UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Nutrição

Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos

Dissertação

Frequência dos alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 associados com a doença celíaca em portadores de doenças autoimunes da tireoide

Clédia Silveira Flores da Silva

Pelotas, 2019

Clédia Silveira Flores da Silva

Frequência dos alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 associados com a doença celíaca em portadores de doenças autoimunes da tireoide

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientadora: Fabiana Torma Botelho

Co-orientador: Carlos Castilhos de Barros

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586f Silva, Clédia Silveira Flores da

Frequência dos alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 associados com a doença celíaca em portadores de doenças autoimunes da tireoide / Clédia Silveira Flores da Silva ; Fabiana Torma Botelho, orientadora ; Carlos Castilhos de Barros, coorientador. — Pelotas, 2019.

82 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Doença celíaca. 2. HLA. 3. Hipotireoidismo. 4. ESPGHAN. I. Botelho, Fabiana Torma, orient. II. Barros, Carlos Castilhos de, coorient. III. Título.

CDD : 641.1

Elaborada por Aline Herbstrith Batista CRB: 10/1737

Clédia Silveira Flores da Silva

Frequência dos alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 associados com a doença celíaca em portadores de doenças autoimunes da tireoide

Dissertação apresentada como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Nutrição e Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 06/09/2019

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Fabiana Torma Botelho (orientadora)
Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Augusto Schneider
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Profa. Dra. Ines Schadock
Doutora em Ciências Biológicas pela Humboldt-Universität Zu Berlin, HUB, Alemanha.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Dra. Fabiana, minha orientadora, por todo aprendizado que me foi passado nesses últimos anos.

Ao meu co-orientador Dr. Carlos, por todos os ensinamentos na realização das análises de biologia molecular.

Os meus cordiais agradecimentos a todas as professoras que contribuíram para o meu crescimento acadêmico.

Quero agradecer as amizades que o Mestrado me proporcionou: Natália e Raíssa por tornarem as minhas coletas de dados mais agradáveis, a Raíssa pela parceria no laboratório e a Natalia por escutar todos os meus medos e anseios.

Ao meu pai Carlos (*In memorian*), por guiar meus passos, me dar força para realizar meus objetivos e por ser minha maior motivação para querer estudar cada vez mais.

À minha mãe por contribuir com a realização dos meus sonhos, por ligar para saber se estou me alimentando e lembrar que é hora de descansar um pouco.

Não poderia deixar de agradecer ao meu noivo João Inácio, por ser meu maior incentivador e por estar presente em todas as horas.

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”
Albert Einstein

Resumo

SILVA, Clédia Silveira Flores. **Frequência dos alelos HLA associados com a doença celíaca em portadores de doenças autoimunes da tireoide.** Orientadora: Fabiana Torma Botelho. 2019.82f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) - Programa de Pós- Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

A doença celíaca (DC) é uma enteropatia imunológica caracterizada por histopatologia intestinal típica com atrofia das vilosidades e hiperplasia de cripta da mucosa do intestino delgado, ocasionada pela ingestão de gliadinas de trigo em indivíduos geneticamente predispostos. A etiologia da DC é composta por fatores ambientais e genéticos. Em relação aos fatores genéticos, o *Human leukocyte antigen* (HLA), confere 40% da variância genética. Esta susceptibilidade está associada ao sistema HLA, principalmente com os alelos DQA1*05 e DQB1*02, que codificam a molécula DQ2 e os alelos DQB1*0302 e DRB1*04, que codificam a cadeia beta da molécula DQ8. O teste HLA-DQ tem relevância diagnóstica por causa do alto valor preditivo negativo em grupos com risco de DC, incluindo parentes de primeiro grau e indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 1, doenças autoimunes da tireoide, síndrome de Down, síndrome de Turner, síndrome de Williams ou dermatite herpetiforme. O *European Society of Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN) propôs recentemente novos critérios para o diagnóstico de DC. Entre esses, o rastreio para a presença de HLA-DQ2.5 e HLA-DQ8 em pacientes com risco de DC, sendo este um método simples, menos invasivo e confiável. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a prevalência dos alelos HLA em portadores de doenças autoimunes da tireoide que frequentam os Ambulatórios de Nutrição e Endocrinologia da Universidade Federal de Pelotas. Depois de realizado os esclarecimentos e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, os indivíduos responderam a um questionário sociodemográfico e questões sobre sua saúde. Posteriormente, o DNA genômico foi extraído das células da mucosa bucal. Para a genotipagem dos alelos DQA1*0501, DQB1*0201 e DRB1*04, foram utilizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores nucleotídicos específicos. Participaram deste estudo 110 portadores de DAT. Observou-se que 66,4% dos indivíduos carregavam pelo menos um dos alelos estudados e que 58,2% dos indivíduos eram positivos para pelo menos um dos alelos HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201). Com relação ao HLA-DQ8 (DRB1*04), 21,82% da população estudada eram positivos para esse alelo e 3,6% eram positivos tanto para o HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) quanto para o HLA-DQ8 (DRB1*04). O rastreamento genético nessa população de risco é importante, pois o diagnóstico precoce evita morbidades e melhora a qualidade de vida.

Palavras-chaves**:** doença celíaca; HLA; hipotireoidismo; ESPGHAN.

Abstract

SILVA, Clédia Silveira Flores. **Frequency of HLA and non-HLA alleles with celiac disease in patients with autoimmune thyroid disease.** Advisor: Fabiana Torma Botelho. 2019. 82f. Dissertation (Master in Nutrition and Food) - Graduate Program in Nutrition and Food, Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2019.

Celiac disease (CD) is an immunological enteropathy characterized by typical intestinal histopathology with villous atrophy and small bowel mucosa crypt hyperplasia caused by ingestion of wheat gliadin in genetically predisposed individuals. The etiology of CD is composed of environmental and genetic factors. Regarding genetic factors, Human leukocyte antigen (HLA), gives 40% of the genetic variance. This susceptibility is associated with the HLA system, mainly with the DQA1 *05 and DQB1*02 alleles, which encode the DQ2 molecule and the DQB1*0302 and DRB1*04 alleles, which encoding the beta chain of the DQ8 molecule. The HLA-DQ test has diagnostic relevance because of the high negative predictive value in groups at risk for CD, including first-degree relatives and individuals with type 1 diabetes mellitus, autoimmune thyroid disease, Down syndrome, Turner syndrome, Williams or dermatitis herpetiformis. The European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) recently proposed new criteria for the diagnosis of CD. Among these, screening for HLA-DQ2.5 and HLA-DQ8 in patients at risk for CD is a simple, less invasive and reliable method. Thus, the present study aimed to evaluate the prevalence of HLA alleles in patients with autoimmune thyroid disease attending the Nutrition and Endocrinology Outpatient Clinics of the Federal University of Pelotas. After the clarification and signing of the Informed Consent Form, the individuals answered a sociodemographic questionnaire and questions about their health. Subsequently, genomic DNA was extracted from buccal mucosa cells. For genotyping the DQA1*0501, DQB1*0201 and DRB1*04 alleles, polymerase chain reactions (PCR) with specific nucleotide primers were used. A total of 110 patients with DAT participated in this study. 66.4% of the individuals carried at least one of the studied alleles and 58.2% of the individuals were positive for at least one of the HLA-DQ2 alleles (DQA1*0501 and DQB1*0201). Regarding HLA-DQ8 (DRB1*04), 21.82% of the population studied were positive for this allele and 3.6% were positive for both HLA-DQ2 (DQA1*0501 and DQB1*0201) and HLA-DQ8 (DRB1*04). Genetic screening in this at-risk population is important because early diagnosis avoids morbidity and improves quality of life.

Keywords: celiac disease; HLA; Hypothyroidism; ESPGHAN.

Sumário

Projeto de dissertação

1. Introdução 5
2. Revisão Bibliográfica 6
2.1 Prevalência da DC no Brasil 12
2.2 Doenças autoimunes da tireoide 15
2.3 Doença celíaca e doenças autoimunes da tireoide 20
3. Justificativa 24
4. Objetivos 25
4.1 Objetivo geral 25
4.2 Objetivos específicos 25
5. Hipóteses 26
6. Materiais e métodos 27
6.1 População alvo e aspectos éticos 27
6.2 Rastreamento de alelos 29
6.2.1 Coleta de material 29
6.2.2 Logística 29
6.2.3 Extração do gDNA 29
6.2.4 Amplificação do DNA (PCR) 30
6. 3 Retorno dos resultados e orientações nutricionais 31
6.4 Análise estatística 32
7. Cronograma de atividades 32
8. Orçamento do projeto 33
Referências 34
Relatório de campo 49
Artigo 50
APÊNDICES 76
Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para maiores de dezoito anos 77
Apêndice B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para menores de dezoito anos 79
Apêndice C - Questionário com questões sociodemográficas e sobre saúde dos participantes do estudo 81

1. Introdução

A doença celíaca (DC) é caracterizada por uma enteropatia autoimune desencadeada por ingestão de glúten em indivíduos geneticamente predispostos portadores de haplótipos do *Human leukocyte antigen* (HLA) (FREIRE *et al.,* 2019), a qual desencadeia uma série de sintomas gastrointestinais, como má absorção de nutrientes, constipação crônica e dor abdominal além de linfomas intestinais de células T (RUBIO-TAPIA *et al.,* 2013). A etiologia da DC é composta por fatores ambientais e genéticos, sendo que o HLA confere 40% da variância genética. Grande parte dos pacientes carregam heterodímeros DQ2 (90%) codificados pelos alelos DQA1*05/DQB1*02 e uma minoria (5%) carrega DQ8 codificado por alelos DQA1*03/DQB1*0302/DRB1*04 e (5%) pelo menos um dos dois alelos DQ2 (geralmente o DQB1*0201) (SELLESKI *et al.,* 2015). A tipagem de HLA tem sido usada como uma ferramenta de rastreamento para população de alto risco, como portadores de diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Down, síndrome de Turner e doenças autoimunes da tireoide (DAT). A incidência de DC em pacientes com DAT pode chegar até dez vezes mais comparado com a população em geral (ALMEIDA *et al.,* 2016).

Acredita-se que essas populações com desordens autoimunes possuam esse risco maior para o desenvolvimento da doença devido à tipagem compartilhada de HLA (GUJRAL *et al.,* 2012). Portanto, a investigação da presença dos fatores de risco genético para DC pode auxiliar os portadores de DAT em um possível diagnóstico de DC e, consequentemente, após adesão ao tratamento com dieta sem glúten, poderá reduzir a dosagem da medicação utilizada para tratar a DAT e melhorar sua qualidade de vida (ELFSTROM *et al.,* 2008).

2. Revisão Bibliográfica

A DC é uma enteropatia imunológica caracterizada por histopatologia intestinal típica com atrofia das vilosidades e hiperplasia de cripta da mucosa do intestino delgado, ocasionada pela ingestão de gliadinas de trigo em indivíduos geneticamente predispostos (CATASSI *et al*., 2007; WOLTERS *et al.,* 2008; BRATANIC *et al.,* 2010).

O glúten é uma proteína encontrada em grãos de cereais como trigo, centeio e cevada. O glúten é rico em glutaminas e prolinas, é digerido de forma incompleta por peptidases de borda gástrica, pancreática e escova, restando peptídeos com até 33 aminoácidos de comprimento (SHAN *et al.,* 2002). Sendo constituído por componentes proteicos básicos como os polímeros de glutenina e monômeros de gliadina. As gluteninas são subdivididas em proteínas de baixo e alto peso molecular e a gliadina pode ser do tipo α, β, γ e ω (NIKULINA *et al.,* 2004; SERENA *et al.,* 2015). Tanto as gluteninas como as gliadinas são compostas por uma grande quantidade de prolinas (20%) e glutaminas (40%) que as protegem da degradação completa no trato gastrointestinal assim, tornando difícil a digestão (SKOVBJERG *et al.,* 2004; SERENA *et al.,* 2015).

Na DC, a gliadina, atinge o intestino delgado e desencadeia uma resposta inflamatória representada por atrofia das vilosidades e infiltração de células inflamatórias do epitélio e da lâmina própria (GREEN *et al.,* 2007; KAMBOJ *et al.,* 2017). Esta resposta inflamatória é mediada tanto pelo sistema imune inato quanto pelo sistema adaptativo. A resposta adaptativa ocorre na lâmina própria, é mediada pelos linfócitos T CD4+ que reconhecem e respondem aos peptídeos de gliadina produzindo citocinas pró-inflamatórias, como o interferon γ (NILSEN *et al.,*1998; GREEN *et al.,* 2007). Os peptídeos de gliadina são apresentados pelas *Antigen Presenting Cells* (APCs), que possuem na sua membrana a mólecula do *Major Histocompatibility Complex* (MHC) *o* HLA-DQ2 e DQ8 (SOLLID *et al.,* 2002; GREEN *et al.,* 2007). Ainda na lâmina própria, a enzima transglutaminase tecidual através da reação de desaminação possibilita que os resíduos de glutamina sejam desaminados a ácido glutâmico, tornando os peptídeos de gliadina com carga parcial negativa. Essas modificações químicas aumentam a afinidade de ligação dos peptídeos antígenos com as moléculas de MHC de classe II (HLA-DQ2 e HLA-DQ8) nas

APCs (SHAN *et al.,* 2002). Sendo assim, a enzima transglutaminase tecidual provoca a desaminação dos peptídeos de gliadina, aumentando sua imunogenicidade (MOLBERG *et al.,* 1998; GREEN *et al.,* 2007). No epitélio intestinal, a resposta imune inata caracteriza-se pelo aumento da expressão de interleucina-15 pelos enterócitos, resultando na ativação de linfócitos T CD8+ intraepiteliais que expressam o receptor ativo NKG2D, marcador das células Natural Killer (NK) (MENTION *et al.,* 2003; GREEN *et al.,* 2007), essas células quando ativadas tornam-se citotóxicas provocando a apoptose ao enterócitos que expressam na sua superfície o complexo de histocompatibilidade de classe I associado à cadeia A (MIC-A), antígeno induzido pelo estresse (MERESSE *et al.,* 2004; HUE *et al.,* 2004; GREEN *et al.,* 2007). Esse processo inflamatório da mucosa intestinal libera metaloproteínas, pertencentes à família das proteases neutras capazes de degradar a matriz extracelular, os componentes da membrana basal e participam da remodelação de componentes no dano inflamatório, induzindo a atrofia das vilosidades e hiperplasia de criptas, principais características da DC (MOHAMED *et al.,* 2006; GREEN *et al.,* 2007).

Os indivíduos portadores de DC podem apresentar sintomas gastrointestinais como perda de peso, retardo de crescimento, osteoporose, anemia, má absorção de nutrientes, constipação crônica e dor abdominal (SCHUPPAN *et al.,* 2013; MOHAMMDIBAKHSH *et al.,* 2017). A lesão da mucosa do intestino delgado provocada pelo glúten diminui a área de absorção intestinal e interfere na absorção de micronutrientes como: vitaminas lipossolúveis, ferro, vitamina B12 e ácido fólico (REILLY *et al.,* 2012; CASTILLO *et al.,* 2015).

O distúrbio metabólico comum na DC é a diminuição da massa óssea, devido à má absorção de cálcio e vitamina D. Em crianças, isso pode resultar no raquitismo, enquanto em adultos pode levar a diferentes graus de osteopenia e osteoporose (KEMPPAINEN *et al.,* 1999; MEYER *et al.,* 2001; CASSOL *et al.,* 2007), aumentando o risco de fraturas, especialmente em idosos (VAZQUEZ *et al.,* 2000; CASSOL *et al.,* 2007). Além dos sintomas gastrointestinais, a DC também pode causar sintomas extraintestinais como artralgia/artrite, alopecia, fadiga, dor de cabeça, anemia, feridas na boca, dores

musculares, depressão, erupções cutâneas, neuropatia, baixa estatura, puberdade tardia, osteoporose e infertilidade (DE RE *et al.,* 2017).

O diagnóstico da DC é considerado difícil, pois a doença pode ser confundida com outras enteropatias e, além disso, a multiplicidade dos sintomas gastrointestinais e extraintestinais, podendo postergar o diagnóstico (HUSBY *et al.,* 2012). O diagnóstico da DC é realizado através de uma combinação de testes sorológicos, biópsia do intestino delgado e resposta a uma dieta sem glúten. Diferentes testes de anticorpos sorológicos podem ser utilizados como testes iniciais em pacientes com DC clinicamente suspeita. Por causa da sua baixa sensibilidade e especificidade, os anticorpos anti-gliadina não são mais recomendados para testes iniciais. O teste para anticorpos endomisiais tem maior sensibilidade e especificidade, mas tem alto custo e o teste de transglutaminase tecidual (tTG) é de alta sensibilidade e especificidade, mas não é tão oneroso. Assim, IgA tTG é atualmente o teste de escolha para diagnóstico sorológico e monitoramento de DC (ROSTOM *et al.,* 2002; NIH,2004; AGA,2006; RUBIO-TAPIA *et al.,* 2013; PELKOWSKI *et al.,* 2014). Entretanto, a deficiência de IgA é conhecida como causa da ocorrência de resultados sorológicos falso-negativos, que é comum entre os indivíduos com DC (1:40) comparado com a população em geral (1:400) (VENTURA *et al.,* 2014). Sendo assim, o padrão-ouro para diagnosticar a DC na idade adulta é a biópsia intestinal revelada pela endoscopia (VILLANACI *et al.,* 2011; MILLS *et al.,* 2016). Através desta avaliação histológica é possível verificar os diferentes sinais como: atrofia das vilosidades, hiperplasia de criptas, diminuição da altura dos enterócitos e a presença de infiltrados inflamatórios na mucosa do intestino delgado (VILLANACI *et al.,* 2011).

A etiologia da DC é composta por fatores ambientais e genéticos. Em relação aos fatores genéticos, o HLA (antígeno leucocitário humano) confere 40% da variância genética (LUNDIN *et al.,* 2014; SERENA *et al.,* 2015), esses genes HLA codificam os heterodímeros formados por duas cadeias α e β que dão origem a molécula de MHC presente na membrana das APCs (DELVES *et al.,* 2000). O gene HLA-DQ no complexo HLA está localizado no braço curto do cromossomo 6p21 (HOWELL *et al.,* 1986; KAUR *et al.,* 2017),

Os genes HLA possuem três conjuntos de genes polimórficos denominados HLA-DR (HLA-DRA e HLA-DRB1), HLA-DP (HLA-DPA1 e HLA-DPB1) e HLA-DQ (HLA-DQA1 e HLA-DQB1) (SHIINA *et al.,* 2009; MEGIORNI *et al.,* 2012). A designação do loci dos genes HLA de classe II no cromossomo 6 consiste de três letras: a primeira (D) indica a classe (II), a segunda (Q, P ou R) a família, e a terceira (A ou B) indica a cadeia do heterodímero (α ou β, respectivamente) (DELVES *et al.,* 2000).

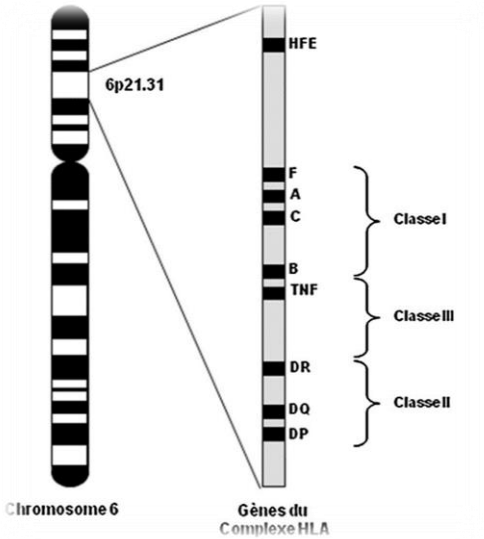


Figura 1. Localização do complexo HLA no cromossomo 6.
Adaptado de Roujon *et al.,* 2013.

