTG ACC AT-3'	5'-CAA ATT GCG GGT CAA ATC TTC T-3'	183pb
<i>DQB1*03:02</i>	5'-GCG CGT GCG TCT TGT GAC C-3'	5'-CTG TTC CAG TAC TCG GCG GCA-3'	127pb
HGH	5'-GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3'	5'-TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT-3'	439pb

Foram realizadas quatro reações por amostra para amplificar individualmente cada alelo. As reações foram feitas em triplicata, conforme um protocolo desenvolvido no nosso laboratório (113) e detalhado a seguir. Componentes por reação: 1µL de *primer forward*, 1µL de *primer reverse*, 10µL de *SYBR Green* (*Absolute qPCR SYBR Green Rox Mix - Thermo Fisher Scientific Inc, Vilnius, Lithuania*), 2µL de DNA genômico e 6µL de água ultra pura (*Thermo Fisher Scientific Inc, Vilnius, Lithuania*) para um volume final de 20µL por reação (Tabela 3). Foram usadas como controle positivo, amostras previamente genotipadas para cada um dos alelos estudados. Como controle negativo e de contaminação foi usada uma amostra contendo todos os componentes da reação exceto DNA. As reações de PCR foram adicionadas a placas de 48 poços (*Applied BioSystems – Life Technologies™, Carlsbad, USA*), centrifugadas por um minuto a 1300 rpm em centrífuga refrigerada *MPW 351R (Med. Instruments)* e, em seguida, foram colocadas no aparelho *Step-One Instrument*.

Tabela 3. Componentes utilizados por reação de qPCR

	Volume	Concentração
<i>Primer Forward</i>	1 µl	10 µM
<i>Primer Reverse</i>	1 µl	10 µM
<i>Syber Green Rox Mix</i>	10 µl	2 X
DNA	2 µl	15 ng/µl
Água ultra pura	6 µl	-
Total	20 µl	-

Os alelos *DQA1*05*, *DQB1*02* e *DQA1*03* foram amplificados sob as seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguida de uma sequência de 32 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 60 segundos a 60°C (anelamento e extensão); após a amplificação dos alelos segue-se a etapa da curva de *melting* (essa etapa é realizada em 3 passos: 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e uma etapa final de aumento da temperatura de 60-95°C (por meio de incrementos de 0,3°C) com simultâneas medições do sinal de *SYBR Green* (Tabela 4).

Tabela 4. Condições de qPCR para os genes *DQA1*05*, *DQB1*02*, *DQA1*03* e HGH

Etapas	Temperatura (° C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95	10 min.	1
Desnaturação	95	15 sec.	32
Anelamento e extensão	60	60 sec.	
Curva de melting - Passo 1	95	15 sec.	1
Curva de melting - Passo 1	60	60 sec.	
Curva de melting - Passo 1	60-95*	-	

*A temperatura aumenta de 60 a 95°C em intervalos de 0,3°C com monitoramentos simultâneos do sinal do *SYBR Green*.

O alelo *DQB1*03:02* foi amplificado a partir de um protocolo de PCR *touch-down*, de acordo com o descrito por Profaizer et al (112); detalhes em Tabela 5.

Tabela 5 - Condições da qPCR para o alelo *DQB1*03:02* descritos por Profaizer et al, 2011

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
	95°C	20 segundos	
Amplificação 1	71°C	45 segundos	2
	72°C	10 segundos	
	95°C	20 segundos	
Amplificação 2	70°C	45 segundos	10
	72°C	10 segundos	
	95°C	20 segundos	
Amplificação 3	69°C	45 segundos	10
	72°C	10 segundos	
	95°C	20 segundos	
Amplificação 4	67°C	45 segundos	5
	72°C	10 segundos	
	95°C	20 segundos	
Amplificação 5	66°C	45 segundos	5
	72°C	10 segundos	
	95°C	20 segundos	
Amplificação 6	65°C	45 segundos	2
	72°C	10 segundos	
	95°C	5 segundos	
Curva de <i>melting</i>	50°C	1 minuto	1
	97°C	Contínuo	

3.5.3.2 Análise dos dados processados pela técnica de PCR em tempo real

Foi realizada a análise das curvas de desnaturação (curva de *melting*) obtidas no final de cada reação de PCR em tempo real para garantir a qualidade do produto amplificado.

3.5.4 Técnica de PCR-SSP

Todas as amostras que apresentaram resultados positivos, analisados pelo método de PCR em tempo real, foram posteriormente analisados utilizando o *kit* comercial *DQ-CD Typing Plus* (*BioDiagene®*, *Palermo, Italy*), devidamente certificado pela Agência Espanhola de Medicamentos (Cert. 93/42/1.1-Ver. 20/02/2003). Esse *kit* é usado para identificação de vários alelos HLA de classe II associados a DC: *DQA1*02:01*, *DQA1*03*, *DQA1*05*, *DQB1*02*, *DQB1*03:01/04*, *DQB1*03:02*, *DRB1*03*, *DRB1*04*, *DRB1*07*, *DRB1*11*, *DRB1*12*. Além disso, permite identificar a presença de homozigose do alelo *DQB1*02*.

O princípio do método utilizado pelo *kit* consiste na amplificação dos genes alvos por PCR-SSP (*Sequence-Specific Primers*). Para cada amostra, são analisados 12 tubos de PCR, um tubo para cada alelo alvo. Cada tubo contém dois pares de *primers*, um par para amplificação do controle interno e outro para amplificação de um alelo específico.

3.5.4.1 Análise dos dados processados por PCR-SSP

A identificação e detecção dos alelos HLA de classe II estudados, foram realizadas por eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio (fornecido pelo fabricante). Ao finalizar a corrida de eletroforese, o gel de agarose foi exposto à luz ultravioleta (UV) e visualizado em fotodocumentador *AlphaDigiDoc®* (*Pro Alpha*

Innotech), o qual permite a visualização do material amplificado como bandas de tamanhos diferentes. O peso molecular do fragmento gerado é inversamente proporcional à velocidade de migração da banda que o contém e pode ser estimado em pares de bases (pb), mediante a comparação com bandas de tamanho conhecido ou marcador de peso molecular. Como referência, foi colocado um marcador de peso molecular fornecido pelo fabricante em cada corrida eletroforética realizada.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de dados foi realizada por meio do *software GraphPad Prism Version 5* e Microsoft Office Excel 2010. As frequências de ambos os grupos foram comparadas usando o teste de Fisher. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0.05$.

3.7 APROVAÇÃO DA PESQUISA

A pesquisa possui aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP-FS), registrado sob o número CEP-FS 132/08.

4 RESULTADOS

4.1 TESTES GENÉTICOS

4.1.1 PCR em tempo real (qPCR)

Das 100 amostras de crianças celíacas analisadas, 73% (n=73) foram positivas unicamente para os genes que codificam o heterodímero DQ2.5 (*DQA1*05-DQB1*02*), 7% (n=7) para DQ2.5 e DQ8, 12% (n=12) unicamente para DQ8 (*DQA1*03-DQB1*03:02*), 6% (n=6) foram positivas somente para o alelo *DQB1*02*, 1% (n=1) apresentou variantes de baixo risco e 1% (n=1) foi negativo para todos os alelos analisados.