O MHC classe II HLA-DQ2 e DQ8 conferem maior susceptibilidade à DC (LIONETTI *et al.,* 2014; SERENA *et al.,* 2015). Esta susceptibilidade está associada ao sistema HLA, principalmente com os alelos DQA1*05 e DQB1*02, que codificam a molécula DQ2 e o alelo DQB1*0302, que codifica a cadeia beta da molécula DQ8. No entanto, possuir um risco maior ou menor de desenvolver a doença depende da presença ou ausência desses alelos, sua combinação e/ou o número de cópias (MEGIORNI *et al.,* 2009; FERNÁNDEZ-CAVADA-POLLO *et al.,* 2013).

Os heterodímeros DQ2 são codificados em *cis* pelos alelos DQA1*0501 e DQB1*0201. Existe um desequilíbrio de ligação, portanto, esses alelos são transmitidos juntos para o alelo DRB1*03, na região DR. Este haplótipo é chamado DR3-DQ2. Todavia, os alelos posicionados em cromossomos homólogos, também podem codificar o heterodímero DQ2. Este é o caso dos

haplótipos DRB1*07- DQA1*0201- DQB1*0202 (DR7-DQ2) e DRB1*11-DQA1*0505-DQB1*03 (DR11-DQ2) (MEARIN *et al.,* 1983; MORELLINI *et al.,* 1988; SOLLID *et al.,* 1989; MUNIZ *et al.,* 2016). Os heterodímeros DQ8 são codificados por alelos DQA1*0301 e DQB1*0302 devido ao desequilíbrio de ligação, são transmitidos juntamente com o alelo DRB1*04, formando o haplótipo conhecido como DR4-DQ8. Tendo em vista, que a maioria dos pacientes com DC apresentam heterodímeros DQ2 e DQ8, esses marcadores genéticos juntos possuem um alto valor preditivo negativo (SPURKLAND *et al.,* 1992; LIU *et al.,* 2002; VAN HEEL *et al.,* 2005; MUNIZ *et al.,* 2016). Grande parte dos pacientes carregam heterodímeros de DQ2 (90%) codificadas pelos alelos DQA1*05/DQB1*02 e uma minoria (5%) carrega DQ8 codificado por alelos DQA1*03/DQB1*0302 e (5%) pelo menos um dos dois alelos DQ2 (geralmente o DQB1*0201) (ABADIE *et al.,* 2011; LIU *et al.,* 2014; LIONETTI *et al.,* 2014).

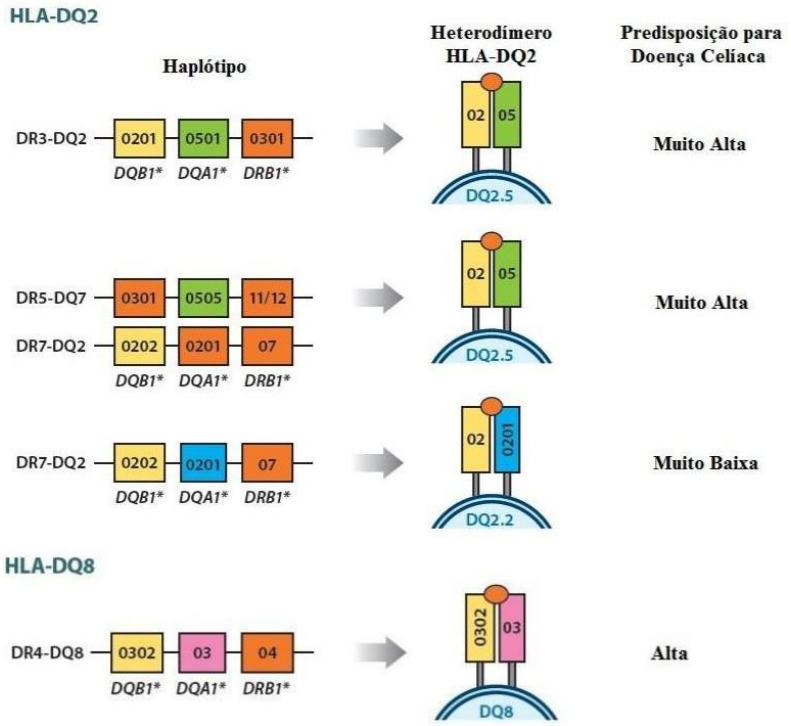


Figura 2. Antígeno Leucocitário Humano (HLA) associado com a DC. Adaptado de Abadie *et al.,* 2011.

A predisposição à DC está atribuída à expressão de heterodímeros, como por exemplo, indivíduos homozigotos para o haplótipo DR3-DQ2 ou

heterozigotos para DR3-DQ2/DR7-DQ2 expressam altos níveis de heterodímeros DQ2.5, os quais são considerados de risco muito elevado para o aparecimento da DC (VADER *et al.,* 2003; ABADIE *et al.,* 2011). Em contrapartida, o heterodímero HLA-DQ2.2, uma outra variante da molécula de HLA-DQ2, codificada pelos alelos HLA-DQA1*0201 e HLA-DQB1*02, confere um risco muito baixo para a DC. Entretanto, indivíduos DQ2 negativos expressam HLA-DQ8 o qual configura um risco elevado de predisposição para a DC (KARELL *et al.,* 2003; ABADIE *et al.,* 2011). Portanto, as moléculas de HLA-DQ2 e HLA-DQ8 realizam função importante na indução da DC, apresentam os peptídeos de gliadina que alcançam a lâmina própria e os peptídeos de gliadina desaminados aos linfócitos T CD4+. A relação entre a DC e o HLA-DQ foi demonstrada isolando células T reativas à gliadina da mucosa intestinal. Uma parte importante dessas células T ativadas reconheceu o glúten quando colocado em contato com o heterodímero HLA-DQ, demonstrando a associação das células T-HLA-DQ com a DC (LUNDIN *et al.,* 1993; KAUR *et al.,* 2017). Por esse motivo, o teste HLA-DQ tem relevância clínica devido ao alto valor preditivo negativo em grupos com risco de DC, incluindo parentes de primeiro grau e indivíduos com diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), doenças autoimunes da tireoide (DAT), síndrome de Down, síndrome de Turner, síndrome de Williams ou dermatite herpetiforme (SOLLID *et al.,* 2005; VAN BEEK *et al.,* 2013). O *European Society of Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN) propôs recentemente novos critérios para o diagnóstico de DC. Entre esses, foi citado o rastreio para a presença de HLA-DQ2.5 e HLA-DQ8 em pacientes com risco de DC (HUSBY *et al.,* 2012; VAN BEEK *et al.,* 2013).

Após a confirmação do diagnóstico com a biópsia intestinal revelada pela endoscopia, o tratamento eficaz para DC é baseado na adesão de dieta sem glúten, pois atualmente não há medicamentos que possam prevenir com segurança o dano da mucosa causado pela exposição ao glúten. Portanto, o termo "sem glúten" implica a remoção completa de todas as fontes dietéticas que possuam a proteína, tornando-se um desafio devido à contaminação de alimentos com vestígios de glúten (AKOBENG *et al.,* 2008; RUBIO-TAPIA *et al.,* 2013). A contaminação cruzada pode ocorrer por meio das áreas de

produção compartilhada, utensílios de cozinha higienizados de forma imprópria e através de procedimentos inadequados realizados pelos funcionários dos estabelecimentos (ARAÚJO *et al.,* 2010; FARAGE *et al.,* 2017). Estudos revelaram a contaminação por glúten em produtos industrializados e preparações de serviços alimentares (LAUREANO *et al.,* 2010; OLIVEIRA *et al.,* 2014; FARAGE *et al.,* 2017), dificultando a alimentação dos pacientes celíacos, pois a manutenção da proteína na dieta leva a persistência dos sintomas gastrointestinais (SAPONE *et al.,* 2012; FARAGE *et al.,* 2017). Sendo assim, o termo "sem glúten" indica uma dieta que contém glúten a um nível tão baixo que é considerado inofensivo, sugerindo que menos de 10 mg por dia não causam danos na maioria dos pacientes (AKOBENG *et al.,* 2008; RUBIO- TAPIA *et al.,* 2013).

A definição de alimentos sem glúten segundo o Codex Alimentarius são alimentos que tem menos de 20 p.p.m. de glúten. A adesão à dieta proporciona a resolução dos sintomas e reparação do dano intestinal ao longo do tempo, em contrapartida, a falta de adesão traz riscos para a saúde e aumenta a mortalidade. Há um risco aumentado de doenças malignas (por exemplo, adenocarcinoma de intestino delgado, câncer de esôfago, linfomas de células B e células não-Hodgkin) e linfomas intestinais de células T (LUDVIGSSON *et al.,* 2012; RUBIO-TAPIA *et al.,* 2013). Estudos mostraram que a dieta sem glúten melhorou os parâmetros nutricionais em adultos e crianças sintomáticas com DC (CORRAO *et al.,* 2001; WEST *et al.,* 2004; RUBIO-TAPIA *et al.,* 2013).

2.1 Prevalência da DC no Brasil

Estudos populacionais demonstraram a prevalência da DC entre 1:120 e 1:300 na população geral, tanto europeia quanto norte-americana. No Brasil, estudos com doadores de sangue mostraram a prevalência de 1:681 (Brasília/DF), 1:273 (Ribeirão Preto/SP) e 1:214 (São Paulo/SP), sugerindo que a DC não é uma doença rara em nosso país (NOT *et al.,* 1998; GANDOLFI *et al.,* 2000; MELO *et al.,* 2006; OLIVEIRA *et al.,* 2007).

A população brasileira possuí uma grande heterogeneidade genética resultante de mais de quinhentos anos de cruzamentos entre três etnias: os europeus, ameríndios e africanos. Além disso, nos últimos dois séculos,

sucessivas migrações de italianos, espanhóis, alemães, japoneses, libaneses e sírios aumentaram ainda mais a miscigenação racial da nossa população. A análise de marcadores informativos de ancestralidade de uma amostra representativa da população brasileira apresentou uma contribuição importante dos europeus (0.771%), seguido por africanos (0.143%) e ameríndios (0.085%) (LINS *et al.,* 2010; ALMEIDA *et al.,* 2016). Apesar da grande diversidade étnica das macrorregiões distintas do Brasil, a frequência de diferentes haplótipos em pacientes celíacos brasileiros é relativamente estável. Estudos utilizando testes sorológicos e biópsia intestinal mostraram que o HLA-DQ2.5 e/ou DQ8 estavam presentes em 93,1% dos pacientes celíacos da região Nordeste do Brasil, onde a miscigenação com africanos e ameríndios é alta (CASTRO-ANTUNES *et al.,* 2011; ALMEIDA *et al.,* 2016). Na região Sul, onde predomina a ascendência caucasiana, foi possível observar a frequência de 91,1% (KOTZE *et al.,* 2014; ALMEIDA *et al.,* 2016).

Com base na literatura, a prevalência é de 1,5 a 2 vezes maior entre as mulheres do que entre os homens e é elevada entre as pessoas que são consideradas de alto risco como parente de primeiro grau afetado (10 a 15%), DM1 (3 a 16%), tireoidite de Hashimoto (5%) ou outras doenças autoimunes incluindo doenças hepáticas autoimunes, síndrome de Sjögren, nefropatia por imunoglobulina A (IgA), síndrome de Down (5%), síndrome de Turner (3%) e deficiência de IgA (9%) (LENHARDT *et al.,* 2004; RUBIO-TAPIA *et al.,* 2008; FASANO *et al.,* 2012).

A epidemiologia da DC foi conceituada com eficácia através do modelo de *iceberg.* O número total de casos de DC é do tamanho do *iceberg*, que não é unicamente influenciado pela frequência dos genótipos predisponentes na população, e pelo consumo de glúten. Os casos de DC típicos são diagnosticados devido a queixas sugestivas e integram a parte visível do *iceberg* celíaco, em termos quantitativos, expressos pela incidência da doença. Em países desenvolvidos, no entanto, para cada caso diagnosticado de DC, uma média de cinco casos permanece não diagnosticada (a parte submersa do *iceberg*), geralmente devido a queixas atípicas, mínimas ou mesmo ausente (LIONETTI *et al.,* 2011; LIONETTI *et al.,* 2015). Esta representação revela que poucas pessoas são diagnosticadas corretamente e que muitas pessoas

possuem a doença, mas não detém conhecimento. Esse fato precisa ser superado, pois pacientes sem diagnósticos tendem a apresentar complicações relacionadas à qualidade de vida (ARAÚJO *et al.,* 2010). Estudos epidemiológicos mostraram que até 75% dos pacientes não são devidamente reconhecidos (WEST *et al.,* 2014; ALTOBELLI *et al.,* 2014; LAU *et al.,* 2017), assim obtendo complicações como desnutrição, osteoporose e linfoma no intestino delgado (GRAY *et al.,* 2010; LAU *et al.,* 2017).

A DC pode ser diagnosticada clinicamente em: forma clássica ou típica, forma atípica, forma silenciosa ou assintomática, forma latente, forma potencial e forma refratária. A forma típica da doença é caracterizada por sintomas clínicos comuns relacionados à absorção intestinal anormal. Geralmente ocorre entre 6 e 18 meses de idade, após desmame quando ocorre a introdução de alimentos contendo prolaminas. A histologia mostra a presença de atrofia das vilosidades e a hiperplasia da cripta (TULLY *et al.,* 2008; PARZANESE *et al.,* 2017). Entretanto, a forma atípica possui prevalência de sintomas extraintestinais podendo estar acompanhada de poucos ou da ausência dos sintomas gastrointestinais. Normalmente, formas atípicas são encontradas em crianças e idosos (PARZANESE *et al.,* 2017).

A forma silenciosa ou assintomática é caracterizada por anormalidades sorológicas e histológicas sem evidência de sintomas clínicos. Este subtipo é frequentemente observado em indivíduos com antecedentes familiares de DC, pacientes com doenças autoimunes associadas, ou seja, DM1 ou distúrbios genéticos (como síndrome de Down, Turner ou Williams) (PARZANESE *et al.,* 2017). A forma latente é representada por duas formas: na primeira forma fazem parte os pacientes com diagnóstico prévio de DC que responderam à dieta sem glúten e apresentaram histologia normal ou aumento de linfócitos intraepiteliais; na segunda forma são aqueles indivíduos com mucosa intestinal normal, sob dieta, incluindo glúten, que posteriormente irão desenvolver DC (PRESUTTI *et al.,* 2007; TORRES *et al.,* 2008; SILVA *et al.,* 2010).

Por sua vez, a forma potencial são indivíduos que não possuem diagnóstico de DC, mas tem presença de fator genético apropriado (HLA-DQ2/DQ8), sorologia positiva, com histologia normal ou suavemente anormal (PARZANESE *et al.,* 2017). E a forma refratária é definida pela presença de

sintomas mal- absortivos e atrofia das vilosidades que persistem um ano após uma dieta rigorosa sem glúten. Dois diferentes subtipos de DC refratária foram reconhecidos: "tipo 1", possui contagem normal de linfócitos intraepiteliais e "tipo 2" apresenta linfócitos intraepiteliais anormais (PARZANESE *et al.,* 2017).

2.2 Doenças autoimunes da tireoide

As DAT são consideradas desordens autoimunes frequentes e condições patológicas comuns da glândula tireoidea. As DAT possuem duas apresentações clínicas principais: doença de Graves e a tireoidite de Hashimoto, ambas possuem infiltração linfocítica do parênquima da glândula tireoideia (ANTONELLI *et al.,* 2015).

Na doença de Graves, a infiltração linfocítica proporciona à ativação de células B reativas aos receptores de tireotropina (TSH) com a produção de anticorpos, levando a manifestação do hipertireoidismo (HASHAM & TOMER, 2012). Portanto, a doença de Graves é definida como uma doença não destrutiva causada diretamente por anticorpos que se ligam e estimulam o receptor de TSH. Entretanto, a tireoidite de Hashimoto é caracterizada por uma desordem destrutiva através das células T visando à enzima tireoperoxidase, provocando ferimentos na glândula tireoidea (VAIDYA & PEARCE, 2014; ROY *et al.,* 2016). A tireoperoxidase é a principal enzima tireoidiana que catalisa tanto a iodação quanto a reação de acoplamento para a síntese do hormônio da tireoide. Oxidando íons de iodeto para átomos de iodo que serão adicionados na tireoglobulina para a produção de tiroxina (T4) ou triiodotironina (T3), hormônios tireoidianos. A tireoperoxidase é ligada à membrana, podendo ser encontrada no citoplasma e em alta concentração na superfície microvilar apical dos tireócitos (MCLACHLAN & RAPOPORT,1992; IDDAH & MACHARIA, 2013). Assim, a característica da tireoidite de Hashimoto é a presença do hipotireoidismo clínico (HASHAN & TOMER, 2012).

A prevalência das DAT é estimada em 5% (VANDERPUMP *et al.,* 1995; JACOBSON *et al.,* 1997; ANTONELLI *et al.,* 2015), porém, a prevalência de anticorpos anti-tireoidianos sem a doença clínica pode ser ainda maior (PEARCE & LEECH, 2004; ANTONELLI *et al.,* 2015). As DAT são mais

frequentes entre as mulheres do que nos homens, com uma proporção feminino: masculino variando de 5:1 a 10:1 (EFFRAIMIDIS & WIERSINGA, 2014; DONG & FU, 2014).

O diagnóstico das DAT é fundamentado por características clínicas e laboratoriais. O paciente pode apresentar eutireoidismo, hipotireoidismo ou hipertireoidismo dependendo do tipo e do estágio da doença. A DAT é identificada pela medição de anticorpos circulantes como anticorpos anti-tireoperoxidase (TPO) e anticorpos tireoglobulina (TG). Teste negativo para ambos os anticorpos exclui o diagnóstico de DAT, pois 98% dos pacientes são positivos para qualquer dos anticorpos. Os anticorpos TPO são mais específicos e sensíveis do que os anticorpos TG no diagnóstico de hipotireoidismo autoimune. O padrão ouro para o diagnóstico de tireoidite de Hashimoto é TSH elevado juntamente com anticorpos TPO (IDDAH & MACHARIA, 2013).

A etiologia das DAT é multifatorial e abrange fatores genéticos e ambientais. A etiologia é complexa, pois se deve ao desenvolvimento da autoimunidade contra os antígenos da tireoide e pela exposição a fatores ambientais. Desse modo, as DAT são doenças autoimunes específicas de órgãos prototípicos, porém os mecanismos subjacentes que provocam essas respostas autoimunes não são nitidamente conhecidos (PEARCE & LEECH, 2004; DONG & FU, 2014).

O locus do gene do MHC, situado no cromossomo 6p21, é uma região genética altamente polimórfica e codifica as glicoproteínas HLA. A região HLA possui genes de resposta imune que são relacionados a inúmeros distúrbios autoimunes, por essa questão, foi à primeira região genética a ser estudada (JACOBSON *et al.,* 2008; HASHAM & TOMER,2012). Entre os genes de susceptibilidade das DAT que foram identificados e caracterizados estão o locus do gene HLA-DR (TOMER & TERRY, 2003; HUBER *et al.,* 2008).

Zamani *et al.,* (2000), examinaram os polimorfismos do gene HLA classe II para predisposição na doença de Graves em um grupo de indivíduos da Bélgica. Observaram que os alelos DRB1*0301 e DQA1*0501 conferiram uma susceptibilidade significativa no haplótipo DRB1*0301-DQA1* 0501. O alelo DRB1*0301 foi o alelo de susceptibilidade primária para doença de

Graves, pois a susceptibilidade proporcionada por DQA1*0501 foi provavelmente pelo desequilíbrio na ligação com DRB1*0301. Os genótipos DRB1*0701/x e DQA1*0201/x e o haplótipo DRB1*0701-DQA1*0201 forneceram proteção.

Alguns estudos focaram na associação dos principais grupos de alelos HLA-DR com as DAT para entender a estrutura molecular do *pocket* de ligação ao peptídeo e sua associação com a doença (BAN *et al.,* 2004; MENCONI *et al.,* 2008; TOMER, 2010). Os linfócitos T reconhecem e respondem aos antígenos peptídicos que são apresentados pelas APCs, as quais estão ligadas aos *pockets* de ligação de HLA de classe II. Sendo assim, existe a suposição de que certos alelos HLA-DR aceitam que os peptídeos autoantígenos (tireoglobulina, tireoperoxidase e receptor de tireotropina) encaixam no *pocket* de ligação peptídica, apresentando-se de forma eficiente aos linfócitos T (FAAS & TRUCCO, 1994; TOMER, 2010).

Na DM 1, verificou-se que o resíduo de aminoácido na posição 57 da cadeia DQb desempenha um papel fundamental na susceptibilidade genética a doença (AITMAN &TODD,1995; TOMER & HUBER, 2009). Logo, foi descoberto um mecanismo parecido e importante para a etiologia das DAT. Identificou-se que o aminoácido arginina na posição 74 da cadeia HLA-DRb1 (DRb-Arg74) como aminoácido DR crítico que confere susceptibilidade a doença de Graves (BAN *et al.,* 2004; TOMER, 2010). Esta mudança estrutural única, tridimensional, no *pocket* de ligação do peptídeo ao HLA-DR, provavelmente permite que os peptídeos patogênicos se liguem à molécula HLA e seja reconhecida por células T autorreativas, conferindo susceptibilidade a doença. Por outro lado, a presença de glutamina na posição 74 desta ligação de peptídeo foi vista como conferindo proteção para doença, propondo que a posição 74 é crítica para o início da doença de Graves (SIMMONDS *et al.,* 2005; HASHAM & TOMER, 2012).

Os haplótipos HLA na tireoidite de Hashimoto ainda não estão definidos comparados com a doença de Graves. Devido à definição da doença, pois tireoidite de Hashimoto engloba um conjunto de manifestações, que vão desde a presença de autoanticorpos tireoidianos até a presença de tireoidite atrófica, caracterizada por insuficiência grave da tireoide (DAVIES & AMINO, 1993;

JACOBSON *et al.,* 2008). Algumas pesquisas observaram a associação de tireoidite de Hashimoto com HLA-DR5 (FARID *et al.,* 1981; MENCONI *et al.,* 2008) e de tireoidite de Hashimoto atrófica com DR3 (MOENS *et al*.,1978; MENCONI *et al.,* 2008). Posteriormente, estudos relataram associações de tireoidite de Hashimoto com DR4 (PETRONE *et al.,* 2001; MENCONI *et al.,* 2008).

No estudo de Menconi *et al.,*(2008), foi identificado os aminoácidos que conferiram alto risco para tireoidite de Hashimoto, assim como na doença de Graves, o aminoácido do *pocket* principal também foi DRb-Arg74. De acordo com a análise estrutural observou-se que este aminoácido resultou em uma estrutura de *pocket* única que pode influenciar na ligação e na apresentação de peptídeos patogênicos às células T (MENCONI *et al.,* 2008). Assim como foi demonstrado por Jacobson *et al.,*(2009), que identificaram peptídeos de tireoglobulina, os quais poderiam ser apresentados aos *pockets* HLA-DR contendo arginina na posição beta 74. Verificaram que a estrutura de *pocket* de ligação peptídica desempenha um papel importante na etiologia das DAT (JACOBSON *et al.,* 2009). Como mencionado, a substituição do aminoácido glutamina por arginina na posição beta 74 no *pocket* de ligação do peptídeo ao HLA-DR é de importância relevante para a etiologia da doença de Graves e tireoidite de Hashimoto.

Porém, outros genes também mostraram susceptibilidade às DAT. Como o CTLA-4 (antígeno 4 associado aos linfócitos T citotóxicos), CD40, PTPN22 (proteína tirosina fosfatase-22), CD25, genes de tireoglobulina e receptor de tireotropina (TOMER & HUBER, 2009). O CD40 é um gene que corresponde à resposta imune, desempenha papel fundamental na relação entre APCs e as células T. CD40 fornece um sinal crucial na proliferação, diferenciação e na mudança para a produção de imunoglobulina G nos linfócitos B (JACOBSON *et al.,* 2007). A regulação ascendente do CD40 por *single nucleotide polymorphism* (SNP) C/T, rs1883832, pode atuar de maneira eficaz diminuindo o limiar para a ativação de células B, levando ao início da doença autoimune. Observou-se que ativação de CD40 nos tireócitos, aumentou a secreção de citocinas (como a Interleucina-6) juntamente com a ativação de células T residentes, desencadeando uma resposta de inflamação local e autoimunidade.

Contudo, ambos os mecanismos contribuem para doença de Graves (JACOBSON *et al.,* 2005; JACOBSON *et al.,* 2007).

O CTLA-4 é um importante regulador negativo da ativação das células T (TEFT *et al.,* 2006; TOMER, 2010). Sendo definido como um gene de autoimunidade que está ligado e/ou associado a várias condições autoimunes como a doença de Graves e a tireoidite de Hashimoto (NISTICO *et al.,* 1996; BAN *et al.,* 2003; TOMER, 2010), assim como na produção de anticorpos tireoidianos (ZALETEL *et al.,* 2006). Estudos mostraram três principais variantes de CTLA-4: um microssatélite *AT-repeat* no 3'UTR do gene CTLA-4 (NISTICO et *al.,* 1996; BAN *et al*., 2003; TOMER & HUBER, 2009); um SNP A/G na posição 49 no peptídeo sinal, resultando em uma substituição de alanina/treonina (A/G49) (TOMER & HUBER, 2009; LEE *et al.,* 2015); e um SNP A/G localizado a jusante e fora da UTR 3' do gene CTLA-4 (indicado como CT60) (UEDA *et al.,* 2003; TOMER, 2010).

A tirosina fosfatase linfoide, codificada pelo gene da proteína tirosina fosfatase-22 (PTPN22), é um inibidor da ativação das células T. Um SNP na posição 1858 em PTPN22 resulta na substituição da arginina por triptofano (R620W) desta fosfatase que está associada à DAT (VELAGA *et al.,* 2004; DONG & FU,2014). E o gene CD25, codifica para a cadeia do receptor interleucina-2 (IL-2Ra), estando associado à doença de Graves. No estudo de Brand *et al.,*(2007), estudo de caso-controle, confirmaram que a região CD25 atua como um locus de susceptibilidade geral para doenças autoimunes e desempenha um papel importante para a via do receptor de IL-2 no desenvolvimento e funcionamento de células T no controle da autoimunidade (BRAND *et al.,* 2007).

A tireoglobulina é um dos principais alvos da resposta imune nas DAT, pois os fenótipos da doença são caracterizados pelo desenvolvimento de anticorpos tireoglobulina (TOMER *et al.,* 2002; HSIAO *et al.,* 2008; TOMER & HUBER, 2009). De acordo com a análise de sequenciamento detalhada deste gene foram identificadas três substituições de aminoácidos que estavam significativamente associadas com as DAT, A734S, V1027M e W1999R. O mecanismo pelo qual as variantes de aminoácidos na tireoglobulina podem predispor as DAT é alterando a apresentação dos peptídeos de tireoglobulina

pelas APCs para células T dentro das moléculas HLA de classe II. Este mecanismo levaria a uma interação entre variantes de tireoglobulina e variantes de HLA-DR predispondo as DAT (BAN *et al.,* 2003; TOMER & HUBER, 2009).

A doença de Graves é definida pela presença de anticorpos estimulantes TSHR, que ativam a síntese e a secreção elevada de hormônio tireoidiano, resultando em tireotoxicose clínica. Estudos mencionaram três SNPs no gene TSHR que estão associados com a doença como, D36H, P52T e D727E (CUDDIHY *et al.,* 1995; TOMER, 2010). Dois desses SNPs estão localizados no domínio extracelular do TSHR, são eles: um ácido aspártico para a substituição de histidina na posição 36 (D36H) e uma substituição de prolina para treonina na posição 52 (P52T). O terceiro SNP, uma substituição do ácido glutâmico para o ácido aspártico (D727E), localizado dentro do domínio intracelular do receptor (CUDDIHY *et al.,* 1995; JACOBSON & TOMER, 2007).

2.3 Doença celíaca e doenças autoimunes da tireoide

Canova *et al.,* (2016)	Risco relativo de desenvolver doença autoimune da tireoide em crianças com DC.	Estudo de coorte. Foram incluídos 1215 casos de DC e 6075 referências pareadas por sexo e ano de nascimento, nascidos na região de Friuli Venezia Giulia (Itália) entre 1989 e 2011.	O risco de hipotireoidismo foi maior em homens que em mulheres. Concluíram que, as crianças e jovens com DC estavam em maior risco de desenvolver hipotireoidismo autoimune.
Teixeira *et al.,* (2014)	Prevalência de DC em adultos com DAT que foram atendidos no serviço de endocrinologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná	Foi utilizado um questionário relacionado aos sintomas associados à DC e foram coletadas amostras de soro para pesquisa de anticorpos anti-endomísio. Pacientes positivos foram submetidos à endoscopia digestiva alta e biópsia do duodeno. Entre os anos de 2007 a 2011	Dos 254 pacientes com DAT, destes: 56,3% tinham doença de Graves e 43,7% doença de Hashimoto. Prevalência de 1,2% de DC confirmada entre os pacientes com DAT.

Ventura *et al.,* (2014)	Prevalência e as características clínicas da DC em pacientes com tireoidite autoimune através de estudo transversal realizado no Ambulatório de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Santa Catarina.	Os pacientes com tireoidite autoimune foram submetidos a testes de anticorpos anti-endomísio e anti-transglutaminase entre agosto de 2010 a julho de 2011.	Observaram que cinco (9,3%) dos 53 pacientes incluídos no estudo, apresentaram sorologia positiva para DC destes, três (5,6%) com anticorpo anti-endomísio positivo e dois (3,7%) com anti-transglutaminase positivo. Somente dois pacientes realizaram endoscopia, um com histologia normal e outro apresentou infiltrado linfocitário e atrofia vilositária
Elfstrom *et al.,* (2008)	Analisaram os dados dos registros nacionais suecos para realizar um estudo longitudinal do risco de DT em uma coorte de população geral de 14.021 indivíduos (1964-2003) com DC e uma população de referência correspondente à idade e ao sexo de 68.068 indivíduos.	O acompanhamento começou 1 ano após a entrada no estudo (igual à data do primeiro diagnóstico de DC no hospital ou data correspondente na população de referência).	DC foi positivamente associada com hipotireoidismo, tireoidite e hipertireoidismo
Spadaccino *et al.,* (2008)	Prevalência de DC em pacientes adultos do nordeste da Itália com DAT	Utilizando testes para anticorpos transglutaminase tecidual humana da classe IgA, e deficiência de IgA	Total= 276 pacientes (186 com tireoidite crônica e 90 com doença de Graves) DC estava presente em 15/276 (5,4%) dos pacientes com DAT. Dos 10 pacientes com DAT e DC: oito (2,9%) eram HLA- DQ2 e dois (0,7%) eram HLA-DQ8). A deficiência de IgA estava presente em 2/276 dos pacientes (0,72%). A DC é significativamente aumentada em pacientes com distúrbios autoimunes

			da tireoide.
Guliter *et al.,* (2007)	Prevalência de DC em pacientes turcos com tireoidite autoimune.	Foram incluídos no estudo, 136 pacientes diagnosticados com tireoidite autoimune e 119 doadores de sangue saudáveis. Realizaram teste sorológico para anticorpo IgA anti-tTG e os pacientes com anticorpos positivos foram submetidos a biópsia endoscópica da mucosa do duodeno.	Notaram que oito pacientes (5,9%) e um indivíduo controle (0,8%) foram positivos para os anticorpos.
Hadithi *et al.,* (2007)	DC em pacientes holandeses com tireoidite de Hashimoto e vice-versa.	Testes sorológicos (anticorpos antigliadinas, transglutaminase e endomisial) e tipagem HLA-DQ foram determinados em pacientes com DC. Analisaram os alelos DQA1* 05 e DQB1*02 (HLA-DQ2) e os alelos DQA1*03 e DQB1*0302 (HLA-DQ8).	Observaram que 50,9% dos 104 pacientes com tireoidite de Hashimoto são HLA DQ2 e/ou HLA DQ8 positivos
Valentino *et al.,* (2002)	Avaliaram os sinais de lesões no intestino delgado e marcadores imuno-histoquímicos de sensibilidade ao glúten em um grupo de pacientes com tireoidite de Hashimoto, sem marcadores sorológicos de DC.	Quatorze pacientes com tireoidite de Hashimoto sem evidência sorológica de DC.	Encontraram que três (21,4%) tinham heterodímeros (DQ A1*0501, B1*0201), quatro (28,6%) tinham (DRB1*04) e um (7,1%) possuía (A1*0101, B1*0501).

A partir dos estudos mencionados, é possível perceber a associação entre DC e DAT que provavelmente refletem o aumento das doenças

autoimunes em geral na DC (VENTURA *et al.,* 1999; LUDVIGSSON *et al.,* 2006; ELFSTROM *et al.,* 2008) e podem ser explicadas pela presença de características genéticas compartilhadas. Tanto o HLA-DQ2 (HLA-DQA1*05-DQB1*02) quanto o DQ8 (HLA-DQA1*03-DQB1*0302) são comuns tanto na doença da tireoide (YANAGAWA *et al.,* 1993; HADITHI *et al.,* 2007; ELFSTROM *et al.,* 2008) quanto na DC (KAGNOFF, 2005; ELFSTROM *et al.,* 2008). Outra explicação seria pelo gene CTLA4 que desempenha um papel fundamental na regulação das respostas inflamatórias mediadas por linfócitos T, e possuí inúmeros SNPs conhecidos por alterarem a função (UEDA *et al.,* 2003; HUNT *et al.,* 2005). Ueda *et al.,*(2003), através do estudo abrangente que mapeou as variantes sugeridas pelo grupo de genes na região 3' de CTLA4 que influência as respostas autoimunes em DM1, doença de Graves e hipotireoidismo autoimune (UEDA *et al.,* 2003; HUNT *et al.,* 2005). Portanto, a presença dos fatores de risco genéticos pode explicar a associação positiva entre DC e as doenças da tireoide (ELFSTROM *et al.,* 2008).

3. Justificativa

Poucos indivíduos são diagnosticados corretamente e muitas pessoas possuem a doença, mas não possuem conhecimento. Essa falta de conhecimento acarreta no atraso do diagnóstico e no tratamento tardio resultando no aumento de morbidades. Portanto, o diagnóstico precoce é extremamente importante no caso de portadores de DC, pois diminui os riscos de complicações e contribuem na melhoria da qualidade de vida. Diante dessa necessidade de rastreamento, o ESPGHAN propõe o rastreio dos alelos HLA-DQ em pacientes com risco de DC.

Ademais, outros genes não-HLA também estão relacionados com a predisposição para DC em indivíduos portadores de DAT. Visto que os alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 estão presentes em 30% das pessoas sadias, os alelos não-HLA podem ajudar também na identificação de possível diagnóstico de DC em portadores de DAT.

Sendo assim, o teste de genotipagem HLA-DQ proporcionará que o indivíduo procure assistência médica para realizar o diagnóstico prévio e iniciar o tratamento rapidamente, assim prevenindo complicações futuras.

Por outro lado, existe uma carência de estudos voltados para a prevalência da DC no estado do Rio Grande do Sul, desconhecendo características e perfil genético dessa população, além dos grupos de riscos como portadores de DAT relacionados com a DC. Além do que, o presente estudo irá contribuir para divulgação e busca do diagnóstico da DC.

4. Objetivos

4.1 Objetivo geral

Determinar a frequência dos alelos HLA relacionados à doença celíaca em portadores de doenças autoimunes da tireoide.

4.2 Objetivos específicos

Caracterizar o perfil sociodemográfico e de saúde dos indivíduos que compõem a amostra;

Verificar a prevalência dos alelos HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201), HLA-DQ8 (DRB1*04 -DQA1*03:01- DQB1*03:02) nos portadores de doenças autoimunes da tireoide e no grupo controle;

Avaliar a prevalência dos sintomas característicos da DC nos portadores de doenças autoimunes da tireoide e no grupo controle associando com a presença dos alelos HLA;

Correlacionar com a presença de outras doenças autoimunes como (síndrome de Down, síndrome de Turner, síndrome de Williams, síndrome de Sjögren, deficiência de Imunoglobulina A (IgA) seletiva, diabetes mellitus tipo 1, entre outras) com a predisposição dos alelos HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e HLA-DQ8 (DRB1*04-DQA1*03:01 - DQB1*03:02) nos indivíduos portadores de doenças autoimunes da tireoide;

Orientar os indivíduos com os alelos HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e/ou HLA-DQ8 positivos (DRB1*04 - DQA1*0301 - DQB1*0302) a procurarem assistência médica para a investigação de possível diagnóstico de DC e oferecer orientações nutricionais aos indivíduos que apresentarem diagnóstico da doença.

5. Hipóteses

Espera-se que os alelos HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e HLA-DQ8 (DQA1*0301-DQB1*0302-DRB1*04) sejam frequentes nos portadores de doenças autoimunes da tireoide;

A presença dos alelos HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e HLA-DQ8 (DQA1*0301-DQB1*0302-DRB1*04) nos portadores de doenças autoimunes da tireoide está associada com os sintomas gastrointestinais ou extra intestinais da DC.

6. Materiais e métodos

6.1 População alvo e aspectos éticos

Trata-se de um estudo caso-controle, que será realizado no Ambulatório de Nutrição e no Ambulatório de Endocrinologia da Universidade Federal de Pelotas.

Os participantes serão selecionados de forma não aleatória, por critério de conveniência. Foi realizado o cálculo da amostra, com nível de confiança de 95% através do programa estatístico G*Power, sendo obtida uma amostra de conveniência de 191 indivíduos que será acrescida de 15% para possíveis perdas. A amostra será distribuída em dois grupos: pacientes com DAT (grupo caso) e pacientes saudáveis (grupo controle). O projeto será submetido à Gerência de Ensino e Pesquisa do Hospital Escola da Universidade Federal de Pelotas e posteriormente para a Superintendência que concordando com o estudo irão assinar a carta de Anuência para autorização do projeto. Para inclusão no estudo, os indivíduos de ambos os grupos devem ser pacientes do Ambulatório de Nutrição ou do Ambulatório de Endocrinologia da Universidade Federal de Pelotas e possuir qualquer idade.

Serão inclusos no grupo caso, os indivíduos portadores de DAT que apresentarem diagnóstico médico ou uso de medicamentos para doenças da tireoide descritos no prontuário ambulatorial. Como critério de exclusão é ser portador de doença celíaca ou ser parente de primeiro grau de pessoas celíacas.

Serão inclusos no grupo controle, os pacientes considerados saudáveis. Os critérios de exclusão para este grupo são: ser portador de doença celíaca ou ser parente de primeiro grau de indivíduos celíacos, DAT e/ou outras doenças autoimunes. O grupo controle e o grupo com DAT serão pareados por sexo e idade. Será feito o rastreamento de alelos HLA e não- HLA em ambos os grupos.

Será esclarecido aos participantes e/ou responsáveis pelos participantes menores de dezoito anos, os objetivos do estudo, parâmetros éticos sobre a confidencialidade, com o intuito de manter a privacidade dos sujeitos. Será

informado que existem riscos no estudo referentes à coleta de saliva e a aplicação do questionário, pois o entrevistado poderá sentir-se constrangido quanto às perguntas do questionário e no momento da coleta de saliva. A fim de minimizar os riscos, será realizada a coleta de saliva em sala separada dos demais participantes e em relação ao questionário será aplicado por meio de uma conversa onde o participante possa se sentir à vontade sempre buscando sanar as dúvidas proporcionando um ambiente acolhedor. Os benefícios de participar na pesquisa é no sentido de colaborar no embasamento para utilização de testes genéticos para predisponentes à DC e para os casos de confirmação da presença dos alelos relacionados com a DC, será orientada à investigação médica de possível diagnóstico de DC, ou seja, a consulta com o médico será recomendada e não faz parte do estudo, ficando a critério dos indivíduos, pais ou responsáveis pela criança/adolescente investigar a possibilidade da doença. A participação dos portadores de DAT (grupo caso) e não portadores de DAT e/ou outras doenças autoimunes (grupo controle) será voluntária e poderá ser interrompida a qualquer momento. Os participantes que concordarem em participar após as explicações, assinará um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE; APÊNDICE A e B).