No grupo de crianças não celíacas (n=110), 18,2% (n=20) foram positivas para os genes que codificam o heterodímero DQ2.5, 0,9% (n=1) para DQ2.5 e DQ8, 14,5% (n=16) unicamente para DQ8, 13,6% (n=15) para o alelo *DQB1*02*, 26,4% (n=29) apresentaram unicamente alelos de baixo risco e 26,4% (n=29) foram negativas para todos os alelos testados.

Os detalhes das amostras que foram positivas para os alelos de interesse e da análise estatística se mostram na tabela 7.

Tabela 6. Resultados obtidos por qPCR

	Crianças celíacas (n=100)		Crianças não celíacas (n=110)		Valor de p
	n	%	n	%	
DQ2.5	73	73	20	18,2	<0.0001
DQ2.5/DQ8	7	7	1	0,9	0,0288
DQ8	12	12	16	14,5	0,6858
DQB1*02	6	6	15	13,6	0,0706

4.1.1.1 Análise dos dados processados pela técnica de PCR em tempo real

Para comprovar que o produto de PCR obtido pertenceu ao alelo pesquisado, foram analisadas as curvas de desnaturação ao finalizar cada reação. A figura 11 mostra exemplos de picos de desnaturação gerados a partir da derivada da intensidade de fluorescência da curva de desnaturação (-R), onde se observa um único pico de *Temperature melting* (T_m) que é específico para cada alelo estudado, o que demonstra a presença de um único produto amplificado para cada par de *primers*. A T_m média correspondente a cada alelo alvo foi de $80,12 \pm 0,1^\circ\text{C}$ para o alelo *DQA1*05*; $86,49 \pm 0,13^\circ\text{C}$ para *DQB1*02*; $80,69 \pm 0,11^\circ\text{C}$ para *DQA1*03*; $86,15 \pm 0,23^\circ\text{C}$ para *DQB1*03:02* e $83,53 \pm 0,07^\circ\text{C}$ para o gene *HGH*.

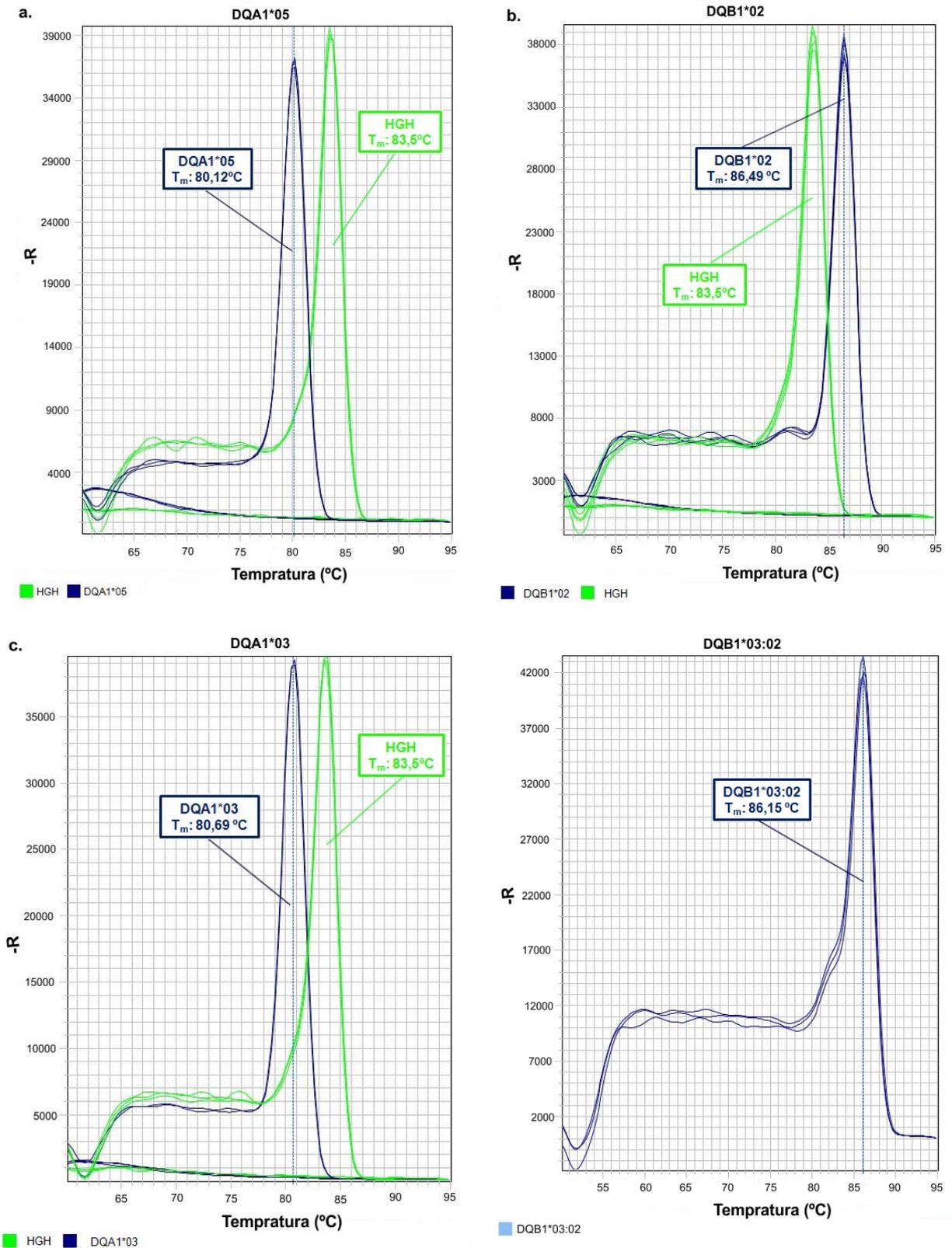


Figura 12. Curvas de desnaturação dos alelos predisponentes para doença celíaca e do controle endógeno HGH com suas respectivas T_m médias. **a.** DQA1*05 **b.** DQB1*02 **c.** DQA1*03 **d.** DQB1*03:02.

4.1.2 PCR-SSP

Esta técnica não só nos permitiu confirmar os dados obtidos por meio da técnica de qPCR com uma concordância de 100%, como também, identificar variantes adicionais, possibilitando uma avaliação mais detalhada das amostras anteriormente processadas. Com esses novos dados fomos capazes, por exemplo, de identificar a variante DQ2.2 codificada por *DQA1*02:01* e *DQB1*02:02*.

Em relação às crianças celíacas (n=100), 51% (n=51) apresentaram unicamente a variante DQ2.5, 22% (n=22) DQ2.5 e DQ2.2, 5% (n=5) somente DQ2.2, 7% (n=7) DQ2.5 e DQ8, 6% (n=6) DQ2.2 e DQ8, 6% (n=6) foram positivas unicamente para DQ8, 1% (n=1) somente para o alelo *DQB1*02*, 1% (n=1) apresentou alelos de baixo risco e 1% (n=1) foi negativo para todos os alelos testados.