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), de acordo com as normas estabelecidas pela Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 e visando atender ao Código de Ética dos Nutricionistas que dispõe que as atividades sejam executadas com cautela a prevenir a ocorrência de riscos ou prejuízos aos indivíduos. A pesquisa e coleta de dados só serão realizadas após aprovação do projeto pelo CEP e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos portadores de DAT e pelos indivíduos do grupo controle. Segundo a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, será garantido o respeito pela dignidade humana e pela proteção devida aos participantes das pesquisas cientificas envolvendo seres humanos e em utilizar o material de dados obtidos na pesquisa exclusivamente para a finalidade prevista ou conforme o consentimento do participante. Os dados serão mantidos por cinco anos em pasta protegida, sem identificação de qualquer participante, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

6.2 Rastreamento de alelos

6.2.1 Coleta de material

Todos os indivíduos que aceitarem participar do estudo e assinarem o TCLE serão realizadas as coletas das células da mucosa bucal. Para tal, o indivíduo deverá enxaguar a boca com água tratada e esfregar o *swab* com haste de plástico várias vezes entre as bochechas. Após o *swab* deverá ser fechado e devidamente identificado com o número do indivíduo, ficando armazenado diretamente no gelo, mantido em caixa térmica. O procedimento de coleta de células da mucosa bucal será executado em duplicata para que em caso circunstancial possa ser repetida as análises.

Após realizar a coleta, o pesquisador irá aplicar um questionário composto por questões sociodemográficas, sintomas gastrointestinais e extraintestinais relacionados com a DC nos participantes do estudo (Apêndice C).

6.2.2 Logística

No primeiro momento, será realizada a coleta de dados dos prontuários dos pacientes que frequentam os Ambulatórios e, posteriormente, será realizado o convite por contato telefônico, explicando os objetivos do estudo.

A assinatura do TCLE, coleta do material e aplicação do questionário acontecerão enquanto os pacientes aguardam para realizar suas consultas previamente agendadas no Ambulatório de Nutrição ou no Ambulatório de Endocrinologia da Universidade Federal de Pelotas.

6.2.3 Extração do gDNA

O swab contendo as células da mucosa bucal do participante será encubado em um tubo de 2 mL, com 600 µL de solução de lise e 8 µL de proteinase K por 40 minutos a 55 ºC. Após centrifugação a 16000 rotações por um minuto, é retirado o algodão. Após nova incubação a 95 ºC por 10 minutos, resfria-se a amostra e adicionam-se 200 µL de solução de precipitação de proteína. Após vortex durante 20 segundos e centrifugações a 16000 rotações

por três minutos. O sobrenadante é salvo em um novo tubo de 1,5 mL. A precipitação dos ácidos nucléicos é feita pela adição de 600 µL de isopropanol, seguida de centrifugação a 16000 rotações por 15 minutos. O pellet formado é lavado sequencialmente duas vezes pela adição de etanol 70% e centrifugação. Após secar a temperatura ambiente por 10 minutos, o DNA é diluído com 30 µL de solução de hidratação. Desta amostra, de 1 a 5 µL são suficientes para a realização da análise dos polimorfismos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando primers específicos para o reconhecimento de alelos da Doença Celíaca. O método de extração de gDNA a ser utilizado é a adaptação do método descrito por MILLER, DYKES e POLESKY (1988).

6.2.4 Amplificação do DNA (PCR)

Para comprovar a presença de DNA nas amostras extraídas foram realizadas PCRs com genes controles. Para isso, utilizou-se os genes da ―enzima conversora de angiotensina‖ (ECA) baseando-se no método utilizado por Yoshida *et al.,* (1995). Destaca-se que foram feitas algumas adaptações a partir dos protocolos originais.

Os alelos amplificados neste estudo serão DQA1*0501, DQB1*0201 (HLA-DQ2) e DRB1*04 (HLA-DQ8). A reação de amplificação será realizada em volume final de 25 µl contendo 0.2mmol/L de dNTPs, 2.0mmol/L de MgCl2, 0.4µmol/L de cada iniciador, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 100ng de DNA genômico. Os primers que serão utilizados estão descritos na tabela 1. As amostras serão inicialmente desnaturadas a 95 ºC por 5 minutos e, em seguida submetidas a 35 ciclos de desnaturação a 95 ºC por 45 segundos, anelamento a 56 ºC por 1 minuto e extensão a 72 ºC por 30 segundos seguidos de extensão final de 72 ºC por 5 minutos.

Para confirmação do tamanho do fragmento amplificado, 10µl do produto da PCR serão aplicados em gel de agarose a 3% e submetidos à eletroforese horizontal em tampão de corrida TBE (50 ml solução TBE 10X e 450 ml água destilada). Como marcador de peso molecular, serão utilizados 100pb DNA Ladder® (Biolabs). A visualização do DNA será realizada com Sybr Safe (Invitrogen®) em transiluminador com luz ultravioleta. O método de

amplificação de DNA a ser utilizado será baseado no método descrito por CAMBIEN *et al.*, (1992).

Tabela 1: Características de primers utilizados para PCR.

Primer	Sequência	Comprimento dos produtos da PCR
DQA1*0501	5′-AGCAGTTCTACGTGGACCTGGGG-3′ 5′-GGTAGAGTTGGAGCGTTTAATCAGA-3′	144 bp
DQB1*0201	5'-CGCGTGCGTCTTGTGAGCAGAAG-3' 5'-GGCGGCAGGCAGCCCCAGCA-3'	110 bp
DRB1*04	5’-GGTTAAACATGAGTGTCATTTCTTAAAC-3′ 5’-GTTGTGTCTGCAGTAGGTGTC-3′	217 bp
ECAf	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	190 bp
ECAr	5 '-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	490 bp

bp = pares de base; DQA1*0501 e DQB1*0201 para HLA-DQ2; DRB1*04 para HLA-DQ8; ECA f e ECA r = controles de amplificação. (Adaptado de YOSHIDA *et al.,* 1995).

6. 3 Retorno dos resultados e orientações nutricionais

Diante da análise dos resultados e da confirmação dos alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 relacionados à DC, serão agendados horários e dias para realização de uma conversa individual, para explicar a importância do teste genético positivo para os alelos e a necessidade de pesquisar o diagnóstico de DC com gastroenterologistas por meio da realização da biópsia intestinal, sendo considerada padrão ouro para o diagnóstico. Deverão ser esclarecidas nesta conversa, a importância do diagnóstico, as questões nutricionais e o prognóstico da doença quando a mesma não for tratada corretamente. O responsável pela pesquisa estará à disposição para posteriores esclarecimentos sobre DC, sempre que necessário, assim como apoio e orientação dietética para os indivíduos que apresentarem confirmação do diagnóstico de DC.

Serão disponibilizados materiais de orientação sobre a dieta isenta de glúten e contaminação cruzada aos participantes da pesquisa.

6.4 Análise estatística

A análise de dados será realizada por meio do software STATA® e Microsoft Office Excel® 2010. As frequências dos alelos serão comparadas pelo teste de Qui-quadrado, confirmando com teste de Fisher. O nível de significância estabelecido foi de $p<0.05$.

7. Cronograma de atividades

Tabela 2: Cronograma das atividades do projeto.

	2018								2019				
Atividades/Períodos	**M**	**J**	**J**	**A**	**S**	**O**	**N**	**D**	**J**	**F**	**M**	**A**	**M**
Revisão da literatura													
Qualificação do Projeto													
Envio ao Comitê de Ética													
Coleta de amostras e questionário													
Extração do DNA													
Amplificação do DNA													
Identificação dos alelos													
Análise estatística													
Elaboração do artigo e dissertação													

8. Orçamento do projeto

Tabela 3: Orçamento para a realização do projeto.

Materiais	**Custo**
Primers, material PCR e agarose	R$ 2.400,00
Reagentes	R$ 200,00
Swabs	R$ 260,00
Xerox	R$ 50,00
TOTAL	**R$ 2.910,00**

A aquisição dos materiais necessários para realização da pesquisa ocorrerá por meio de recursos financeiros fornecidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Referências

ABADIE, V.; SOLLID, L.M.; BARREIRO, L.B.; JABRI, B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. **Annual Review Immunology**, v.29, p.493-525, 2011.

ACERINI, C.L.; *et al.* Coeliac disease in children and adolescents with IDDM: clinical characteristics and response to gluten-free diet. **Diabetic Medicine**, v.15, p.38–44, 1998.

AGARDH, D.; *et al.* Prediction of silent celiac disease at diagnosis of childhood type 1 diabetes by tissue transglutaminase autoantibodies and HLA. **Pediatric Diabetes**, v. 2, n.2, p.58–65, 2001.

AKOBENG, A.K.; THOMAS, A.G. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.27, p. 1044 –1052, 2008.

AITMAN, T.J.; TODD, J.A. Molecular genetics of diabetes mellitus. **Baillie` re's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.9, n.3, p.631-656, 1995.

ALMEIDA, LM.; *et al.* Presence of DQ2.2 Associated with DQ2.5 Increases the Risk for Celiac Disease. **Autoimmune Diseases**, 2016.

ALTOBELLI, E.; PADUANO, R.; PETROCELI, R.; DI ORIO, F. Burden of celiac disease in Europe: a review of its childhood and adulthood prevalence and incidence as of September 2014. **Annali Di Igiene**, v.26, p. 485–498, 2014.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes—2012. **Diabetes Care**, v.35, (Suppl. 1), S11–S63, 2012.

American Gastroenterological Association (AGA) Institute Technical Review on the Diagnosis and Management of Celiac Disease. **Gastroenterology**, v.131, p.1981–2002, 2006.

ANTONELLI, A.; *et al.* Autoimmune thyroid disorders. **Autoimmunity Reviews**, v.14, p.174–180, 2015.

ARAÚJO, H.M.C.; ARAÚJO, W.M.C.; BOTELHO, R.B.A.; ZANDONADI, R.P. Doença celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida. **Revista de Nutrição**, v. 23, n.3, p. 467-474, 2010.

ATKINSON, M.A.; EISENBARTH, G.S.; MICHELS, A.W. Type 1 diabetes. **Lancet**, v. 383, n. 9911, p. 69-82, 2014.

BAN, Y.; *et al.* Arginine at position 74 of the HLA-DR b1 chain is associated with Graves' disease. **Genes and Immunity**, v.5, p. 203–208, 2004.

BAN, Y.; *et al*. Analysis of the CTLA-4, CD28 and inducible co-stimulator (ICOS) genes in autoimmune thyroid disease. **Genes and Immunity**, v.4, p.586–593, 2003.

BAN, Y.; *et al*. Amino acid substitutions in the thyroglobulin gene are associated with susceptibility to human and murine autoimmune thyroid disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, p.15119–24, 2003.

BASTOS, M.D.; *et al.* Search for DQ2.5 and DQ8 alleles using a lower cost technique in patients with type 1 diabetes and celiac disease in a population of southern Brazil. **Archives of Endocronology and Metabolism**, 2017.

BHADADA, S.K.; *et al.* Comparative study of clinical features of patients with celiac disease e those with concurrent celiac disease e type 1 diabetes mellitus. **Indian Journal of Medical Research**, v. 145, n.3, p.334-338, 2017.

BRAND, O.J.; *et al.* Association of the interleukin-2 receptor alpha (IL-2Ralpha)/CD25 gene region with Graves disease using a multilocus test and tag SNPs. **Clinical Endocrinology**, v. 66, p. 508-512, 2007.

BRASIL. **Conselho Nacional de Saúde**. Resolução nº 466 de 2012 (acesso 19 nov.18). Disponível: http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf

BRATANIC, N.; *et al*. An influence of HLA-A, B, DR, DQ, and MICA on the occurrence of Celiac disease in patients with type 1 diabetes. **Tissue Antigens**, v.76, p.208-215, 2010.

CAMBIEN, F.; *et al*. Deletion polymorphism in the gene of angiotensin converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. **Nature Publishing Group**, v.359, p. 641-644, 1992.

CHANG, C.L.; JONES, M.K.; KINGHAM, J.G.C. Celiac disease and autoimmune thyroid disease. **Clinical Medicine & Research**, v.5, n.3, p.184-192, 2007.

CANOVA, C.; *et al.* Celiac Disease and Risk of Autoimmune Disorders: A Population-Based Matched Birth Cohort Study. **The Journal of Pediatrics**, v.174, p.146-152, 2016.

CASTILLO, N.E.; THEETHIRA, T.G.; LEFFLER, D.A. The present and the future in the diagnosis and management of celiac disease. **Gastroenterology Report**, v.3, n.1, p. 3–11, 2015.

CATASSI, C.; *et al*. Detection of celiac disease in primary care: a multicenter case- finding study in North America. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 102, p.1454-1460, 2007.

CATASSI, C.; GATTI, S.; FASANO, A. The new epidemiology of celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.59, 2014.

CASSOL, C.A.; *et al.* Perfil clínico dos membros da associação dos celíacos do Brasil – regional de Santa Catarina (ACELBRA-SC). **Arquivos de Gastroenteologia**, v.44, n.3, 2007.

CASTRO-ANTUNES, MM.; *et al*. Frequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 in celiac patients and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil. **Clinics**, v. 66, n. 2, p. 227–231, 2011.

CONCANNON, P.; RICH, S.S; NEPOM, G.T. Genetics of type 1A diabetes. **New England Journal of Medicine**, v.360, p. 1646–1654, 2009.

CORRAO, G.; *et al*. Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study. **Lancet.** v.358, p. 356 –361, 2001.

CUDDIHY, R.M.; DUTTON, C.M.; BAHN, R.S. A polymorphism in the extracellular domain of the thyrotropin receptor is highly associated with autoimmune thyroid disease in females. **Thyroid**, v.5, p.89–95, 1995.

DAVIES, T.F.; AMINO, N. A new classification for human autoimmune thyroid disease. **Thyroid**, v.3, n.4, p.331-333, 1993.

DE RE, V.; MAGRIS, R.; CANNIZZARO, R. New insights into the pathogenesis of celiac disease. **Frontiers in Medicine (Lausanne)**, v.4, n. 137, 2017.

DELVES, P.J.; ROITT, I.M. The immune system. First of two parts. **New England of Journal of Medicine**, v.343, n.1, p.37-49, 2000.

DIAMOND PROJECT GROUP. Incidence and trends of childhood type 1 diabetes worldwide 1990–1999. **Diabetic Medicine**, v.23, n.8, p.857–66, 2006.

DIELI-CRIMI, R.; CENIT, M.C.; NUNEZ, C. The genetics of celiac disease: a comprehensive review of clinical implications**. Journal of Autoimmunity**, v.64, p. 26–41, 2015.

DUBÉ, C.; *et al*. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. **Gastroenterology**, v.128(4 Suppl 1): S57–67, 2005.

EFFRAIMIDIS, G.; WIERSINGA, W.M. Mechanisms in endocrinology: autoimmune thyroid disease: old and new players. **European Journal of Endocrinology**, v. 170, p. 241- 252, 2014.

EISENBARTH, G.S. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. **New England Journal of Medicine**, v.314, p.1360-1368, 1986.

ELFSTROM, P.; *et al.* Risk of thyroid disease in individuals with celiac disease. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.93, p.3915–3921, 2008.

FAAS, S.; TRUCCO, M. The genes influencing the susceptibility to 100M in humans. **Journal of Endocrinological Investigation**, v.17, p. 477-495, 1994.

FARAGE, P.; *et al*. Content Validation and Semantic Evaluation of a Check-List Elaborated for the Prevention of Gluten Cross-Contamination in Food Services. **Nutrients**, v.36, n.1, 2017.

FARID, N.R.; SAMPSON, L.; MOENS, H.; BARNARD, J.M. The association of goitrous autoimmune thyroiditis with HLA-DR5. **Tissue Antigens**, v.17, n.3, p.265–268, 1981.

FASANO, A.; CATASSI, C. Celiac disease. **The New England Journal of Medicine**, v.367, p. 2419-2426, 2012.

FERNÁNDEZ- CAVADA-POLLO, M.J.; *et al*. Celiac disease and HLA-DQ genotype: diagnosis of different genetic risk profiles related to the age in Badajoz, southwestern Spain**. Revista Espanola de Enfermedades Digestivas**, v.105, n.8, p.469-76, 2013.

FREIRE, R; *et al*. Human gut derived-organoids provide model to study gluten response and effects of microbiota derived molecules in celiac disease. **Nature,** v.9, n.7029, 2019.

GADD, S.; KAMATH, K.R.; SILINK, M.; SKERRIT J.H. Co-existence of coeliac disease and insulin-dependent diabetes mellitus in children: Screening sera using an ELISA test for gliadin antibody. **Australian and New Zealand Journal of Medicine**, v.22, p. 256-60, 1992.

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

GOH, C.; BANERJEE, K. Prevalence of coelic disease in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus in a clinic based population. **Postgraduate Medical Journal**, v.83, p. 132- 136, 2007.

GORODEZKY, C.; *et al*. HLA and autoimmune diseases: Type 1 diabetes (T1D) as an example. **Autoimmunity Reviews,** v. 5, p.187–194, 2006.

GRAY, A.M.; PAPANICOLAS, I.N. Impact of symptoms on quality of life before and after diagnosis of coeliac disease: results from a UK population survey. **BMC Health Services Research**, v.10, 2010.

GREEN, P.H.R.; CELLIER, C. Celiac disease. **The New England Journal of Medicine**, v.357, p. 1731–1743, 2007.

GUARISO, G.; *et al*. Clinical, subclinical and potential autoimmune diseases in an Italian population of children with coeliac disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.26, n.10, p.1409–1417, 2007.

GULITER, S.; *et al*. Prevalence of coelic disease in patients with autoimmune thyroiditis in a Turkish population. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.10, 2007.

HADITHI, M.; *et al*. Coeliac disease in Dutch patients with Hashimoto's thyroiditis and vice versa. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.11, p. 1715-1722, 2007.

HASHAN, A.; TOMER, Y. Genetic and epigenetic mechanisms in Thyroid autoimmunity. **Immunology Research**, v. 54, n. (1-3), 2012.

HOWELL, M.D.; *et al*. An HLA-D region restriction length polymorphism associated with celiac disease. **Journal of Experimental Medicine**, v.169, p.345–350, 1986.

HUBER, A.; *et al.* Joint Genetic Susceptibility to Type 1 Diabetes and Autoimmune Thyroiditis: from Epidemiology to Mechanisms. **Endocrine Reviews**, v. 29, n.6, p.697–725, 2008.

HUE, S.; *et al*. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. **Immunity**, v.21, p.367-77, 2004.

HUNT, K.A.; *et al.* Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease, **Nature**, v.423, 2003.

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

HUSBY, S.; *et al*. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.54, p.136-160, 2012.

HSIAO, J.Y.; *et al*. Exon 33 T/T genotype of the thyroglobulin gene is a susceptibility gene for Graves' disease in Taiwanese and exon 12 C/C genotype protects against it. **Clinical and Experimental Medicine**, v.8, n.1, p.17–21, 2008.

IDDAH, M.A.; MACHARIA, B.N. Autoimmune Thyroid Disorders. **Endocrinology**, v. 2013, 2013.

JACOBSON, D.L.; GANGE, S.J.; ROSE, N.R.; GRAHAM, N.M. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.84, p.223–243, 1997.

JACOBSON, E.M.; CONCEPCION, E.; OASHI, T.; TOMER, Y. A Graves' disease-associated Kozak sequence single-nucleotide polymorphism enhances the efficiency of CD40 gene translation: a case for translational pathophysiology. **Endocrinology**, v. 146, p. 2684–2691, 2005.

JACOBSON, E.M.; TOMER, Y. The CD40, CTLA-4, thyroglobulin, TSH receptor, and PTPN22 gene quintet and its contribution to thyroid autoimmunity: back to the future. **Journal of Autoimmunity**, v.28, p.85–98, 2007.