As crianças não celíacas (n=110) mostraram os seguintes resultados: 14.5% (n=16) foram positivas unicamente para a variante DQ2.5, 3.6% (n=4) para DQ2.5 e DQ2.2, 11.8% (n=13) somente para DQ2.2, 0.9% (n=1) para DQ2.5 e DQ8, 0.9% (n=1) para DQ2.2 e DQ8, 13.6% (n=15) unicamente para DQ8, 1.8% (n=2) somente apresentaram o alelo *DQB1*02*, 26.4% (n=29) foram positivas para alelos de baixo risco e 26.4% (n=29) não apresentou nenhum dos alelos analisados.

A tabela 8 mostra um resumo dos resultados previamente mencionados e as análises estatísticas correspondentes.

Tabela 7. Resultados obtidos por PCR-SSP

Genótipos	Variantes	Crianças celíacas (n=100)		Crianças não celíacas (n=110)		Valor de <i>p</i>
		n	%	n	%	
DQ2	DQ2.5	51	51	16	14,5	<0.0001
	DQ2.2	5	5	13	11,8	0,0888
	DQ2.5/DQ2.2	22	22	4	3,6	<0.0001
DQ8		6	6	15	13,6	0,0706
DQ2/DQ8	DQ2.5/DQ8	7	7	1	0,9	0,0288
	DQ2.2/DQ8	6	6	1	0,9	0,0554
<i>DQB1*02</i>		1	1	2	1,8	1,0000

4.1.2.1 Análise dos dados processados por PCR-SSP

Os produtos de PCR foram analisados por meio de uma corrida eletroforética em gel de agarose. Na figura 12 podemos observar um gel exposto à luz UV no qual os alelos alvo e o controle interno são identificados pelo tamanho do fragmento de amplificação ou banda. A tabela 6 mostra o peso molecular do controle interno e de cada banda dos alelos alvos.

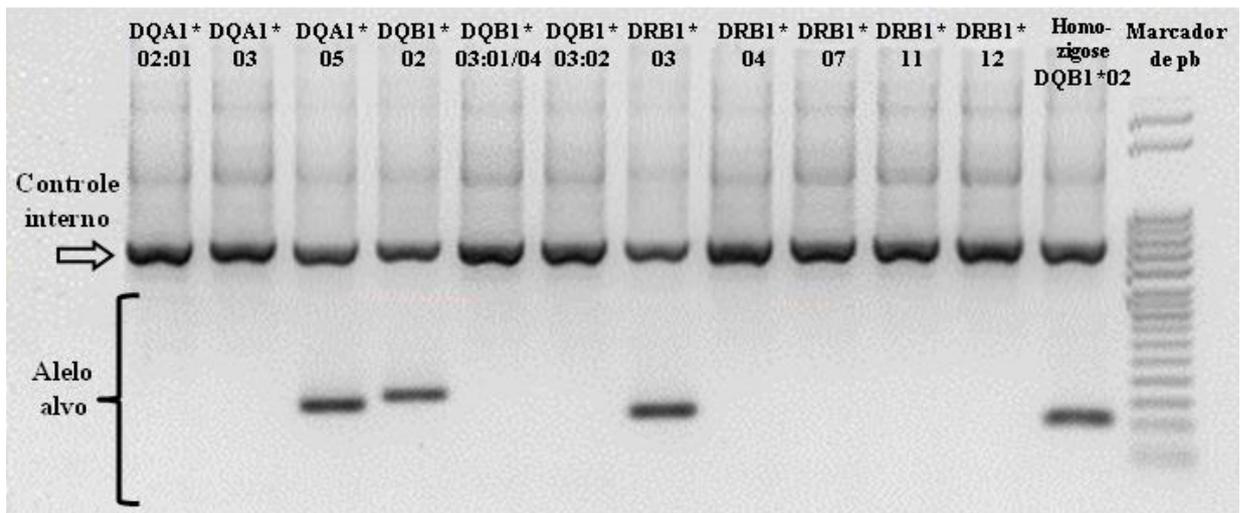


Figura 13. Corrida eletroforética de indivíduo portador do haplótipo DR3-DQ2.5. A seta na margem esquerda indica a banda do controle interno da reação. As bandas evidenciadas abaixo do controle interno nos poços 3, 4 e 7 demonstram a presença dos alelos *DQA1*05*, *DQB1*02* e *DRB1*03*. A banda presente no poço 7 indica que o alelo *DQB1*02* não está em homozigose. Na margem direita observa-se o marcador de peso molecular.

Tabela 8. Peso molecular de alelos evidenciados por meio de PCR-SSP

Alelo	Peso molecular (pb)
<i>DQA1*02:01</i>	170
<i>DQA1*03</i>	183
<i>DQA1*05</i>	186
<i>DQB1*02</i>	205
<i>DQB1*03:01/04</i>	250
<i>DQB1*03:02</i>	119
<i>DRB1*03</i>	151
<i>DRB1*04</i>	260
<i>DRB1*07</i>	232
<i>DRB1*11</i>	176
<i>DRB1*12</i>	248
Estado de heterozigose do alelo <i>DQB1*02</i>	111
Controle interno	796

Para cada alelo alvo há duas possibilidades de resultados: presença de duas bandas ou presença de apenas uma banda. A presença de duas bandas equivale a uma banda com um elevado peso molecular (796 pb), correspondente ao controle interno, e outra banda com baixo peso molecular, correspondente a presença do alelo alvo (Exemplo *DQA1*05* em figura 12).

Quando há a presença de apenas uma banda com elevado peso molecular (correspondente ao controle interno – 796 pb), significa que a amostra testada não possui o alelo alvo, ou seja, o resultado é negativo (Exemplo *DQA1*03* na figura 12).

A presença da banda correspondente ao estado de homozigose do alelo *DQB1*02* (111 pb) indica que o alelo em questão está em heterozigose na amostra testada (figura 13). Já a ausência dessa banda indica que a amostra testada está em homozigose para o alelo *DQB1*02*.