JACOBSON, E.M.; *et al.* A CD40 Kozak sequence polymorphism and susceptibility to antibody-mediated autoimmune conditions: the role of CD40 tissue-specific expression. **Genes and Immunity**, v.8, p.205–214, 2007.

JACOBSON, E.M.; HUBER, A.; TOMER, Y. The HLA gene complex in thyroid autoimmunity: From epidemiology to etiology. **Journal of Autoimmunity**, v.30, p. 58-62, 2008.

JACOBSON, E.M.; *et al.* Employing a Recombinant HLA-DR3 Expression System to Dissect Major Histocompatibility Complex II-Thyroglobulin Peptide Dynamism. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 49, p. 34231–34243, 2009.

KAGNOFF, M.F. Overview and pathogenesis of celiac disease. **Gastroenterology**, v. 128, S10 –S18, 2005.

KAMBOJ, A.K.; OXENTENKO, A.S. Clinical and Histologic Mimickers of Celiac Disease. **Clinical and Translational Gastroenterology**, v. 8, n.8, 2017.

KARELL, K.; *et al*. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1∗05-DQB1∗02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. **Human Immunology**, v.64, p.469–77, 2003.

KARVONEN, M.; *et al*. Incidence of childhood type 1 diabetes worldwide. Diabetes mondiale (DiaMond) project group, **Diabetes care**, v.23, p.1516-1526, 2000.

KAUR, A.; SHIMONI, O.; WALLACH, M. Celiac disease: from etiological factores to elvolving diagnostic approaches. **Journal of Gastroenterology**, 2017.

KEMPPAINEN, T.; *et al.* Osteoporosis in adult patients with celiac disease. **Bone**, v, 24, n.3, p.249–255, 1999.

KOTZE, LMS.; NISIHARA, R.; UTIYAMA, SRR.; KOTZE, LR. Absence of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 does not exclude celiac disease in Brazilian patients.

Revista Espanola de Enfermedades Digestivas, v. 106, n. 8, p. 561–562, 2014.

KOLETZKO, S.; *et al*. Prevalence of coeliac disease in diabetic children and adolescents. A multicentre study**. European Journal of Pediatrics**, v.148, p.113–7, 1988.

LAU, M.S.Y.; SANDERS, D.S. Optimizing the diagnosis of celiac disease. **Currente Opinion in Gastroenterology**, v.33, n.3, p.173-180, 2017.

LAUREANO, AM. Análise da Presença de Glúten em Alimentos Rotulados como Livres de Glúten Através de Ensaio Imunoenzimático e de Fitas Imunocromatográficas. **Dissertação do Mestrado**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

LEE, H.J.; *et al.* Immunogenetics of autoimmune thyroid diseases: A comprehensive review. **Journal of Autoimmunity**, v.64, p. 82-90, 2015.

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

LENHARDT, A.; *et al.* Role of human-tissue transglutaminase IgG and anti-gliadin IgG antibodies in the diagnosis of coeliac disease in patients with selective immunoglobulin A deficiency. **Digestive an Liver Disease**, v.36, n.11, p.730-734, 2004.

LINS, TC.; *et al*. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. **American Journal of Human Biology**, v. 22, n. 2, p. 187–192, 2010.

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

LIONETTI, E.; *et al*. Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, 2014.

LIONETTI, E.; GATTI, S.; PULVIRENTI, A.; CATASSI, C. Celiac disease from a global perspective. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology,** v.29, p.365-379, 2015.

LIU, J.; *et al*. Genome wide linkage analysis of celiac disease in Finnish families. **American Journal of Human Genetics**, v.70, p.51-59, 2002.

LIU, E.; *et al*. Risk of pediatric celiac disease according to HLA haplotype and country. **New England Journal of Medicine**, v.371, p.42-49, 2014.

LOUKA, A.S.; SOLLID, L.M. HLA in coeliac disease: unravelling the complex genetics of a complex disorder. **Tissue Antigens,** v. 61, p. 105–117, 2003.

LUDVIGSSON, J.F. Mortality and malignancy in celiac disease. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 22, p. 705 –722. 2012.

LUDVIGSSON, J.F.; LUDVIGSSON, J.; EKBOM, A.; MONTGOMERY, S.M. Celiac disease and risk of subsequent type 1 diabetes: a general population cohort study of children and adolescents. **Diabetes Care**, v.29, p.2483–2488, 2006.

LUNDIN, K.E.A.; *et al*. Gliadin-specific, HLADQ (alpha1*0501, beta1*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients**. Journal Experimental of Medicine**, v.78, p.187–196, 1993.

LUNDIN, K.E.; SOLLID, L.M. Advances in coeliac disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v.30, p. 154–162, 2014.

MEARIN, M.L.; *et al*. HLA-DR phenotypes in Spanish coeliac children: their contribution to the understanding of the genetics of the disease. **Gut**., v.24, p.532- 537, 1983..

MELO, S.B.C.; *et al*. Prevalence and demographic characteristics of celiac disease among blood donos in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. **Digestive Diseases and Sciences**, v.51, p.1020-1025, 2006.

MENCONI, F.; *et al*. Molecular amino acid signatures in the MHC class II peptide-binding pocket predispose to autoimmune thyroiditis in humans and in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n.37, 2008.

MENTION, J.J.; *et al*. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. **Gastroenterology**, v.125, p.730-45, 2003.

MEGIORNI,F.; *et al.* HLA-DQ and risk gradiente for celiac disease. **Human Immunology.**, v.70, n.1, p.55-9, 2009.

MEGIORNI, F.; PIZUTTI, A. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. **Journal of Biomedical Science**., v.19, n.88, 2012.

MERESSE, B.; *et al*. Coordinated induction by IL15 of a TCR independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. **Immunity,** v.21, p.357-66, 2004.

MEYER, D.; *et al*. Osteoporosis in a north American adult population with celiac disease. **The American Journal of Gastroenterolorogy**, v.96, n.1, p. 112-119, 2001.

MILLS, J.R.; MURRAY, J.A. Contemporary celiac disease diagnosis: is a biopsy avoidable? **Current Opinion in Gastroenterology**, v.32, p. 80-85, 2016.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Research, **Oxford**, v.16, p.1215, 1988.

MOENS, H.; *et al*. Hashimoto's thyroiditis is associated with HLA-DRw3. **New England Journal of Medicine**, v.299, p.133–134,1978.

MOHAMED, B.M.; *et al*. Increased protein expression of matrix metalloproteinases -1, -3, and -9 and TIMP-1 in patients with gluten-sensitive enteropathy. **Digestive Diseases and Sciences**, v.51, p.1862-8, 2006.

MOHAMMDIBAKHSH, R.; *et al*. Celiac disease in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Electronic Physician**, v.9, 2017.

MOLBERG, O.; *et al*. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. **Nature Medicine**, v. 4, 1998.

MORELLINI, M.; *et al.* A study of HLA class II antigens in an Italian pediatric population with coeliac disease. **Disease Markers**., v.6, p.23-28, 1988.

MUNIZ, J.G.; SDEPANIAN, V.L.; NETO, U.F. Prevalence of genetic susceptibility for celiac disease in blood donors in São Paulo, Brazil. **Archives of Gastroenterology,** v.53, n.4, 2016.

MCLACHLAN, S.M.; RAPOPORT, B.S. The molecular biology of thyroid peroxidase: cloning, expression and role as autoantigen in autoimmune thyroid disease. **Endocrine Reviews**, v. 13, n. 2, p. 192–206, 1992.

NEEDELL, J.C.; ZIPRIS, D. Targeting Innate Immunity for Type 1 Diabetes Prevention. **Current Diabetes Report**, v.17, n.113, 2017.

NIKULINA, M.; *et al*. Wheat gluten causes dendritic cell maturation and chemokine secretion. **The Journal of Immunology**, v.173, p. 1925-1933, 2004.

NIH Consensus Developmente Conference on celiac disease. **NIH Consens State Sci Statements**, v, 21, n. 1, p.1-23, 2004.

NILSEN, E.M.; *et al*. Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. **Gastroenterology,** v.115, p.551-63, 1998.

NISTICO, L.; *et al*. The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes. Belgian Diabetes Registry. **Human Molecular Genetics**, v. 5, p.1075–1080, 1996.

NOT, T.; *et al*. Celiac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. **Scandinavan Journal of Gastroenterology**, v.33, p.494-498, 1998.

OLIVEIRA, R.P.; *et al*. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v.19, p.43-49, 2007.

OLIVEIRA, OMV.; *et al*. Evaluation of the presence of gluten in beans served at self-service restaurants: A problem for celiac disease carriers. **Journal of Culinary Science & Technology**, v.12, p. 22–33, 2014.

PARZANESE, I.; *et al*. Celiac disease: From pathophysiology to treatment. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 8, n.2, p. 27-38, 2017.

PEARCE, S.H.; LEECH, N.J. Toward precise forecasting of autoimmune endocrinopathy. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, p. 544-547, 2004.

PELKOWSKI, T.D.; VIERA, A.J. Celiac Disease: Diagnosis and Management. **American Family Physician**, v.89, n.2, 2014.

PETRONE, A.; *et al.* Association of DRB1*04-DQB1*0301 haplotype and lack of association of two polymorphic sites at CTLA-4 gene with Hashimoto's thyroiditis in an Italian population. **Thyroid**, v. 11, p.171–175, 2001.

PRESUTTI, R.J.; CANGEMI, J.R.; CASSIDY, H.D.; HILL, D.A. Celiac disease. **American Family Physician.**, v.76, n.12, p.1795-802, 2007.

POCIOT, F.; *et al*. Genetics of type 1 diabetes: what's next? **Diabetes.** v.59, p.1561–1571, 2010.

POCIOT, F.; MCDERMOTT, M.F. Genetics of type 1 diabetes mellitus. **Genes & Immunity**, v. 3, p.235–249, 2002.

QING, L.; *et al*. Risk of beta-cell autoimmunity presence for progression to type 1 diabetes: A systematic review and meta- analysis. **Journal of Autoimmunity**, 2017.

REILLY, N.R.; FASANO, A.; GREEN, P.H. Presentation of celiac disease. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v.22, n.4, p.613-621, 2012.

ROSTOM, A.; MURRAY, J.A.; KAGNOFF, M.F. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. **Gastroenterology**, v.131, n.6, p.1981-2002.

ROUJON, P.; GUIDICELLI, G.; MOREAU, J.F.; TAUPIN, J.L. Immunogénétique de la maladie coeliaque. Pathologie Biologie. v.61. p. 5–11. 2013.

ROY, A.; *et al.* Prevalence of Celiac Disease in Patients with Autoimmune Thyroid Disease: A Meta-Analysis. **Thyroid**, v. 26, n. 7, 2016.

RUBIO-TAPIA, A.; *et al.* Predictors of family risk for celiac disease: a population-based study**. Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.6, p.983-987, 2008.

RUBIO-TAPIA, A.; *et al*. ACG Clinical Guidelines: Diagnosis and Management of Celiac Disease. **The American of Gastroenterology**, v. 108, p.656-676, 2013.

SAPONE, A.; *et al*. Spectrum of gluten-related disorders: Consensus on new nomenclature and classification. **BMC Medicine**, v.10, p.1–12, 2012.

SALARDI, S.; *et al*. Prevalence of celiac disease in children with type 1 diabetes mellitus increased in the mid-1990 s: An 18-year longitudinal study based on anti-endomysial antibodies. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.46, p. 612-614, 2008.

SERENA, G.; *et al.* The role of gluten in celiac disease and type 1 Diabetes. **Nutrients**, v.7, p.7143-7162, 2015.

SESTERHEIM, P.; SAITOVITCH, D.; STAUB, H.L. Diabetes Mellitus tipo 1: multifatores que conferem suscetibilidade à patogenia auto-imune. **Scientia Medica**, v. 17, n. 4, p. 212-217, 2007.

SILVA, T.S.G.; FURLANETTO, T.W. Diagnóstico de doença celíaca em adultos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.56, n.1, 2010.

SIMMONDS, M.J.; *et al*. Regression mapping of association between the human leukocyte antigen region and Graves disease. **American Journal Human Genetics**, v.76, n.1, p.157–63, 2005.

SOLLID, L.M.; *et al.* Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer**. Journal of Experimental Medicine**, v.169, p.345-350, 1989.

SOLLID, L.M. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. **Nature Reviews Immunology**, v.2, p.647-55, 2002.

SOLLID, L.M.; LIE, B.A. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.3, p.843 – 851, 2005.

SCHUPPAN, D.; ZIMMER, K.P. The diagnosis and treatment of celiac disease. **Deutsches Ärzteblatt International**, v.110, n.49, p. 835–46, 2013.

SCHWEMBERGER, S.; OSTERBURG, A.; BABCOCK, G.F.; TOMER, Y. Employing a recombinant HLA-DR3 expression system to dissect MHC II-

thyroglobulin peptide dynamism: a genetic, biochemical, and reverse immunological perspective. **Journal of Biological Chemistry**, v.284, 2009.

SHAN, L.; *et al*. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, v. 297, 2002.

SHIINA, T.; HOSOMICHI, K.; INOKO, H.; KULSKI, J.K. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. **Journal of Human Genetics**, v.54, p.15–39, 2009.

SKOVBJERG, H.; KOCH, C.; ANTHONSEN, D.; SJOSTROM, H. Deamidation and cross-linking of gliadin peptides by transglutaminases and the relation to celiac disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1690, p.220–230, 2004.

SMIGOC SCHWEIGER, D.; *et al*. High-risk genotypes HLA- DR3- DQ2/DR3-DQ2 and DR3-DQ2 /DR4-DQ8 in co- occurence of type 1 diabetes and celiac disease. **Autoimmunity**, v.49, n. 4, p.240-247, 2016.

SPADACCINO, A.C.; *et al*. Celiac disease in North Italian patients with autoimune thyroid diseases. **Autoimmunity**, v.41, n.1, 2008.

SPURKLAND, A.; *et al.* HLA-DR and -DQ genotypes of celiac disease patients serologically typed to be non-DR3 or non-DR5/7. **Human Immunology**, v.35, p.188-192,1992.

TAPLIN, CE.; BARKER, JM. Autoantibodies in type 1 diabetes. **Autoimmunity**, v.41, p. 11–18, 2008.

TEFT, W.A.; KIRCHHOF, M.G.; MADRENAS, J. A molecular perspective of CTLA-4 function. **Annual Review of Immunology**, v. 24, p.65–97, 2006.

TEIXEIRA, L.; *et al*. Screening of celiac disease in patients with autoimmune thyroid disease from Southern Brazil. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabolismo**, v. 58, n.6, 2014.

TOMER, Y.; TERRY, F.D. Searching for the Autoimmune Thyroid Disease Susceptibility Genes: From Gene Mapping to Gene Function. **Endocrine Reviews**, v. 24, n.5, p.694 –717, 2003.

TOMER, Y. Genetic Susceptibility to Autoimmune Thyroid Disease: Past, Present, and Future. **Thyroid**, v.20, n.7, 2010.

TOMER, Y.; HUBER, A. The etiology of autoimmune thyroid disease: A story of genes and environment. **Journal of Autoimmunity**, v. 32, p.231–239, 2009.

TOMER, Y.; *et al*. Thyroglobulin is a thyroid specific gene for the familial autoimmune thyroid diseases. **Journal Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n.1, p.404–7, 2002.

TOMER, Y.; *et al*. Common and unique susceptibility loci in Graves and Hashimoto diseases: results of whole-genome screening in a data set of 102 multiplex families. **American Journal of Human Genetics**, v.73, p.736–747, 2003.

TORRES, M.I.; LOPEZ CASADO, M.A.; RIOS, A. New aspects in celiac disease. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.8, p.1156-61, 2008.

TULLY, M.A. Pediatric celiac disease. **Gastroenterology Nursing**, v.31, n.2, p.132-140, 2008.

TUOMILEHTO, J. The emerging global epidemic of type 1 diabetes. **Current Diabetes Report**, v.13, n.6, p.795–804, 2013.

TRONCONE, R.; DISCEPOLO, V. Celiac disease and autoimmunity. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.59, Suppl 1: S9-S11, 2014.

TSOUKA, A.; MAHMUD, F.H.; MARCON, M.A. Celiac disease alone and associated with type 1 diabetes mellitus. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.61, n.3, p.297-302, 2015.

UEDA, H.; *et al*. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. **Nature**, v.423, p. 506–511, 2003.

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes. **Lancet**, v.352, p. 854-65, 1998.

VADER, W.; *et al*. The HLA -DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten- specific T cell responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v.100, n.21, p.12390-5, 2003.

VAIDYA, B.; PEARCE, S.H. Diagnosis and management of thyrotoxicosis. **British Medical Journal**, v.349, 2014.

VALENTINO, R.; *et al*. Markers of potential coeliac disease in patients with Hashimoto's thyroiditis. **European Journal of Endocrinology**, v.146, p. 479–483, 2002.

VAN BEEK, E.M.; *et al.* A multiplex assa to rapdly exclude HLA-DQ2.5 and HLA DQ8 expression in patients at risk for celiac disease. **Clinical Chemistry and Laborotory Medicine.**, v.51, n.6, p.1191-1198, 2013.

VAN HEEL, DA.; HUNT, K.; GRECO, L.; WIJMENGA, C. Genetics in coeliac disease. **Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology**, v.19, p.323-339, 2005.

VANDERPUMP, M.P.; *et al.* The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham survey. **Clinical Endocrinology**, v.43, p.55–68, 1995.

VAZQUEZ, H.; *et al*. Risk of fractures in celiac disease patients: a cross-sectional, case-control study. **The American Journal of Gastroenterolorogy**, v.95, p.183-189, 2000.

VELAGA, M.R.; *et al*. The codon 620 tryptophan allele of the lymphoid tyrosine phosphatase (LYP) gene is a major determinant of Graves' disease. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.89, n.11, p. 5862- 5865, 2004.

VENTURA, A.; MAGAZZU, G.; GRECO, L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. **Gastroenterology**, v.117, p.297–303, 1999.

VENTURA, A.; *et al*. Prevalence and clinical features of celiac disease in patients with autoimmune thyroiditis: cross-sectional study. **São Paulo Medical Journal**, v.132, n.6, 2014.

VILLANACCI, V.; *et al*. Coeliac disease: the histology report. **Digestive and Liver Disease**, v. 43, Suppl 4, p.385-S395, 2011.

WEST, J.; *et al*. Malignancy and mortality in people with coeliac disease: population based cohort study. **British Medical Journal,** v.329, p. 716 –719, 2004.

WEST, J.; *et al.* Incidence and prevalence of celiac disease and dermatitis herpetiformis in the UK over two decades: population-based study. **The American of Journal Gastroenterology**, v. 109, p. 757–768, 2014.

WOLTERS, V.M.; WIJMENGA, C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. **The American Journal of Gastroenterology**, v.103, p.190-196, 2008.

XIE, Z.; CHANG, C.; ZHOU, C. Molecular mechanisms in autoimmune type 1 diabetes: a critical review. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v.47, p. 174–192, 2014.

YANAGAWA, T.; *et al.* Human histocompatibility leukocyte antigen DQA1*0501 allele associated with genetic susceptibility to Graves' disease in a Caucasian population. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.76, p.1569 – 1574, 1993.

YOSHIDA, H.; *et al*. Role of the deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in the progression and therapeutic responsiveness of IgA nephropathy. **Journal of Clinical Investigation**, v. 96, p. 2162 – 2169, 1995.

ZHAO, Z.; *et al*. Celiac Disease Autoimmunity in Patients with Autoimmune Diabetes and Thyroid Disease among Chinese Population. **PLoS one,** v.11, n.7, p. 1-8, 2016.

ZALETEL, K.; KRHIN, B.; GABERSCEK, S.; HOJKER, S. Thyroid autoantibody production is influenced by exon 1 and promoter CTLA-4 polymorphisms in patients with Hashimoto's thyroiditis. **International of Journal Immunogenetics**, v. 33, p.87–91, 2006.

ZAMANI, M.; *et al.* Primary Role of the HLA Class II DRB1*0301 Allele in Graves Disease. **American Journal of Medical Genetics**, v.95, p.432–437, 2000.