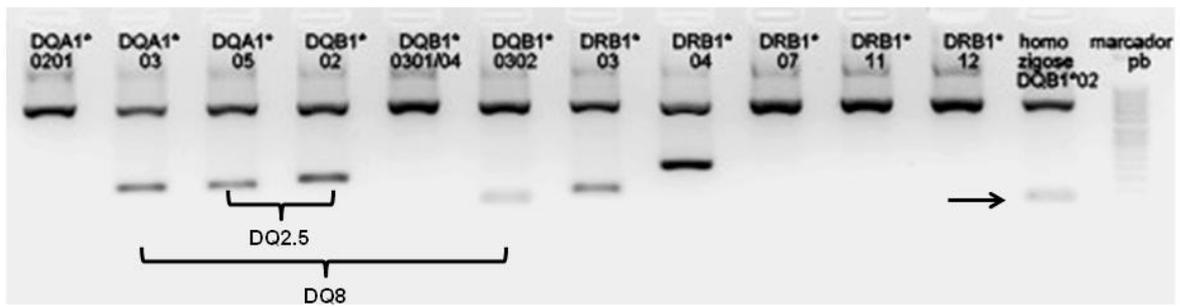


Figura 14. Amostra apresentando variantes DQ2.5 e DQ8. O alelo *DQB1*02* encontra-se em estado de heterozigose (Seta),

O heterodímero DQ2.5 é identificado pela presença dos alelos *DQA1*05* e *DQB1*02* (figura 14), comumente encontrados no haplótipo *DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02* (combinação *cis* – figura 14 A) ou nos haplótipos *DRB1*11/12-DQA1*05-DQB1*03:01*; *DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02* (combinação *trans* – figura 14 B). O heterodímero DQ8 é identificado pela presença dos alelos *DQA1*03* e *DQB1*03:02* (figura 9). Os alelos que formam o heterodímero DQ8 são encontrados no haplótipo *DRB1*04-DQA1*03-DQB1*03:02* (combinação *CIS*).

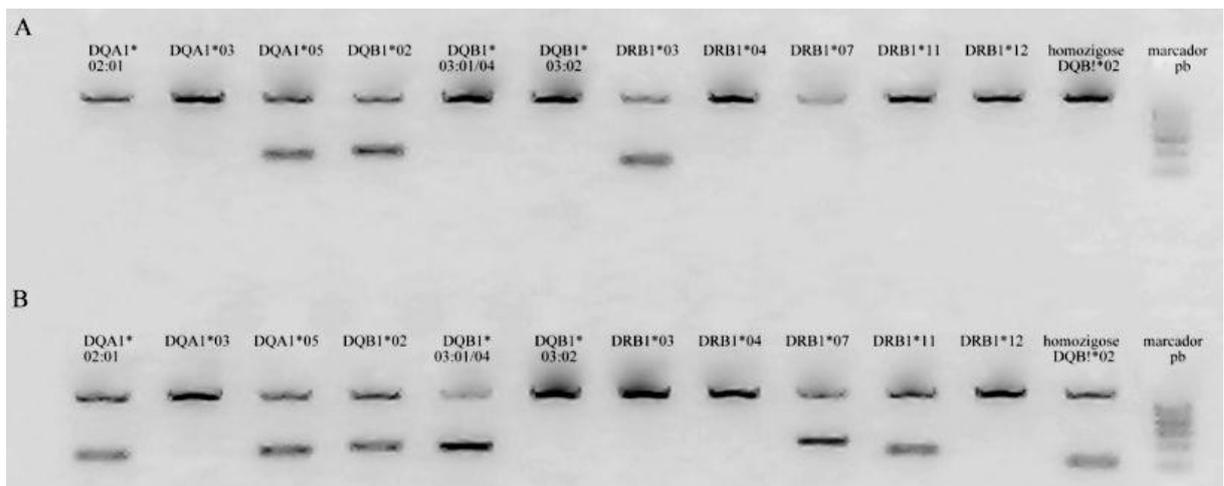


Figura 15. Configurações possíveis para formação da variante DQ2.5 **A.** Combinação *cis*. **B.** Combinação *trans*.

Quando o alelo *DQB1*02* está presente simultaneamente com o alelo *DQA1*02* (figura 15) são capazes de formar o heterodímero DQ2.2, encontrado no haplótipo *DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02*, o qual é semelhante ao DQ2.5. A presença do alelo *DQA1*05* e ausência do alelo *DQB1*02* identifica outro heterodímero diferente do DQ2 que é encontrado no haplótipo *DRB1*11/12-DQA1*05-DQB1*03:01*. Esse heterodímero confere um risco muito baixo para desenvolvimento de DC (52).

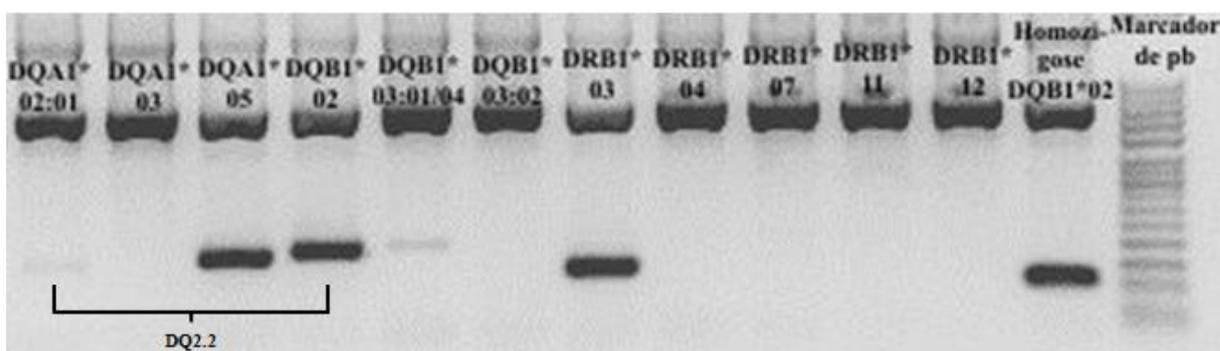


Figura 16. Exemplo de amostra positiva para DQ2.2

4.1.2.2 Comparação entre técnicas

Os resultados obtidos por ambas técnicas mostraram 100% de concordância, os detalhes podem ser observados na tabela 9.

Tabela 9. Comparação entre resultados obtidos por qPCR e PCR-SSP

Genótipos	Variantes	Crianças celíacas (n=100)		Crianças não celíacas (n=110)	
		qPCR	PCR-SSP	qPCR	PCR-SSP
DQ2	DQ2.5	73	51	20	16
	DQ2.2	-	5	-	13
	DQ2.5/DQ2.2	-	22	-	4
DQ8		12	6	16	15
DQ2/DQ8	DQ2.5/DQ8	7	7	1	1
	DQ2.2/DQ8	-	6	-	1
<i>DQB1*02</i>		6	1	15	2

5 DISCUSSÃO

Apesar de 25 a 40% da população geral ser portadora dos alelos que codificam os heterodímeros DQ2 e/ou DQ8 e somente 1% desenvolver a DC, sabemos que a proporção de pacientes que possuem a doença sem apresentar essas variantes é mínima, com porcentagens <0,5% (114). Isso significa que raramente encontraremos pacientes celíacos que sejam negativos quando testados para as variantes HLA-DQ2 e/ou DQ8. Por essa razão, podemos sugerir que a genotipagem de alelos HLA predisponentes possui um elevado valor preditivo negativo e fez com que se tornasse o teste genético de preferência (115). A genotipagem de alelos predisponentes é também considerada uma excelente ferramenta a ser utilizada previamente à realização de procedimentos mais invasivos como são as endoscopias seguidas de biópsias, quando a sorologia é ambígua (89,114,116). Esse teste é também muito usado para confirmar ou dispensar a necessidade de monitoramento médico em indivíduos que pertencem a grupos de risco, por exemplo, parentes de primeiro grau de pacientes celíacos, indivíduos com deficiência de imunoglobulina A, doenças autoimunes associadas à DC ou síndromes de Down, Turner ou Williams. Como consequência, a ausência de alelos de risco, pouparia o indivíduo de ter que se submeter a testes sorológicos subsequentes. Por outro lado, quem apresentasse esses alelos, deveria realizar testes de anticorpos anti-tTG IgA e anti-EMA IgA periódicos para evitar a não detecção de formas subclínicas ou silenciosas da doença (87,89,90).