ZHOU, Z.; *et al*. Type 1 diabetes associated HLA-DQ2 and DQ8 molecules are relatively resistant to HLA-DM mediated release of invariant chain- derived CLIP peptides. **European Journal of Immunology**, v. 46, n. 4, p. 834-45, 2016.

Relatório de campo:

O objetivo do projeto seria um estudo de caso-controle, mas não foi possível a coleta de saliva e aplicação de questionários dos controles devido ao tempo em que o projeto ficou em avaliação pelo responsável pelos projetos desenvolvidos no Hospital Escola (90 dias), consequentemente, acabou atrasando o envio do projeto para o Comitê de Ética e a coleta do material genético e aplicação do questionário para posterior análise molecular em laboratório. Ademais, alguns imprevistos também ocorreram durante a realização das análises em laboratório, tais como: indisponibilidade e problemas com equipamentos, contaminação de *primers* e aquisição de novos *primers*. Diante disso, se optou por realizar primeiramente as coletas, entrevistas e as análises em laboratório dos casos e posteriormente, dos controles. Entretanto, não houve tempo hábil para a realização das coletas de saliva e entrevistas dos controles. Do mesmo modo, não foi possível realizar as análises laboratoriais para os alelos não-HLA.

ARTIGO

Artigo redigido nas normas da revista *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,* disponível em:

https://academic.oup.com/jcem/pages/Author_Guidelines

Frequency of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 associated with celiac disease in patients with autoimmune thyroid disease

Clédia Silveira Flores da Silva[1] I Raíssa Zanatta[1] I Natalia Rodrigues Cardozo[1] I Carlos Castilhos Barros[1] I Fabiana Torma Botelho[1*]I

[1] Nutrigenomic laboratory of the Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul – Brazil.

*__Correspondence:__ R Gomes Carneiro- Campus Porto-RS-Brazil CEP96010-900

E-mail address: fabibotelho@hotmail.com

Short title: HLA alleles in autoimmune thyroid diseases

Resumo:

Introdução: A doença celíaca (DC) é uma enteropatia autoimune causada por ingestão de glúten em indivíduos geneticamente predispostos portadores de haplótipos *Human leukocyte antigen* (HLA), principalmente HLA-DQ2 ou HLA-DQ8. A incidência de DC em pacientes com doenças autoimunes da tireoide (DAT) pode chegar até dez vezes mais comparado com população em geral. Acredita-se que essa população tem esse risco maior para o desenvolvimento da doença devido à tipagem compartilhada de HLA. **Objetivo:** determinar a frequência do HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e HLA-DQ8 (DRB1*04) e verificar a associação da presença desses alelos com sintomas e outras doenças relacionados à doença celíaca em portadores de doenças autoimunes da tireoide. **Métodos:** Aplicou-se um questionário relacionado aos sintomas e doenças associados a DC. O DNA genômico foi extraído por meio da coleta das células da mucosa bucal. Os alelos (DQA1*0501 e DQB1*0201) e (DRB1*04) foram identificados por meio da reação em cadeia da polimerase. **Resultados:** Participaram deste estudo 110 portadores de DAT. Observou-se que 66,4% dos indivíduos carregavam pelo menos um dos alelos estudados e que 58,2% dos indivíduos eram positivos para pelo menos um dos alelos HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e destes 18,2% foram positivos para ambos alelos do HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201). Com relação ao HLA-DQ8 (DRB1*04), 21,82% da população estudada eram positivos para esse alelo e 3,6% eram positivos tanto para o HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) quanto para o HLA-DQ8 (DRB1*04). Foi encontrada associação significativa da presença do alelo DRB1*04 (HLA-DQ8) com os sintomas gastrointestinais (diarreia, dor abdominal e distensão abdominal) ($p=0,02$), assim como também ocorreu associação desse alelo com o sintoma de distensão abdominal isolado ($p<0,01$). Ademais, houve associação significativa do alelo DRB1*04 (HLA-DQ8) com diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1) ($p=0,02$). **Conclusão:** O perfil genético mais fortemente associado à DC, tais como HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e HLA-DQ8 (DRB1*04) estavam presentes em torno de 20% da população estudada.

Palavras-chaves: doença celíaca, HLA, hipotireoidismo.

Abstract:

Introduction: Celiac disease (CD) is an autoimmune enteropathy caused by gluten ingestion in genetically predisposed individuals with haplotypes Human leukocyte antigen (HLA), mainly HLA-DQ2 or HLA-DQ8. The incidence of CD in patients with autoimmune thyroid disease (DAT) can be up to ten times higher compared to the general population. This population is believed to have this higher risk for disease development due to shared typing of HLA. **Objective:** To determine the frequency of HLA-DQ2 (DQA1*0501 and DQB1*0201) and HLA-DQ8 (DRB1*04) and to verify the association of the presence of these alleles with symptoms and other celiac disease-related diseases in patients with autoimmune thyroid disease. **Methods:** A questionnaire related to the symptoms and diseases associated with CD was applied. Genomic DNA was extracted by collecting oral mucosa cells. The alleles (DQA1*0501 and DQB1*0201) and (DRB1*04) were identified by polymerase chain reaction. **Results:** A total of 110 patients with DAT participated in this study. 66.4% of the individuals carried at least one of the studied alleles and 58.2% of the individuals were positive for at least one of the HLA-DQ2 alleles (DQA1*0501 and DQB1*0201) and 18.2 % were positive for both HLA-DQ2 alleles (DQA1*0501 and DQB1*0201). Regarding HLA-DQ8 (DRB1*04), 21.82% of the population studied were positive for this allele and 3.6% were positive for both HLA-DQ2 (DQA1*0501 and DQB1*0201) and HLA-DQ8 (DRB1*04). Significant association was found between the presence of the DRB1*04 allele (HLA-DQ8) and gastrointestinal symptoms (diarrhea, abdominal pain, and abdominal distension) ($p = 0.02$), as well as the association of this allele with the symptom of abdominal distension isolated ($p < 0.01$). Moreover, there was a significant association of the DRB1*04 allele (HLA-DQ8) with type 1 diabetes mellitus (DM1) ($p = 0.02$). **Conclusion:** The genetic profile most strongly associated with CD, such as HLA-DQ2 (DQA1*0501 and DQB1*0201) and HLA-DQ8 (DRB1*04) were present in about 20% of the studied population.

Keywords: celiac disease, HLA, hypothyroidism.

Introdução

A doença celíaca (DC) é caracterizada por uma enteropatia autoimune desencadeada por ingestão de glúten em indivíduos geneticamente predispostos portadores de haplótipos HLA (*Human leukocyte antigen*), principalmente HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 (1). A DC tem-se tornado cada vez mais frequente nos indivíduos em geral, está presente em cerca de 1% da população global, sua prevalência em populações europeias varia de 1% a 2%. No Brasil a estimativa é de que existam cerca de 300 mil brasileiros diagnosticados com a doença, tendo maior incidência na região Sudeste. A patologia também é predominantemente encontrada em mulheres sendo 1:2 na população (2,3).

O glúten está presente em cereais como o trigo, o centeio, a cevada e seus derivados, sua ingestão pode provocar lesões na mucosa do intestino delgado, diminuindo a área de absorção intestinal e interferindo na absorção de micronutrientes como: vitaminas lipossolúveis, ferro, vitamina B12 e ácido fólico (4). Os indivíduos portadores de DC podem apresentar sintomas gastrointestinais como perda de peso, retardo de crescimento, osteoporose, anemia, má absorção de nutrientes, constipação crônica e dor abdominal (5,6). Além dos sintomas gastrointestinais, a DC também pode causar sintomas extraintestinais como artralgia/artrite, alopecia, fadiga, dor de cabeça, feridas na boca, dores musculares, depressão, erupções cutâneas, neuropatia, baixa estatura, puberdade tardia e infertilidade (7).

Portanto, o diagnóstico da DC é considerado difícil, pois a doença pode ser confundida com outras enteropatias e também devido à multiplicidade dos sintomas gastrointestinais e extraintestinais, podendo postergar o diagnóstico (8). O padrão-ouro para diagnosticar a DC é a biópsia intestinal revelada pela endoscopia (9,10). Através desta avaliação histológica é possível verificar os diferentes sinais como: atrofia das vilosidades, hiperplasia de criptas, diminuição da altura dos enterócitos e a presença de infiltrados inflamatórios na mucosa do intestino delgado (9).

A etiologia da DC é composta por fatores ambientais e genéticos, em relação aos fatores genéticos, o HLA confere 40% da variância genética (11,12). Grande parte dos pacientes carregam heterodímeros DQ2 (90%)

codificadas pelos alelos DQA1*05/DQB1*02 e uma minoria (5%) carrega DQ8 codificado por alelos DQA1*03/DQB1*0302 e (5%) pelo menos um dos dois alelos DQ2 (geralmente o DQB1*0201) (13,14). Tendo em vista o valor preditivo negativo, a tipagem de HLA tem sido usada como uma ferramenta de rastreamento para população de alto risco, como portadores de diabetes *mellitus* tipo 1 (DM1), síndrome de Down, síndrome de Turner e doenças autoimunes da tireoide (DAT) (15). Esses indivíduos possuem maior prevalência da DC, como observado no estudo prospectivo no qual a prevalência foi de 1% a 19% em pacientes com DM1, de 2% a 5% em DAT e 3% a 7% na cirrose biliar primária (16,17).

A incidência de DC em pacientes com DAT pode chegar até dez vezes mais comparado com população em geral (18,19). Acredita-se que essas populações com desordens autoimunes possuam esse risco maior para o desenvolvimento da doença devido à tipagem compartilhada de HLA (20). Portanto, a investigação da presença dos fatores de risco genético para DC pode auxiliar portadores de DAT em um possível diagnóstico de DC e, consequentemente, após adesão ao tratamento com dieta sem glúten melhorar sua qualidade vida e reduzir a dosagem da medicação (21). Além disso, o não tratamento da DC pode causar danos aos indivíduos, tais como adenocarcinoma de intestino delgado, câncer de esôfago, linfomas de células B e linfomas intestinais de células T (22).

Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo determinar a frequência do HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e HLA-DQ8 (DRB1*04) e verificar a associação da presença desses alelos com sintomas e outras doenças relacionados à DC em portadores de doenças autoimunes da tireoide.

Materiais e métodos

População alvo e aspectos éticos

Trata-se de um estudo transversal analítico, que foi realizado no Ambulatório de Nutrição e no Ambulatório de Endocrinologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os participantes foram selecionados de forma não aleatória, por critério de conveniência. Foi realizado o cálculo da amostra, com nível de confiança de 95% através do programa estatístico G*Power, sendo obtida uma amostra de conveniência de 110 indivíduos. Para inclusão no estudo, os indivíduos deveriam ser pacientes do Ambulatório de Nutrição ou do Ambulatório de Endocrinologia da UFPel, possuir qualquer idade e serem portadores de alguma DAT com diagnóstico médico e/ou uso de medicamentos para o tratamento das DAT descritos no prontuário ambulatorial.

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), de acordo com as normas estabelecidas pela Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 e visando atender ao Código de Ética dos Nutricionistas, sendo aprovado pela plataforma Brasil sob o número CAAE 02227718300005316. A pesquisa e coleta de dados foram executadas após aprovação do projeto pelo CEP e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos portadores de DAT.

Coleta do material genético e aplicação do questionário

Foram coletados dados dos prontuários dos indivíduos que frequentavam os ambulatórios escolhidos para o estudo e, durante um período de três meses, foi feita a abordagem convidando os pacientes para participarem do estudo e assim, se obteve 110 pacientes. Posteriormente, foram realizadas as coletas das células da mucosa bucal em todos os indivíduos que aceitaram participar do estudo e assinaram o TCLE. Para tal, o indivíduo deveria enxaguar a boca com água potável e esfregar o *swab* várias vezes entre as bochechas. Em seguida, o *swab* foi guardado em sua embalagem estéril e devidamente identificado com o número do indivíduo, ficando armazenado diretamente no gelo, mantido em caixa térmica para o transporte até o laboratório, onde foi armazenado em *freezer* até o momento da realização das análises. O procedimento de coleta de células da mucosa bucal

foi executado em duplicata para que em caso circunstancial pudessem ser repetidas as análises. Após a extração do material genético foi aplicado um questionário adaptado do questionário de Cassol *et al.* (23) composto por questões sociodemográficas e sobre sintomas gastrointestinais, extraintestinais e doenças relacionadas com a DC aos participantes do estudo.

Extração do DNA genômico e amplificação do DNA

Foi utilizado o método de extração de DNA genômico adaptado do método descrito por Miller *et al*. (24). Os alelos amplificados neste estudo foram DQA1*0501/DQB1*0201 (HLA-DQ2) e DRB1*04 (HLA-DQ8). O método de amplificação de DNA utilizado foi baseado no método descrito por Cambien *et al.* (25). Os *primers* que foram utilizados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Características de *primers* utilizados para PCR.

Primer	Sequência	Comprimento dos produtos da PCR
DQA1*0501	5′-AGCAGTTCTACGTGGACCTGGGG-3′ 5′-GGTAGAGTTGGAGCGTTTAATCAGA-3′	144 bp
DQB1*0201	5'-CGCGTGCGTCTTGTGAGCAGAAG-3' 5'-GGCGGCAGGCAGCCCCAGCA-3'	110 bp
DRB1*04	5’-GGTTAAACATGAGTGTCATTTCTTAAAC3′ 5’-GTTGTGTCTGCAGTAGGTGTC-3′	217 bp
ECAf	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3'	190 bp
ECAr	5 '-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	490 bp

bp = pares de base; DQA1*0501 e DQB1*0201 para HLA-DQ2; DRB1*04 para HLA-DQ8; hECAf e hECAr = controles de amplificação. [Adaptado de Yoshida *et al.* (26)].

Para confirmação do tamanho do fragmento amplificado, 10µl do produto da reação em cadeia da polimerase (PCR) foram aplicados em gel de agarose a 3% e submetidos à eletroforese horizontal em tampão de corrida TBE. Como marcador de peso molecular, foram utilizados 100 pares de base (pb) DNA Ladder® (Biolabs).

A visualização do DNA foi realizada com Sybr Safe (Invitrogen®) em transiluminador com luz ultravioleta. Para a primeira reação (DQA1*0501 e DQB1*0201), eram esperados dois produtos um de 144 e outro de 110 bp, na segunda reação (DRB1*04), esperava-se que um único produto de 217 bp fosse observado.

Análise estatística

As frequências das respostas nos questionários e dos alelos encontrados foram realizadas utilizando *Microsoft Office Excel*® 2010 e a análise de dados foi realizada por meio do software STATA 14.0, utilizando o teste de Qui-quadrado com teste exato de Fisher para analisar as prevalências dos alelos (DQA1*0501 e DQB1*0201 e DRB1*04) em relação aos sintomas e doenças. Para a comparação entre os pacientes que tinham sintomas gastrointestinais com a presença ou não dos alelos que codificam o HLA-DQ2 e HLA-DQ8, utilizou-se o teste de Qui-quadrado no programa Graph Pad 6.0. Todos os resultados das análises foram considerados significativos quando p foi <0.05.

Resultados

Caracterização da amostra

Participaram deste estudo 110 pacientes com média de idade de 46 ± 22,30 anos, a maioria entre 41 e 65 anos (42,73%). Houve predominância do sexo feminino (75,4%), etnia caucasiana (84,6%) e hipotireoidismo (95,4%). Com relação à escolaridade, a maior incidência foi do ensino fundamental incompleto com cerca de 47,3% da população do estudo (Tabela 2).

Tabela 2. Características sociodemográficas dos portadores de doenças autoimunes da tireoide atendidos nos Ambulatórios de Endocrinologia e Nutrição da Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, 2019. (n=110)

Variáveis	**n**	**%**
Sexo		
Feminino	83	75,4
Masculino	27	24,6
Etnia		
Não-caucasiana	17	15,4
Caucasiana	93	84,6
Escolaridade		
Analfabeto	11	10,0
Fundamental incompleto	52	47,3
Fundamental completo	11	10,0
Ensino médio incompleto	9	8.2
Ensino médio completo	19	17,3
Ensino superior incompleto	6	5,4
Ensino superior completo	2	1,8

Os sintomas gastrointestinais relacionados à DC mais prevalentes nesses indivíduos com DAT foram: distensão abdominal (40%), dor abdominal (15,5%) e diarreia (9,1%). Quanto aos sintomas extraintestinais, os mais relatados foram lesões de pele (9,1%), emagrecimento (8,2%) e anemia (7,3%) (Tabela 3).

Quanto a outras doenças relacionadas com a DC, a frequência descrita foi osteoporose (7,3%), DM1 (6,4%), intolerância à lactose (3,6%) e artrite reumatoide (3,6%) (Tabela 3).

Tabela 3. Características clínicas dos portadores de doenças autoimunes da tireoide atendidos nos Ambulatórios de Endocrinologia e Nutrição da Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, 2019. (n=110)

Variáveis	**n**	**%**
Sintomas		
Distensão abdominal	44	40
Dor abdominal	17	15,5
Diarreia	10	9,1
Lesões de pele	10	9,1
Emagrecimento	9	8,2
Anemia	8	7,3
Doenças autoimunes da tireoide		
Hipotireoidismo	105	95,4
Hipertireoidismo	5	4,6
Desordens autoimunes		
Osteoporose	8	7,3
Diabetes *mellitus* 1	7	6,4
Intolerância à lactose	4	3,6
Artrite reumatoide	4	3,6
Síndrome de Down	2	1,8
Síndrome de Turner	1	0,9

Distribuição genotípica

Em relação à distribuição dos três alelos de risco relacionados ao HLA que foram estudados, observou-se que 66,4% dos indivíduos da amostra carregavam pelo menos um desses alelos. Com relação ao HLA-DQ2, foi encontrado que 58,2% dos indivíduos eram positivos para pelo menos um dos alelos HLA-DQ2 (DQA1*0501 ou DQB1*0201). Destes, 25,5% positivos somente para HLA-DQ2 (DQA1*0501), 18,2% foram positivos para ambos alelos do HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e 14,5% positivos somente para HLA- DQ2 (DQB1*0201) (Tabela 4).

Com relação ao HLA-DQ8 (DRB1*04), 21,82% da população estudada eram positivos para esse alelo (Tabela 4). Já quanto à distribuição genotípica, identificou-se que 3,6% eram positivas tanto para os dois alelos do HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) quanto para o HLA-DQ8 (DRB1*04) (Tabela 4).

Tabela 4. Perfil genético dos pacientes portadores de distúrbios autoimunes da tireoide atendidos nos Ambulatórios de Endocrinologia e Nutrição da Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, 2019. (n=110)

Variáveis	n	%
DQ2 (DQA1*0501) positivo	28	25,5
DQ2 (DQA1*0501/DQB1*0201) positivos	20	18,2
DQ2 (DQB1*0201) positivo	16	14,5
DQ2(DQA1*0501 /DQB1*0201) negativos	46	41,8
DQ8 (DRB1*04) positivos	24	21,8
DQ8 (DRB1*04) negativos	86	78,2
DQ2(DQA1*0501/DQB1*0201) + DQ8 (DRB1*04) positivos	04	3,6

Associação do HLA-DQ8 (DRB1*04) com sintomas e desordens autoimunes

Ao relacionar a presença do HLA-DQ8 (DRB1*04) com os sintomas gastrointestinais (distensão abdominal, dor abdominal e diarreia), observou-se uma associação significativa (p=0,02), mostrando que as pessoas que possuíam esse alelo tinham pelo menos um ou mais dos sintomas gastrointestinais que foram relatados. Ao analisar cada sintoma individualmente

com a presença ou não do alelo DRB1*04, houve associação significativa da presença do alelo DRB1*04 com distensão abdominal ($p<0,01$), mostrando que os indivíduos que possuíam esse alelo apresentavam com maior frequência o sintoma de distensão abdominal do que outros alelos estudados (Tabela 5).

Tabela 5. Relação do perfil genético com a presença de sintomas associados à Doença celíaca, em portadores de doenças autoimunes da tireoide.

Perfil genético	Frequência total n (%)	Sintomas gastrointestinais n (%)	Distensão abdominal n (%)	Dor abdominal n (%)	Diarreia n (%)	Sintomas Extraintestinais n (%)	Lesões de Pele n (%)	Emagrecimento n (%)	Anemia n (%)
DQ2 +	64 (58,2)	31 (28,2)	27 (24,5)	07 (6,4)	07 (6,4)	16 (14,5)	05 (4,5)	06 (5,5)	06 (5,45)
DQ2 -	46 (41,8)	20 (18,2)	17 (15,5)	10 (9,1)	03 (2,7)	10 (9,1)	05 (4,5)	03 (2,7)	02 (1,8)
valor p		0,60	0,58	0,12	0,42	0,69	0,58	0,59	0,31
DQ8+	24 (21,8)	06 (5,5)	04 (3,6)	03 (2,7)	01 (0,9)	04 (3,6)	01 (0,9)	02 (1,8)	01 (0,9)
DQ8-	86 (78,2)	45 (40,9)	40 (36,4)	14 (12,7)	09 (8,2)	22 (20)	09 (8,2)	07 (6,4)	07 (6,4)
valor p		**0,02**	**<0,01**	0,65	0,34	0,36	0,34	0,97	0,50

HLA-DQ2= DQA1*0501 e DQB1*0201 HLA-DQ8=DRB1*04

Houve também associação significativa com a presença do DRB1*04 com DM1 (p=0,02), indicando associação desse alelo com outra doença autoimune (Tabela 6).

Não foi encontrada associação significativa entre os alelos estudados e os portadores de DAT, assim como não houve associações significativas do HLA-DQ2 com sintomas gastrointestinais e outras doenças relacionadas à DC (Tabela 6).

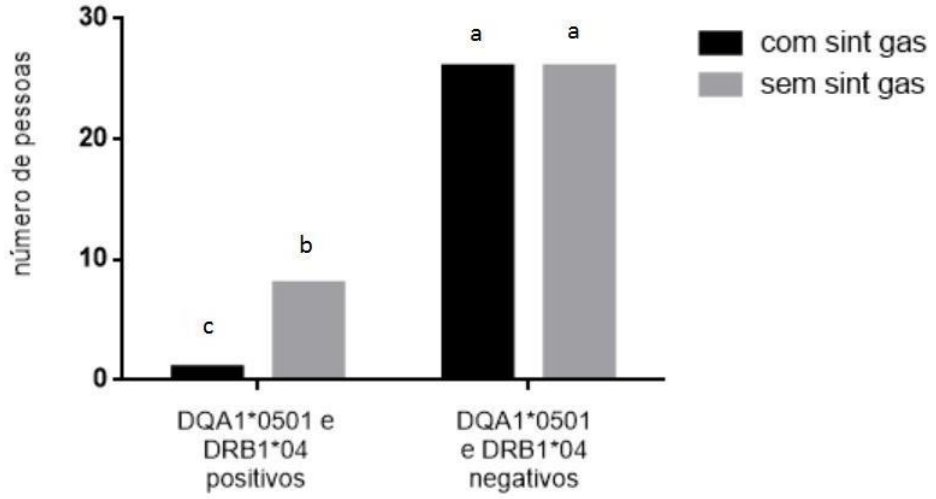
Tabela 6. Relação do perfil genético com a presença de doenças associadas à Doença celíaca, em portadores de doenças autoimunes da tireoide.

Perfil genético	Frequência total n (%)	Hipotireoidismo n (%)	Hipertireoidismo n (%)	Desordens autoimunes n (%)	Osteoporose n (%)	Diabetes mellitus tipo 1 n (%)	Intolerância á lactose n (%)	Artrite reumatoide n (%)	Síndrome de Down n (%)	Síndrome de Turner n (%)
DQ2 +	64 (58,2)	62 (56,4)	02 (1,8)	09 (8,2)	04 (3,6)	05 (4,5)	03 (2,7)	02 (1,8)	01 (0,9)	01 (0,9)
DQ2 -	46 (41,8)	43 (39,1)	02 (1,8)	05 (4,5)	04 (3,6)	02 (1,8)	01 (0,9)	02 (1,8)	01 (0,9)	0 (0,0)
valor p		0,39	0,73	0,62	0,63	0,46	0,49	0,74	0,81	0,39
DQ8+	24 (21,8)	23 (20,9)	01 (0,9)	04 (3,6)	0 (0,0)	04 (3,6)	01 (0,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
DQ8-	86 (78,2)	82 (74,5)	03 (2,7)	10 (9,1)	08 (7,3)	20 (18,2)	03 (2,7)	04 (3,6)	02 (1,8)	01 (0,9)
valor p		0,92	0,87	0,51	0,12	**0,02**	0,87	0,28	0,45	0,60

HLA-DQ2= DQA1*0501 e DQB1*0201 HLA-DQ8=DRB1*04

Quando analisado especificamente os pacientes positivos para os sintomas gastrointestinais com a presença ou não dos alelos que codificam HLA-DQ2 e DQ8, observou-se que os pacientes que tinham sintomas gastrointestinais (distensão abdominal, dor abdominal e diarreia) apresentavam associação significativa (p=0,04) com a presença concomitante dos alelos DQA1*0501 (HLA-DQ2) e DRB1*04 (HLA-DQ8) (p=0,04) (Figura 1).

Figura 1. Relação dos sintomas gastrointestinais com a presença dos alelos DQA1*0501 (HLA-DQ2) e DRB1*04 (HLA-DQ8) em portadores de doenças autoimunes da tireoide.



Discussão

A prevalência do HLA-DQ2/HLA-DQ8 na população em geral é em torno de 25-35%, apesar da importância desses haplótipos, somente a presença deles é insuficiente para o aparecimento da DC (27,28). Entretanto, aproximadamente 90-95% dos pacientes celíacos são positivos para HLA-DQ2, enquanto os demais são positivos para HLA-DQ8 (29).

Nesta pesquisa, observou-se que 66,4% dos indivíduos carregavam pelo menos um desses alelos, portanto, a frequência desses alelos em portadores de DAT é bem maior do que o esperado para a população em geral (25-35%) e se aproxima muito mais da frequência desses alelos para a população celíaca que chega a ser em torno de 90-95%. Enquanto que 58,2% dos indivíduos portadores de DAT eram positivos para pelo menos um dos alelos que compõem o HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e 21,82% eram positivos para o HLA-DQ8 (DRB1*04). Em estudo realizado por Spadaccino *et al.* (30), em que foram avaliados 276 italianos com DAT, verificou-se que 2,9% dos pacientes foram positivos para HLA-DQ2 (DQA1*05;DQB1*02) e 0,7% positivos para HLA-DQ8 (DQA1*03;DQB1*0302), valores bem menores do que os encontrados no presente estudo. Em outro estudo de Hadithi *et al.* (31), que objetivou identificar a DC em holandeses com tireoidite de Hashimoto, foi observado que 50,9% dos 104 pacientes com tireoidite de Hashimoto eram HLA-DQ2 (DQA1*05;DQB1*02) e/ou HLA-DQ8 (DQA1*03;DQB1*0302) positivos, valores mais próximos aos encontrados no presente estudo, embora ainda menor. Embora os alelos DQ8 analisados nos estudos citados não foram os mesmos do presente estudo, é importante compreender que a susceptibilidade a DC está associada ao sistema HLA, principalmente com os alelos DQA1*05 e DQB1*02, que codificam a molécula DQ2 e o alelo DQB1*0302, que codifica a cadeia beta da molécula DQ8. Os heterodímeros DQ8 são codificados por alelos DQA1*0301 e DQB1*0302 que, devido ao desequilíbrio de ligação, são transmitidos juntamente com o alelo DRB1*04, formando o haplótipo conhecido como DR4-DQ8 (32), alelo analisado no presente estudo.

Neste estudo, os sintomas gastrointestinais mais citados foram distensão abdominal (40%), dor abdominal (15,5%) e diarreia (9,1%), que fazem parte da forma típica da DC e os sintomas extraintestinais: lesões de

pele (9,1%), emagrecimento (8,2%) e anemia (7,3%), que caracterizam a forma atípica da doença. Cassol *et al.* (23), em pesquisa realizada com 145 indivíduos celíacos confirmados por biópsia, os principais sintomas gastrointestinais relatados foram distensão abdominal (71,8%), dor abdominal (71%) e diarreia (65,5%). Quanto aos sintomas extraintestinais destacaram-se emagrecimento (51%), anemia (50,3%) e lesões de pele (27,5%), corroborando com o resultado encontrado no presente estudo. Entretanto, como a população deste estudo eram portadores de DAT, sendo a maior parte da amostra portadora de hipotireoidismo, os sintomas relatados também podem ser causados pelo efeito colateral do tratamento com levotiroxina (T4), que quando associada a uma dosagem excessiva, pode ter alguns sintomas semelhantes à DC, como perda de peso, diarreia e lesões de pele (33), entretanto, as orientações da medicação na posologia (34) descrevem que a medicação é muito bem tolerada pelos pacientes e que efeitos adversos ocorrem somente quando a dosagem está acima do necessário para controlar o hipotireoidismo. A maior parte da população estudada (95,4%) utilizava este medicamento em dosagens entre 05-250 microgramas (mcg) (de 75 a 112mcg por dia para mulheres e de 125 a 200mcg por dia para homens). Ademais, se sabe que o tratamento adequado para DC pode reduzir a dosagem dessa medicação (16) possivelmente pela melhoria da função absortiva do intestino após a dieta sem glúten. Salientando a importância de uma investigação de DC nesses pacientes. Quanto às outras doenças relacionadas com a DC, observou-se que a osteoporose (7,3%) e a intolerância à lactose (3,6%) obtiveram maiores frequências relatadas pelos participantes.

A osteoporose é um distúrbio metabólico comum na DC provocada pela diminuição da massa óssea, devido à má absorção de cálcio e vitamina D a nível intestinal. Em crianças, isso pode resultar no raquitismo, enquanto em adultos pode levar a diferentes graus de osteopenia e osteoporose (23). No entanto, há também uma relação de distúrbios metabólicos ósseos com fatores genéticos associados ao sistema HLA de classe I e II, como B7, DR15 e DQ6, que estão relacionados à menor densidade mineral óssea em mulheres na pós-menopausa (35). Em relação à intolerância à lactose, sabe-se que a lactase está localizada na superfície das vilosidades intestinais, que é comumente

lesada devido ao processo inflamatório causado pelos peptídeos do glúten em pacientes celíacos (36). Essa intolerância à lactose em pacientes celíacos pode estar presente devido à concomitância de uma segunda doença, como lactase congênita, hipolactasia ou outras doenças intestinais (37). Porém, podemos observar que apenas 3,6% da amostra relatou intolerância à lactose, enquanto que os sintomas gastrointestinais como distensão abdominal, dor abdominal e diarreia foram relatados por 40%, 15,5% e 9,1% dos participantes respectivamente, ou seja, valores bem maiores do que relatado para intolerância à lactose.

Com toda essa diversidade de sintomas gastrointestinais e extraintestinais a DC pode ser confundida com outras enteropatias, o que pode dificultar e prorrogar o diagnóstico. Paez *et al.* (38), demonstraram em seu estudo um atraso no diagnóstico da DC de 2 a 3 meses para os pacientes com sintomas gastrointestinais e 42 meses para o grupo com manifestações não gastrointestinais.

Nesse estudo não foi encontrada associação significativa entre DAT e a presença de algum dos alelos estudados, possivelmente devido ao tamanho da amostra não ser suficientemente maior para sustentar essa relação e, também, pelo fato desses alelos serem compartilhados entre DC e DAT, mas não serem os únicos alelos relacionados exclusivamente às DAT. Esta relação entre DC e DAT provavelmente refletem o aumento das doenças autoimunes em geral na DC e podem ser explicadas pela presença de características genéticas compartilhadas. Tanto o HLA-DQ2 (HLA-DQA1*05-DQB1*02) quanto o HLA-DQ8 (HLA-DQA1*03-DQB1*0302) são comuns tanto na doença da tireoide quanto na DC (21). Outra explicação seria pela presença de alelos não-HLA, estudos com o genoma identificaram mais de 100 genes não-HLA associados à DC (39,40). Contudo, sabe-se que esses genes não-HLA influenciam as respostas autoimunes em doenças como DM1, doença de Graves e hipotireoidismo (41). Portanto, a presença desses fatores de risco genético pode explicar a associação entre DC e as DAT (21).

Entretanto, encontra-se elucidado na literatura que há associação entre DC e DAT (42,19). Em pesquisa para determinar a prevalência de DC em pacientes com DAT foi encontrado 1,2% (1:85) de DC confirmada entre os

pacientes com DAT, sendo todas do sexo feminino e com tireoidite de Hashimoto (16). Ventura *et al.* (43), avaliaram a soroprevalência de DC em indivíduos portadores de tireoidite autoimune e observaram 9,3% portadores DC entre esses pacientes com DAT.

Neste estudo, os portadores de DAT apresentaram frequência para ambos os alelos do HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) de 18,2% e 3,6% eram positivos para ambos alelos do HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201, respectivamente) e também do alelo do HLA-DQ8 (DRB1*04), respectivamente. Visto que estes são haplótipos de risco para DC, é importante realizar o rastreamento para investigar um possível diagnóstico da doença principalmente se estes indivíduos tiverem a presença de sintomas e doenças relacionadas a DC.

Outro resultado do presente estudo foi à associação significativa do alelo (DRB1*04), marcador do haplótipo DR4-DQ8, com sintomas gastrointestinais (distensão abdominal, dor abdominal e diarreia) (Tabela 5), mostrando que as pessoas que tinham esse alelo tinham pelo menos um dos sintomas gastrointestinais. Quando se analisou cada sintoma separadamente com a presença ou não do alelo, a associação desse alelo (DRB1*04) com distensão abdominal foi ainda maior (Tabela 5). Entretanto, sabe-se que os sintomas gastrointestinais (distensão abdominal, dor abdominal e diarreia) fazem parte da forma típica da DC (32).

Também houve associação significativa do alelo DRB1*04 (HLA-DQ8) com DM1, mostrando que a presença de DM1 nos pacientes com DAT estava associado a esse alelo. Entretanto, estudos com maiores populações podem auxiliar na comprovação dessa significância, pois no presente estudo, encontramos 37,2% (n=41) desses pacientes com DM1. Quanto à incidência de DC em pacientes com DM1, a frequência varia de 5-10% na população caucasiana (19). Essa relação deve-se aos genes de suscetibilidade compartilhados na região HLA que contribuem para a coexistência de DM1 e DC, sendo os haplótipos HLA DR3-DQ2 e HLA DR4-DQ8 considerados os mais fortes fatores genéticos de risco para DM1 e DC. O haplótipo DR4-DQ8 é encontrado em cerca de 10% dos pacientes com DC e 70% dos pacientes com

DM1. Já no presente estudo, encontrou-se 21,8% de DQ8 nos portadores de DAT.

Diante dos resultados, é importante que se tenha mais estudos com esta e outras populações de risco para DC e com um número maior de participantes. Contudo, este estudo observou uma predominância do hipotireoidismo entre as DAT, onde os sintomas gastrointestinais e extrainstestinais foram frequentemente citados, assim como algumas doenças relacionadas com absorção intestinal associada a DC como osteoporose e intolerância à lactose. Por isso, é importante o diagnóstico precoce para evitar complicações futuras. Além disso, houve associação de todos os sintomas gastrointestinais em conjunto, do sintoma de distensão abdominal isoladamente e de DM1 com o alelo do HLA DQ8, mostrando a importância da realização de investigação de DC principalmente nesses pacientes portadores desses alelos.

Ademais, embora exista a utilização da medicação, que quando utilizada em excesso, poderá ter efeitos colaterais semelhantes aos sintomas de DC, ao analisar exclusivamente os pacientes portadores dos sintomas gastrointestinais com a presença ou não dos alelos, evidenciou-se a associação dos pacientes que tinham os sintomas com a presença de um dos alelos do HLA-DQ2 e o alelo do HLA-DQ8, salientando mais uma vez a justificativa de rastreamento de DC nessa população de risco.

Um possível diagnóstico e tratamento correto com a exclusão do glúten na alimentação nesses pacientes poderá reduzir os sintomas gastrointestinais e extraintestinais associados, reduzir o uso da medicação para DAT, evitar o desencadeamento de outras doenças autoimunes e de tumores intestinais e consequentemente, melhorar sua qualidade de vida e prognóstico.

Conclusão

A maioria dos portadores de DAT possuía pelo menos um dos alelos estudados, com prevalência maior de HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201), embora HLA-DQ8 (DRB1*04) apresentou valor maior do que apresentado em outras populações. Além disso, perfil genético mais fortemente associado à DC, tais como HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e HLA-DQ8 (DRB1*04)

estavam presentes em torno de 20% da população estudada, embora o perfil genético desses alelos associados foi de 3,6%.

Referências

1. Freire R, Ingano L, Serena G, Cetinbas M, Anselmo A, Sapone A, Sadreyev RI, Fasano A, Senger S. Human gut derived-organoids provide model to study gluten response and effects of microbiota derived molecules in celiac disease. Nature. 2019;**9**:7029.
2. Liu E, Lee HS, Aronsson CA, Hagopian WA, Koletzko S, Rewers MJ, Eisenbarth GS, Bingley PJ, Bonifacio E, Simell V, Agardh D. Risk of pediatric celiac disease according to HLA haplotype and country N Engl J Med 2014;**371**(1):42-9.
3. Parzanese I, Qehaj D, Patrinicola F, Aralica M, Chirivainternati M, Stifter S, Elli L, Grizzi F. Celiac disease: From pathophysiology to treatment. World J Gastrointest Pathophysiol 2017;**8**(2):27-38.
4. Castillo NE, Theethira TG, Leffler. The present and the future in the diagnosis and management of celiac disease. Gastroenterol Rep (Oxf) 2015;**3**(1):3-11.
5. Schuppan D, Zimmer KP .The diagnosis and treatment of celiac disease. Dtsch Ärztebl Int 2013;**110**(49):835-46.
6. Mohammdibakhsh R, Sohrabi R, Salemi M, Mirghaed MT, Behzadifar M. Celiac disease in Iran: a systematic review and meta-analysis. Electron Physician 2017;**9**(3):3883-3895.
7. De Re V, Magris R, Cannizzaro R. New insights into the pathogenesis of celiac disease. Front Med (Lausanne) 2017;**31**(4):137.
8. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, Troncone R, Giersiepen K, Branski D, Catassi C, Lelgeman M, Maki M, Ribes-Koninckx C, Ventura A, Zimmer KP, ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis, ESPGHAN Gastroenterology Committee. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2012;**54**(1):136-160.
9. Villanacci V, Ceppa P, Tavani E, Vindigni C, Volta U. Coeliac disease: the histology report. Digestive and Liver Disease 2011;43S:S385-95.
10. Mills, JR, Murray JA. Contemporary celiac disease diagnosis: is a biopsy avoidable? Curr Opin Gastroenterol 2016;**32**:80-85.
11. Lundin KE, Sollid LM Advances in coeliac disease. Curr Opin Gastroenterol 2014;**30**(2):154–162.
12. Serena G, Camhi S, Sturgeon C, Yan, S, Fasano A. The role of gluten in celiac disease and type 1 Diabetes. Nutrients 2015;**7**(9):7143-7162.
13. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. Annu Rev Immunol 2011;**29**:493-525.
14. Lionetti E, Castellaneta S, Francavilla R, Pulvirenti A, Tonutti E, Amarri S, Barbato M, Barbera C, Barera G, Bellantoni A, Castellano E, Guariso G. Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. N Engl J Med 2014;**371**(14):1295-1303.
15. Almeida LM, Gandolfi L, Pratesi R, Uenishi RH, Almeida FC, Selleski N, Nóbrega YKM. Presence of DQ2.2 Associated with DQ2.5 Increases the Risk for Celiac Disease. Autoimmune Diseases 2016.