Como já foi mencionado anteriormente, a prevalência de variantes predisponentes para DC tem sido descrita em vários países e, mesmo apresentando certas diferenças entre eles, o número de alelos predisponentes presentes nos grupos de pacientes celíacos foi sempre maior quando comparado com um grupo controle da mesma região (117–119). Porém, os trabalhos realizados no Brasil carecem de informação suficiente para realização de comparações com os estudos expostos anteriormente, já que possuem algumas limitações. Exemplos disso são as análises incompletas dos genes predisponentes (120), o estudo de uma única etnia em particular (56,120) ou a comparação de populações de celíacos com parentes de primeiro grau (121). A proposta desse trabalho foi comparar a prevalência de alelos

predisponentes para DC encontradas em grupos de crianças celíacas e não celíacas em uma população que pode ser considerada parcialmente representativa da população brasileira, desde que resultante de migrações sucessivas provenientes da quase totalidade do Brasil, a população brasiliense.

Como era esperado, a proporção de alelos predisponentes para DC achados na população de crianças celíacas foi maior que a de crianças não celíacas tanto por meio da técnica de qPCR (98% vs 47,2%) quanto de PCR-SSP (98% vs 47,1%). Contudo, nem todas as comparações apresentaram diferenças estatisticamente significativas, como foi o caso da variante DQ2.2 ($p=0,08$). Os alelos que codificam o heterodímero DQ2.2 não só deixaram de apresentar diferenças estatisticamente significativas entre grupos, como demonstraram estar levemente aumentados no grupo de crianças não celíacas. Por essa razão, sugere-se que mesmo que o heterodímero DQ2.2 seja semelhante ao DQ2.5, do ponto de vista molecular (99), sua inclusão como variante predisponente para DC não seria relevante na população estudada.

Outra variante que não apresentou diferenças significativas entre grupos foi o DQ8 ($p=0.0706$). Porém, podemos observar que ele ainda se encontra levemente aumentado no grupo de celíacos tanto quando analisado pela técnica de qPCR (19% vs 15,4%) quanto por PCR-SSP (19% vs 15,4%). Resultados similares foram apresentados por Castro-Antunes et al. em trabalho feito no nordeste do Brasil (121). Por outro lado, a prevalência de DQ8 nas crianças celíacas da população estudada (19%) foi maior que a descrita na Europa e similar à encontrada nos Estados Unidos, Cuba e América do Sul (62,118,121,122).

No entanto, a prevalência de variantes predisponentes no grupo de crianças não celíacas foi semelhante à achada em estudos feitos na população geral em diversos países europeus (101,114). Dados similares tinham sido descritos por Almeida (123) em estudo feito com recém-nascidos da mesma região do Brasil.

A prevalência das variantes alélicas que codificam para o heterodímero HLA-DQ2 (80%) apresentou o mesmo padrão de similaridade com populações não Europeias quando a única variante considerada relevante foi DQ2.5 (62,118,121,122).

Os dados obtidos mediante as técnicas de qPCR e PCR-SSP apresentaram 100% de concordância. Porém, o método desenvolvido no nosso laboratório conseguiu combinar a simplicidade técnica da qPCR, com menor tempo para obtenção de resultados e menor número de passos para sua execução, com a especificidade dos *primers* SSP. Além disso, por utilizar materiais de mais fácil acesso, apresentou custos e tempos de espera menores quando comparados com o kit comercial. Levando em consideração as vantagens custo-benefício apresentadas pela técnica de qPCR e a concordância dos dados obtidos com *kit* comercial, podemos concluir que a técnica por nós adotada mostrou-se apropriada para a análise de genótipos predisponentes para DC.

6 CONCLUSÃO

A prevalência de genótipos predisponentes para DC encontrada na população de crianças celíacas (DQ2: 80% e DQ8: 19%) foi similar à descrita para populações não europeias. Por outro lado, a proporção total desses alelos achados no grupo de crianças não celíacas (33,6%) mostrou-se semelhante à obtida para a população geral europeia, como já tinha sido descrito por Almeida em um trabalho realizado com recém-nascidos no Distrito Federal.

Os resultados obtidos a partir do processamento das amostras de crianças celíacas e não celíacas mostraram 100% de concordância quando avaliadas pelo método de qPCR (desenvolvido no nosso laboratório) e por PCR-SSP (com kit comercial).

Finalmente, os alelos que codificam o heterodímero HLA-DQ2.2 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de crianças celíacas e não celíacas. Contrariamente ao esperado, essa variante mostrou-se levemente aumentada no grupo de crianças não celíacas. Por essa razão, concluímos que a inclusão da variante HLA-DQ2.2 como genótipo predisponente para DC não seria relevante para a população analisada.

REFERENCIAS

1. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol.* janeiro de 2011;29:493–525.
2. Adams F. *The Extant Works of Aretaeus, the Cappadocian.* London: Sydenham Soc.; 1856. 510 p.
3. Gee S. *On the Coeliac Affection.* 1888.
4. DICKE WK, WEIJERS HA, KAMER JH v. D. Coeliac Disease The Presence in Wheat of a Factor Having a Deleterious Effect in Cases of Coeliac Disease. *Acta Pædiatrica.* Blackwell Publishing Ltd; 1 de janeiro de 1953;42(1):34–42.
5. Van Berge-Henegouwen GP, Mulder CJ. Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten free diet. *Gut.* 1993;34(11):1473–5.
6. Paulley JW. Observation on the aetiology of idiopathic steatorrhoea; jejunal and lymph-node biopsies. *Br Med J.* 1954;2(4900):1318–21.
7. Crosby WH, Army US, Kugler HW. Intraluminal biopsy of the small intestine - The intestinal biopsy capsule. *Am J Dig Dis.* 1957;2(5):236–41.
8. Marsh N, Crowe PT. Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity. 1995;9(2).
9. Oberhuber G. Histopathology of Celiac Disease. *Biomed & Pharmacother.* 2000;54(7):368–72.
10. Weijers, B. Lindquist, Ch. M. Anderson, J. Rey, D. H. Shmerling, J. K. Visakorpi, B. Hadorn RG. EUROPEAN SOCIETY FOR PAEDIATRIC GASTROENTEROLOGY. *Acta Pædiatrica.* Blackwell Publishing Ltd; 1 de julho de 1970;59(4):461–4.
11. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips a, Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* janeiro de 2012;54(1):136–60.
12. Anderson RP, Henry MJ, Taylor R, Duncan EL, Danoy P, Costa MJ, et al. A novel serogenetic approach determines the community prevalence of celiac disease and informs improved diagnostic pathways. *BMC Med. BMC Medicine;* 2013;11(1):188.