16. Teixeira L, Nisihara R, Utiyama SRR, Bem RS, Marcatto C, Bertolazo M,Carvalho GA. Screening of celiac disease in patients with autoimmune thyroid disease from Southern Brazil. Arq Bras Endocrinol Metab 2014; **58**(6):625-629.
17. Mehrdad M, Mansour-Ghanaei F, Mohammadi F, Joukar F, Dodangeh S, Mansour-Ghanaei R. Frequency of Celiac Disease in Patients with Hypothyroidism. J Thyroid Res 2012.
18. Guariso G, Conte S, Presotto F, Basso D, Brotto F, Pozza LVD, Pedini B, Betterle C. Clinical, subclinical and potential autoimmune diseases in an Italian population of children with coeliac disease. Aliment Pharmacol Ther 2007;**26**:1409–1417.
19. Zhao Z, Zou J, Zhao L, Cheng Y, Cai H, Li M, Liu E, Yu L, Liu Y. Celiac Disease Autoimmunity in Patients with Autoimmune Diabetes and Thyroid Disease among Chinese Population. PLoS one 2016;**11**(7).
20. Gujral N, Freeman HJ, Thomson ABR. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. World J Gastroenterol 2012;**18** (42):6036-6059.
21. Elfstrom P, Montgomery SM, Kampe O, Ekbom A, Ludvigsson JF. Risk of thyroid disease in individuals with celiac disease. J Clin Endocrinol Metab 2008;**93**(10):3915–3921.
22. RUBIO-TAPIA, A.; *et al*. ACG Clinical Guidelines: Diagnosis and Management of Celiac Disease. The American of Gastroenterology, v. 108, p.656-676, 2013.
23. Cassol CA, Pellegrin CP, Wahys MLC, Pires MMS, Nassar SM.Perfil clínico dos membros da associação dos celíacos do Brasil – regional de Santa Catarina (ACELBRA-SC) Arq Gastroenterol 2007;**44**(3).
24. Miller SA, Dykes DD, Polesky. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988; **16**(3):1215.
25. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier F. Deletion polymorphism in the gene of angiotensin converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. Nature 1992;**359**: 641-644.
26. Yoshida H, Mitarai T, Kawamura T, et al. Role of the deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in the progression and therapeutic responsiveness of IgA nephropathy. Journal of Clinical Investigation 1995:96:2162 – 2169.

27. Celiac Disease, GeneReviews, Seattle University of Washington. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1727/ 2015 (Acesso 30 de setembro de 2019).
28. Caio G, Volta U, Sapone A, Leffler DA, Giorgio R, Catassi C, Fasano A. Celiac disease: a comprehensive current review. BMC 2019;**17**(142).
29. Selleski N, Almeida LM, Almeida FC, Gandolfi L, Pratesi R, Nóbrega YK. Simplifying celiac disease predisposing HLA-DQ alleles determination by the real time PCR method. Arq Gastroenterol 2015;**52**(2):143-146.
30. Spadaccino AC, Basso D, Chiarelli S, Albergoni MP, D'Odorico A, Plebani M, Pedini B, Lazzarotto F, Betterle C. Celiac disease in North Italian

patients with autoimmune thyroid diseases. Autoimmunity 2008;**41**:116 - 121.

31. Hadithi M, de Boer H, Meijer JW, Willekens F, Kerckhaert JA, Heijmans R, Pena AS, Stehouwer CD, Mulder CJ. Coeliac disease in Dutch patients with Hashimoto's thyroiditis and vice versa. World J Gastroenterol 2007;**13**(11):1715-1722.
32. Muniz JG, Sdepanian VL, Neto UF. Prevalence of genetic susceptibility for celiac disease in blood donors in São Paulo, Brazil. Archives of Gastroenterology 2016;53(4).
33. Brenta G, Vaisman M, Sgarbi JA, Bergoglio LM, Andrada NC, Bravo PP, Orlandi AM, Graf H. Diretrizes Clínicas práticas para o manejo do hipotireoidismo. Arq Bras Endocrinol Metab 2013;**57**(4):265-99.
34. Merck Group. Levotiroxina sódica .[Acesso 2019 novembro 05]. Disponível em: < http://www.merckgroup.com>

35. Douroudis K, Tarassi K, Athanassiades T, Kominakis A, Thalassinos N, Papasteriades Ch. HLA alleles as predisposal factors for postmenopausal osteoporosis in a Greek population. Tissue Antigens 2007;**69**(6):592-6.
36. Abenavoli L, Delibasic M, Peta V, Turkulov V, De Lorenzo A, Medić-Stojanoska M. Nutritional profile of adult patients whit celiac disease. Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci 2015;1**9**:4285-429.
37. Ojetti V, Nucera G, Migneco A, Gabrielli M, Lauritano C, Danese S, Zocco MA, Nista EC, Cammarota G, De Lorenzo A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. High prevalence of celiac disease in patients with lactose intolerance. Digestion 2005;**71**(2):106-10.
38. Paez MA, Gramelspacher AM, Sinacore J, Winterfield L, Venu M. Delay in Diagnosis of Celiac Disease in Patients Without Gastrointestinal Complaints. Am J Med 2017;**130**(11):1318-1323.
39. Lundin KE, Wijmenga C. Coeliac disease and autoimmune disease-genetic overlap and screening. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2015;**12**(9):507–515.
40. Dieli-Crimi R, Cénit MC, Núñez C. The genetics of celiac disease: a comprehensive review of clinical implications. J Autoimmun 2015;**64:**26–41.
41. Ueda H.; Howson JM, Esposito L, et al. Association of the T-cell regulatory gene CTLA4 with susceptibility to autoimmune disease. Nature 2003;**423**: (6939)506–511.
42. Canova C, Pitter G, Ludvigsson JF, Romor P, Zanier L, Zanotti R, Simonato L. Celiac Disease and Risk of Autoimmune Disorders: A Population-Based Matched Birth Cohort Study. J Pediatr 2016;**174**: 146-152.
43. Ventura A, Ronsoni MF, Shiozawa MBC, Dantas- Corrêa EB, Canalli MHBS, Schiavon LL, Narciso-Schiavon JL. Prevalence and clinical features of celiac disease in patients with autoimmune thyroiditis: cross-sectional study. São Paulo Med J 2014;**132**(6).

APÊNDICES

Apêndice A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para maiores de dezoito anos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador responsável: Fabiana Torma Botelho, Clédia Silveira Flores da Silva.

Instituição: Universidade Federal de Pelotas **Endereço:** Rua Gomes Carneiro, nº 1. Centro. Pelotas –RS **Telefones:** (53) 98105-0759/98438-0360.

Gostaríamos de convidá-lo a participar do estudo **"Frequência dos alelos HLA e não- HLA em portadores de doenças autoimunes da tireoide"**, o qual tem por objetivo determinar a frequência dos alelos HLA em indivíduos portadores de doenças autoimunes da tireoide que frequentam os Ambulatórios de Nutrição e Ambulatório de Endocrinologia pertencentes à Universidade Federal de Pelotas.

O teste genético será realizado através da coleta de saliva para posterior identificação em laboratório. Para isso, você primeiramente precisará enxaguar a boca com água tratada e posteriormente, esfregar um cotonete de cabo comprido várias vezes entre as duas bochechas. Também, você precisará responder a um questionário com questões sociodemográficas e sobre sua saúde. Fui informado que a justificativa desse estudo é contribuir para o diagnóstico precoce da doença celíaca, pois, os indivíduos portadores de doenças autoimunes da tireoide apresentam uma maior chance de desenvolver a doença celíaca. Além disso, o diagnóstico e o tratamento tardio podem levar a complicações futuras.

Fui informado que a justificativa desse estudo é contribuir para o diagnóstico precoce da doença celíaca, pois, os indivíduos portadores de doenças autoimunes da tireoide apresentam uma maior chance de desenvolver a doença celíaca. Além disso, o diagnóstico e o tratamento tardio podem levar a complicações futuras.

Fui informado de que os riscos se referem à coleta de saliva e a aplicação do questionário, pois, o entrevistado poderá sentir-se constrangido quanto às perguntas do questionário e no momento da coleta de saliva. A fim de minimizar os riscos, será realizada a coleta de saliva em sala separada dos demais participantes e em relação ao questionário será aplicado por meio de uma conversa onde o participante possa se sentir à vontade sempre buscando sanar suas dúvidas em um ambiente acolhedor. O benefício de participar do estudo é que para os casos que apresentarem o teste genético positivo, será orientada à investigação médica de possível diagnóstico de doença celíaca, ou seja, a consulta com o médico será recomendada e não faz parte do estudo, ficando a critério dos indivíduos participantes do estudo investigar a possibilidade da doença. Ainda, receberei retorno sobre as análises genéticas realizadas e seus resultados, orientações dietéticas e materiais serão entregues se confirmado diagnóstico com o gastroenterologista posteriormente.

Como já me foi dito, minha participação neste estudo será voluntária e poderei interrompê-la a qualquer momento, não haverá remuneração associada à minha participação na pesquisa e os resultados serão usados somente para fins de pesquisa, sendo que minha identidade permanecerá confidencial durante todas as etapas do estudo.

Estou ciente de que a presente pesquisa será realizada em dois encontros. Primeiro encontro será feita a coleta de saliva e aplicação do questionário; segundo encontro, apresentação dos resultados.

CONSENTIMENTO: Recebi claras explicações sobre o estudo, todas registradas neste formulário de consentimento. Os investigadores do estudo responderam e responderão, em qualquer etapa do estudo, a todas as minhas perguntas, até a minha completa satisfação. Portanto, estou de acordo em participar do estudo. A seguir, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra pertence à pesquisadora responsável.

Nome:_____

Identidade:_____

ASSINATURA:_____DATA:____/____/_____

AUTORIZAÇÃO: Eu_____, autorizo a coleta de minha saliva e a coleta das respostas para o questionário, assim como o armazenamento e posterior utilização em análises.

ASSINATURA:_____

Testemunha

Nome:_____

ASSINATURA:_____DATA:____/____/___

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DO INVESTIGADOR: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me à disposição para perguntas e as respondi em sua totalidade. O participante compreendeu minha explicação e aceitou, sem imposições, assinar este consentimento. Tenho como compromisso utilizar os dados e o material coletado para a publicação de relatórios e artigos científicos referentes a essa pesquisa.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Fabiana Torma Botelho, Contatos:(53) 98105-0759/fabibotelho@hotmail.com, Clédia Silveira Flores da Silva, Contatos: (53) 98438-0360/clediajag@gmail.com (Faculdade de Nutrição. Campus Porto. Rua Gomes Carneiro, nº 1).

ASSINATURA PESQUISADOR RESPONSÁVEL: _____

Data:___/____/_____

Apêndice B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para menores de dezoito anos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisador responsável: Fabiana Torma Botelho, Clédia Silveira Flores da Silva.
Instituição: Universidade Federal de Pelotas. **Endereço:** Rua Gomes Carneiro, nº 1. Centro. Pelotas –RS. **Telefones:** (53) 98105-0759/98438-0360.

Gostaríamos de convidar seu filho(a) ou_____a participar do estudo **"Frequência dos alelos HLA em portadores de doenças autoimunes da tireoide",** o qual tem por objetivo determinar a frequência dos alelos HLA em indivíduos portadores de doenças autoimunes da tireoide que frequentam o Ambulatório de Nutrição e Ambulatório de Endocrinologia pertencentes à Universidade Federal de Pelotas.

O teste genético será realizado através da coleta de saliva para posterior identificação em laboratório. Para isso, meu filho ou_____precisará enxaguar a boca com água tratada e esfregar um cotonete de cabo comprido várias vezes entre as duas bochechas. Ainda, meu filho ou_____precisará responder a um questionário com questões sociodemográficas e sobre sua saúde.

Fui informado que a justificativa desse estudo é contribuir para o diagnóstico precoce da doença celíaca, pois, os indivíduos portadores de doenças autoimunes da tireoide apresentam uma maior chance de desenvolver a doença celíaca. Além disso, o diagnóstico e o tratamento tardio podem levar a complicações futuras.

Fui informado que a justificativa desse estudo é contribuir para o diagnóstico precoce da doença celíaca, pois os indivíduos portadores de doenças autoimunes da tireoide apresentam uma maior chance de desenvolver a doença celíaca. Além disso, o diagnóstico e o tratamento tardio podem levar a complicações futuras.

Fui informado de que os riscos se referem à coleta de saliva e a aplicação do questionário, pois o entrevistado poderá sentir-se constrangido quanto às perguntas do questionário e no momento da coleta de saliva. A fim de minimizar os riscos, será realizada a coleta de saliva em sala separada dos demais participantes e em relação ao questionário será aplicado por meio de uma conversa onde o participante possa se sentir à vontade sempre buscando sanar suas dúvidas em um ambiente acolhedor. O benefício de participar do estudo é que para os casos que apresentarem o teste genético positivo, será orientada à investigação médica de possível diagnóstico de doença celíaca, ou seja, a consulta com o médico será recomendada e não faz parte do estudo, ficando a critério dos indivíduos participantes do estudo investigar a possibilidade da doença. Ainda, receberei retorno sobre as análises genéticas e seus resultados, orientações dietéticas e materiais serão entregues se confirmado diagnóstico com o gastroenterologista posteriormente. Como já me foi dito, a participação de meu (minha) filho(a) ou_____neste estudo será voluntária, não haverá nenhuma forma de remuneração em participar da pesquisa e que poderei interrompê-la a qualquer momento, além disso que os resultados serão usados somente para fins de pesquisa, sendo que as nossas identidades permanecerão confidenciais durante todas as etapas do estudo.

Estou ciente de que a presente pesquisa será realizada em dois encontros. Primeiro encontro, coleta de saliva e aplicação do questionário; segundo encontro, apresentação dos resultados.

CONSENTIMENTO: Recebi claras explicações sobre o estudo, todas registradas neste formulário de consentimento. Os investigadores do estudo responderam e responderão, em qualquer etapa do estudo, a todas as minhas perguntas, até a minha completa satisfação. Portanto, estou de acordo que meu(minha) filho(a) participe do estudo. Este formulário de consentimento Pré-Informado será assinado por mim e arquivado na instituição responsável pela pesquisa. A seguir, assine ao final deste documento, que está impresso em duas vias, sendo que uma delas é sua e a outra pertence à pesquisadora responsável.

Nome da criança/ adolescente: _____

Representante legal: _____

Vínculo Familiar ou Legal do representante:_____

Identidade do representante:_____

ASSINATURA:_____DATA:__/__/___

_____

Além de autorizar que meu (minha) filho (a) ou_____participe da pesquisa, coleta de saliva e preenchimento de questionário, autorizo também os pesquisadores a armazenar as respostas do questionário e a saliva concedidos por mim para análises posteriores.

Assinatura do responsável:_____

_____

Testemunha

Nome:_____

Assinatura:_____DATA:__/__/___

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DO INVESTIGADOR: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios deste estudo. Coloquei-me à disposição para perguntas e as respondi em sua totalidade. O participante compreendeu minha explicação e aceitou, sem imposições, assinar este consentimento. Tenho como compromisso utilizar os dados e o material coletado para a publicação de relatórios e artigos científicos referentes a essa pesquisa.

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Fabiana Torma Botelho, Contatos:(53) 98105-0759/fabibotelho@hotmail.com, Clédia Silveira Flores da Silva, Contatos: (53) 98438-0360/clediajag@gmail.com (Faculdade de Nutrição. Campus Porto. Rua Gomes Carneiro, nº 1).

ASSINATURA PESQUISADOR RESPONSÁVEL: _____

DATA:__/__/___

Apêndice C - Questionário com questões sóciodemográficas e sobre saúde dos participantes do estudo.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS **FACULDADE DE NUTRIÇÃO** **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS** **Pesquisa:** -Frequência dos alelos HLA e não-HLA em portadores de doenças autoimunes da tireoide‖. **Pesquisadores responsáveis:** Clédia Silveira Flores da Silva, Fabiana Torma Botelho e Carlos Castilho de Barros.	
QUESTIONÁRIO SOCIÓDEMOGRÁFICO	
1. Nome:_____**2.** Data de nascimento:_____/____/____ **3.** Telefone para contato: _____	
4. Idade: _____	Idad_____
5. Sexo: **(1)** Masculino **(2)** Feminino	Sexo _____
6. Raça: **(1)** Branca **(2)** Parda **(3)** Negra	Raça _____
7. Qual é a sua escolaridade? **(1)** Analfabeto **(5)** Ensino médio completo **(2)** Fundamental até o 5º ano **(6)** Ensino superior incompleto **(3)** Fundamental completo **(7)** Ensino superior completo **(4)** Ensino médio incompleto **(8)** Pós-Graduação	Esc _____
8. Você tem algum familiar com doença celíaca? **(1)** Sim **(2)** não Se sim, quantos e qual o grau de parentesco? _____	Parceliac_____ Numpar_____ Grauparent _____
9. Marque abaixo sintomas/problemas que você tenha: **(1)** Diarreia **(6)** Emagrecimento **(2)** Dor abdominal **(7)** Anemia **(3)** Distensão abdominal **(8)** Lesões de pele **(4)** Dificuldade em ganhar peso **(9)** Outros? Quais? _____ **(5)** Dificuldade em ganhar altura **(10)** Não se aplica	Sint: _____
10. Marque se você possui uma ou mais doenças: **(1)** Hipotireoidismo **(9)** Síndrome de Turner **(2)** Hipertireoidismo **(10)** Síndrome de Williams **(3)** Diabetes Mellitus Tipo 1 **(11)** Osteoporose **(4)** Infertilidade **(12)** Intolerância à lactose **(5)** Abortos de repetição **(13)** Intolerância a proteína do leite de vaca **(6)** Dermatite Herpetiforme **(14)** Artrite reumatoide **(7)** Síndrome de Down **(15)** Outras Quais?_____ **(8)** Deficiência de IgA **(16)** Não se aplica	Doenç _____
11. Se você possui Hipotireoidismo ou Hipertireoidismo, realizou algum dos exames abaixo? Qual foi o resultado? Dosagem de anticorpos anti-tireoglobulina: **(1)** Normal **(2)** Alterado Dosagem de anticorpos anti-tireotropina: **(1)** Normal **(2)** Alterado Dosagem de anticorpos anti-tireoperoxidase: **(1)** Normal **(2)** Alterado	Tg _ _ TSH _ _ TPO _ _
12. Alguma vez desconfiou em ter Doença Celíaca? **(1)** Sim **(2)** Não Se sim, por quê?_____	DescDC _____
13. Se desconfiou em ter a Doença Celíaca, buscou investigar? **(1)** Sim **(2)** Não **(3)** Não se aplica	Invest_____
14. Se buscou investigar, realizou algum dos exames abaixo? Qual foi o resultado?	

Dosagem de anticorpos anti-endomísio: **(1)** Normal **(2)** Alterado Dosagem de anticorpos anti-transglutaminase: **(1)** Normal **(2)** Alterado Dosagem de HLA-DQ2: **(1)** Normal **(2)** Alterado Dosagem de HLA-DQ8: **(1)** Normal **(2)** Alterado Biópsia do intestino delgado: **(1)** Normal **(2)** Alterado **(3)** Inconclusivo	EMA_ _ tTG_ _ DQ2_ _ DQ8_ _ Biop_ _
15. Se você fez a biópsia intestinal, foram coletados 4 fragmentos do intestino? **(1)** Sim **(2)** Não **(3)** Não sei E foi realizada a contagem de linfócitos? **(1)** Sim **(2)** Não **(3)** Não sei	Biopfrag_ _ Linf_ _
16. Se desconfiou e não investigou, qual foi o motivo? **(1)** Receio da realização dos exames **(2)** Receio do resultado dos exames **(3)** Receio em ir ao médico **(4)** Não tive tempo **(5)** Os sintomas não me incomodam **(6)** Não tenho sintomas graves **(7)** Não irei parar de consumir glúten, se tiver a doença **(8)** Falta de recurso financeiro **(9)** Outro. Qual?_____ **(10)** Não se aplica	NInvest _ _
17. Faz restrição de glúten na dieta? **(1)** Sim **(2)** Não Por quê? _____	Restr_ _