13. Bittolo M, Not T, Perticarari S, Cauci S, Graziosi G, Marzari R. A Dot Immunobinding Assay to Detect Anti-[alpha]-gliadin Antibodies in Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1990;11(3).
14. Chorzelski T, Jarzabek-Chorzelska M, Jabłońska S, Orth G, Rzeska G. An immunofluorescence complement-fixation test for detection of human papilloma viruses in various warts and wartlike lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Arch Dermatol Res.* 1983;275(1):53–7.
15. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.* 1997;3(7):797–801.
16. Bao F, Green PHR, Bhagat G. An update on celiac disease histopathology and the road ahead. *Arch Pathol Lab Med.* 2012;136(7):735–45.
17. Risch N. Assessing the role of HLA-linked and unlinked determinants of disease. *Am J Hum Genet.* 1987;40(1):1–14.
18. Petronzelli F, Bonamico M, Ferrante P, Grillo R, Mora B, Mariani P, et al. Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of coeliac disease. *Ann Hum Genet.* 1997;61(Pt 4):307–17.
19. Bevan S, Popat S, Braegger CP, Busch a, O'Donoghue D, Falth-Magnusson K, et al. Contribution of the MHC region to the familial risk of coeliac disease. *J Med Genet.* 1999;36(9):687–90.
20. Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, et al. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut.* 2002;50(5):624–8.
21. Falchuk ZM, Rogentine GN, Strober W. Predominance of histocompatibility antigen HL-A8 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *J Clin Invest.* 1972;51(6):1602–5.
22. Stokes PL, Holmes GKT, Asquith P, Mackintosh P, Cooke WT. HISTOCOMPATIBILITY ANTIGENS ASSOCIATED WITH ADULT CŒLIAC DISEASE. *Lancet.* Elsevier; 21 de junho de 2015;300(7769):162–4.
23. Keuning JJ, Peña a. S, Van Hooff JP, Van Leeuwen a., Van Rood JJ. Hla-Dw3 Associated With Cœliac Disease. *Lancet.* 1976;307(7958):506–8.
24. Ek J, Albrechtsen D, Solheim G, Thorsby E. Strong Association between the HLA-Dw3-Related B Cell Alloantigen -DRw3 * and Coeliac Disease. *Scand J Gastroenterol.* 1978;13(2):229–33.
25. Tosi R, Vismara D, Tanigaki N, Ferrara GB, Cicimarra F, Buffolano W, et al. Evidence that celiac disease is primarily associated with a DC locus allelic specificity. *Clin Immunol Immunopathol.* 1983;28(3):395–404.

26. Sollid LM, Gunnar Markussen JE, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. EVIDENCE FOR A PRIMARY ASSOCIATION OF CELIAC DISEASE TO A PARTICULAR HLA-DQ α/β HETERODIMER. *J Exp Med*. 1989;169(January):345–50.
27. Spurkland A, Sollid LM, Polanco I, Vartdal F, Thorsby E. HLA-DR and -DQ Genotypes of Celiac Disease Patients Serologically Typed to Be Non-DR3 or Non-DR5 / 7. 1992;188–92.
28. Van de Wal Y, Kooy YM, van Veelen P a, Peña S a, Mearin LM, Molberg O, et al. Small intestinal T cells of celiac disease patients recognize a natural pepsin fragment of gliadin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(17):10050–4.
29. Sjöström H, Lundin KE a, Molberg, Körner R, Mcadam SN, Anthonsen D, et al. Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: General importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition. *Scand J Immunol*. 1998;48(2):111–5.
30. Arentz-Hansen H, Körner R, Molberg O, Quarsten H, Vader W, Kooy YM, et al. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med*. 2000;191(4):603–12.
31. Henderson KN, Tye-Din J a., Reid HH, Chen Z, Borg N a., Beissbarth T, et al. A Structural and Immunological Basis for the Role of Human Leukocyte Antigen DQ8 in Celiac Disease. *Immunity*. 2007;27(July):23–34.
32. Kim C-Y, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C, Sollid LM. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 23 de março de 2004;101(12):4175–9.
33. Hovhannisyan Z, Weiss A, Martin A, Wiesner M, Tollefsen S, Yoshida K, et al. The role of HLA-DQ8 beta57 polymorphism in the anti-gluten T-cell response in coeliac disease. *Nature*. 2008;456(7221):534–8.
34. Tye-Din J a, Stewart J a, Dromey J a, Beissbarth T, van Heel D a, Tatham A, et al. Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci Transl Med*. 2010;2:41ra51.
35. Yoshida K, Corper AL, Herro R, Jabri B, Wilson I a., Teyton L. The diabetogenic mouse MHC class II molecule I-Ag7 is endowed with a switch that modulates TCR affinity. *J Clin Invest*. 2010;120(5):1578–90.
36. Ferguson A, McClure JP, Macdonald TT, Holden RJ. CELL-MEDIATED IMMUNITY TO GLIADIN WITHIN THE SMALL-INTESTINAL MUCOSA IN COELIAC DISEASE. *Lancet*. Elsevier; 21 de junho de 1975;305(7912):895–7.
37. MacDonald TT, Ferguson A. Hypersensitivity Reactions in the Small Intestine. *Digestion*. 1976;17(1-2):81–91.

38. Lundin KEA, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS, Fausa O, et al. Gliadin-specific, HLA-DQ(1*0501, 1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med.* 1993;178(July):187–196.
39. Lundin KE, Scott H, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM. T cells from the small intestinal mucosa of a DR4, DQ7/DR4, DQ8 celiac disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8. *Hum Immunol.* 1994;41:285–91.
40. Molberg O, Kett K, Scott H, Thorsby E, Sollid L, Lundin K. Gliadin specific, HLA DQ2-restricted T cells are commonly found in small intestinal biopsies from coeliac disease patients, but not from controls. *Scand J Immunol.* 1997;46(3):103–9.
41. Molberg O, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med.* 1998;4(6):713–7.
42. Van de Wal Y, Kooy Y, van Veelen P, Peña S, Mearin L, Papadopoulos G, et al. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol.* 1998;161(4):1585–8.
43. Lionetti E, Catassi C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int Rev Immunol.* 2011;30(4):219–31.
44. Green PHR, Cellier C. Celiac Disease. *N Engl J Med.* 2007;357(17):1731–43.
45. Mahadev S, Green PHR. Celiac disease: A challenge for all physicians. *Gastroenterol Hepatol.* 2011;7(8):554–6.
46. Thomas HJ, Ahmad T, Rajaguru C, Barnardo M, Warren BF, Jewell DP. Contribution of histological, serological, and genetic factors to the clinical heterogeneity of adult-onset coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(9):1076–83.
47. Cataldo F, Lio D, Simpore J, Musumeci S. Consumption of Wheat Foodstuffs Not a Risk for Celiac Disease Occurrence in Burkina Faso. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2002;35(2):233–4.
48. Catassi C, Räscht IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Asmar R, et al. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet.* 1999;354(9179):647–8.
49. Gujral N. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol.* 2012;18(42):6036.
50. Catassi C, Kryszak D, Louis-Jacques O, Duerksen DR, Hill I, Crowe SE, et al. Detection of Celiac disease in primary care: a multicenter case-finding study in North America. *Am J Gastroenterol.* 2007;102(7):1454–60.

51. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, et al. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med*. 2010;42(8):587–95.
52. Megiorni F, Mora B, Bonamico M, Barbato M, Nenna R, Maiella G, et al. HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Hum Immunol. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics*; 2009;70(1):55–9.
53. FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations. [Internet]. Recuperado de: http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/FB/*E
54. Tack GJ, Verbeek WHM, Schreurs MWJ, Mulder CJJ. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol. Nature Publishing Group*; 2010;7(4):204–13.
55. Mankai a., Landolsi H, Chahed a., Gueddah L, Limem M, Ben Abdessalem M, et al. Celiac disease in Tunisia: Serological screening in healthy blood donors. *Pathol Biol*. 2006;54(1):10–3.
56. Almeida RC, Gandolfi L, De Nazaré Klautau-Guimarães M, Ferrari Í, Sousa SMB, Abe-Sandes K, et al. Does celiac disease occur in afro-derived brazilian populations? *Am J Hum Biol*. 2012;24(5):710–2.
57. Crovella S, Brandao L, Guimaraes R, Filho JLDL, Arraes LC, Ventura A, et al. Speeding up coeliac disease diagnosis in the developing countries. 2007;39:900–2.
58. Pratesi R, Gandolfi L, Garcia SG, Modelli IC, Lopes de Almeida P, Bocca a L, et al. Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population. *Scand J Gastroenterol*. 2003;38(7):747–50.
59. Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA, Cortez AJP, Carvalho FO, Bordin JO, et al. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007;19(1).
60. Gandolfi L, Pratesi R, Cordoba JCM, Tauil PL, Gasparin M, Catassi C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol*. 2000;95(3):689–92.
61. 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. *PLoS One*. 2015;10(5):e0124040.
62. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, et al. Prevalence of Celiac Disease in At-Risk and Not-At-Risk Groups in the United States. *Arch Intern Med*. 2003;163(3):286–92.

63. Cook HB, Burt MJ, Collett J a, Martin R, Frampton CM a, Chapman B a. COELIAC DISEASE Adult coeliac disease: Prevalence and clinical significance. 2000;(March):1032–6.
64. Hovell CJ, Collett JA, Vautier G, Cheng AJ, Sutanto E, Mallon DF, et al. High prevalence of coeliac disease in a population-based study from Western Australia: a case for screening? *Med J Aust.* Australia; setembro de 2001;175(5):247–50.
65. Sood A, Midha V, Sood N, Avasthi G, Sehgal A. Prevalence of celiac disease among school children in Punjab, North India. *J Gastroenterol Hepatol.* Australia; outubro de 2006;21(10):1622–5.
66. Tatar G, Elsurur R, Simsek H, Balaban YH, Hascelik G, Ozcebe OI, et al. Screening of tissue transglutaminase antibody in healthy blood donors for celiac disease screening in the Turkish population. *Dig Dis Sci.* United States; setembro de 2004;49(9):1479–84.
67. Bonamico M, Ferri M, Mariani P, Nenna R, Thanasi E, Luparia RPL, et al. Serologic and genetic markers of celiac disease: a sequential study in the screening of first degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* United States; fevereiro de 2006;42(2):150–4.
68. Wouters J, Weijerman ME, van Furth AM, Schreurs MWJ, Crusius JBA, von Blomberg BME, et al. Prospective human leukocyte antigen, endomysium immunoglobulin A antibodies, and transglutaminase antibodies testing for celiac disease in children with Down syndrome. *J Pediatr.* United States; fevereiro de 2009;154(2):239–42.
69. Frost AR, Band MM, Conway GS. Serological screening for coeliac disease in adults with Turner's syndrome: prevalence and clinical significance of endomysium antibody positivity. *Eur J Endocrinol.* England; abril de 2009;160(4):675–9.
70. Volta U, Tovoli F, Caio G. Clinical and immunological features of celiac disease in patients with Type 1 diabetes mellitus. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* England; agosto de 2011;5(4):479–87.
71. Wang N, Shen N, Vyse TJ, Anand V, Gunnarson I, Sturfelt G, et al. Selective IgA deficiency in autoimmune diseases. *Mol Med.* United States; 2011;17(11-12):1383–96.
72. Metso S, Hyytia-Ilmonen H, Kaukinen K, Huhtala H, Jaatinen P, Salmi J, et al. Gluten-free diet and autoimmune thyroiditis in patients with celiac disease. A prospective controlled study. *Scand J Gastroenterol.* England; janeiro de 2012;47(1):43–8.
73. Panetta F, Nobili V, Sartorelli MR, Papa RE, Ferretti F, Alterio A, et al. Celiac disease in pediatric patients with autoimmune hepatitis: etiology, diagnosis,

- and management. *Paediatr Drugs. New Zealand*; fevereiro de 2012;14(1):35–41.
74. Naveh Y, Rosenthal E, Ben-Arieh Y, Etzioni A. Celiac disease-associated alopecia in childhood. *J Pediatr. UNITED STATES*; março de 1999;134(3):362–4.
 75. Nieuwenhuis WP, Kneepkens CMF, Houwen RHJ, de Beer HJA, Mulder CJ, Mearin ML. [Guideline “Coeliac disease and dermatitis herpetiformis”]. *Ned Tijdschr Geneeskd. Netherlands*; 2010;154:A1904.
 76. Freeman HJ. Risk factors in familial forms of celiac disease. *World J Gastroenterol. China*; abril de 2010;16(15):1828–31.
 77. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology*. fevereiro de 2001;120(3):636–51.
 78. Mäki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet. Elsevier*; 21 de junho de 1997;349(9067):1755–9.
 79. Ludvigsson JF, Leffler D a., Bai JC, Biagi F, Fasano a., Green PHR, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2012;(June 2011):43–52.
 80. Admou B, Essaadouni L, Krati K, Zaher K, Sbihi M, Chabaa L, et al. Atypical celiac disease: From recognizing to managing. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012.
 81. Caproni M, Bonciolini V, D’Errico A, Antiga E, Fabbri P. Celiac disease and dermatologic manifestations: Many skin clue to unfold gluten-sensitive enteropathy. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012.
 82. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med. BioMed Central Ltd*; 2012;10(1):13.
 83. Kneepkens CMF, Von Blomberg BME. Clinical practice: Coeliac disease. *Eur J Pediatr*. 2012;171(7):1011–21.
 84. Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology. United States*; dezembro de 2006;131(6):1981–2002.
 85. Schuppan D, Zimmer K-P. The diagnosis and treatment of celiac disease. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110(49):835–46.

86. Husby S, Murray J a. Diagnosing coeliac disease and the potential for serological markers. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. Nature Publishing Group; 2014;11(11):655–63.
87. Wolters VM, Wijmenga C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am J Gastroenterol*. janeiro de 2008;103(1):190–5.
88. Chang M, Green PHR. Genetic testing before serologic screening in relatives of patients with celiac disease as a cost containment method. *J Clin Gastroenterol*. 2009;43(1):43–50.
89. Kaukinen K, Partanen J, Ph D, Ma M, Collin P. HLA-DQ Typing in the Diagnosis of Celiac Disease. 2002;97(3):0–4.
90. Bjorck S, Brundin C, Lornic E, Lynch KF, Agardh ÅD. Screening Detects a High Proportion of Celiac Disease in Young HLA-genotyped Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;50(1):49–53.
91. Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg Ø, Scott H, Koning F, Jung G, et al. The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med*. 2004;1(1):084–95.
92. Sollid LM, Bana J. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(4):294–302.
93. Vodjani A. Immunosciences Lab. Inc [Internet]. 2007. Recuperado de: <http://glutensensitivity.net/VojdaniDiagrams.htm>
94. Qiao S-W, Sollid LM, Blumberg RS. Antigen presentation in celiac disease. *Curr Opin Immunol*. 2009;21(1):111–7.
95. Gianfrani C, Auricchio S, Troncone R. Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Immunol Lett*. 2005;99(2):141–5.
96. Ebert EC. Interleukin 15 is a potent stimulant of intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*. UNITED STATES; dezembro de 1998;115(6):1439–45.
97. Abadie V, Discepolo V, Jabri B. Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Semin Immunopathol*. Germany; julho de 2012;34(4):551–66.
98. Trynka G, Hunt K, Bockett N, Romanos J, Mistry V, Szperl a, et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet*. Nature Publishing Group; 2011;43(12):1193–201.
99. Mubarak A, Spierings E, Wolters V, van Hoogstraten I, Kneepkens CMF, Houwen R. Human leukocyte antigen DQ2.2 and celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. abril de 2013;56(4):428–30.

100. 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. *Hum Immunol.* abril de 2003;64(4):469–77.
101. Megiorni F, Pizzuti A. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *J Biomed Sci. Journal of Biomedical Science;* janeiro de 2012;19(1):88.
102. Louka AS, Sollid LM. HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens.* 2003;61(2):105–17.
103. Thorsby E. A short history of HLA. *Tissue Antigens.* Denmark; agosto de 2009;74(2):101–16.
104. Thorsby E. On the future of HLA. *Tissue Antigens.* Denmark; outubro de 2011;78(4):229–40.
105. Expert Reviews in Molecular Medicine ©2003 Cambridge University Press [Internet]. Recuperado de: http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_07/S1462399403005957sup009.gif
106. EMBL-EBI. IPD-IMGT/HLA [Internet]. Recuperado de: <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html>
107. Bodd M, Kim C-Y, Lundin KE a, Sollid LM. T-cell response to gluten in patients with HLA-DQ2.2 reveals requirement of peptide-MHC stability in celiac disease. *Gastroenterology.* março de 2012;142(3):552–61.
108. Fallang L-E, Bergseng E, Hotta K, Berg-Larsen A, Kim C-Y, Sollid LM. Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2.5 or HLA-DQ2.2 are related to sustained gluten antigen presentation. *Nat Immunol.* Nature Publishing Group; 2009;10(10):1096–101.
109. Polvi A, Arranz E, Fernandez-Arquero M, Collin P, Mäki M, Sanz A, et al. HLA-DQ2-Negative Celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol.* 1998;59(3):169–75.
110. Miller S.A. DDD and PHF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Research.* 1988;16(3):55404.
111. Olerup O, Aldener A FA. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens.* 1993;41:119–34.
112. Profaizer T, Eckels D, Delgado JC. Celiac disease and HLA typing using real-time PCR with melting curve analysis. *Tissue Antigens.* julho de 2011;78(1):31–7.

113. Selleski N, Almeida LM, Almeida FC De, Gandolfi L, Pratesi R, Nóbrega YK de M. SIMPLIFYING CELIAC DISEASE PREDISPOSING HLA-DQ ALLELES DETERMINATION BY THE REAL TIME PCR METHOD. *Arq Gastroenterol.* 2015;52(1):1–4.
114. Sollid LM, Lie BA. Celiac Disease Genetics: Current Concepts and. *Clin Gastroenterology Hepatol.* 2005;3(9):843–51.
115. Dubois PCA, Trynka G, Franke L, Hunt KA, Romanos J, Curtotti A, et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nat Genet. Nature Publishing Group;* 2010;42(4):295–302.
116. Anderson RP, Henry MJ, Taylor R, Duncan EL, Danoy P, Costa MJ, et al. A novel serogenetic approach determines the community prevalence of celiac disease and informs improved diagnostic pathways. *BMC Med. BMC Medicine;* janeiro de 2013;11(1):188.
117. Alarida K, Harown J, Di Pierro MR, Drago S, Catassi C. HLA-DQ2 and -DQ8 genotypes in celiac and healthy Libyan children. *Dig Liver Dis. Editrice Gastroenterologica Italiana;* junho de 2010;42(6):425–7.
118. Bravo FP, Araya M, Mondragón a., Ríos G, Alarcón T, Roessler JL, et al. Genetic differences in HLA-DQA1* and DQB1* allelic distributions between celiac and control children in Santiago, Chile. *Hum Immunol.* 1999;60(3):262–7.
119. Vidales MC, Zubillaga P, Zubillaga I, Alfonso-Sánchez M a. Allele and haplotype frequencies for HLA class II (DQA1 and DQB1) loci in patients with celiac disease from Spain. *Hum Immunol.* 2004;65(4):352–8.
120. Silva EM, Fernandes MI, Galvão LC, Sawamura R, Donadi E a. Human leukocyte antigen class II alleles in white Brazilian patients with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;31(4):391–4.
121. Castro-Antunes MM, Crovella S, Brandão LAC, Guimaraes RL, Motta MEFA, Silva GAP Da. Fequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 in celiac patients and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil. *Clinics (Sao Paulo).* 2011;66(2):227–31.
122. Cintado A, Sorell L, Galván J a., Martínez L, Castañeda C, Fragoso T, et al. HLA DQA1*0501 and DQB1*02 in Cuban Celiac Patients. *Hum Immunol.* 2006;67(8):639–42.
123. Almeida FCDE. Prevalência dos genes HLA-DQ2 e DQ8 , predisponentes para doença celíaca , em recém-nascidos do Distrito Federal. Universidade de Brasília; 2014.

ANEXO



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto: 132/2008

Título do Projeto: Rastreamento sorológico e determinação da presença de HLA predisponentes (DQ2 e DQ8) em crianças sem evidência clínica para doença celíaca.

Pesquisadora Responsável: Rodrigo Coutinho de Almeida

Data de entrada: 16/09/2008

Com base nas Resoluções 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto 132/2008 com o título: "Rastreamento sorológico e determinação da presença de HLA predisponentes (DQ2 e DQ8) em crianças sem evidência clínica para doença celíaca", analisado na 9ª Reunião Ordinária realizada no dia 14 de Outubro de 2008.

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 21 de Novembro de 2008.

Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP/FS/UnB