

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Faculdade de Nutrição**

**Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos**



**Dissertação**

**Frequência dos alelos de risco relacionados aos complexos HLA-DQ2 e  
HLA-DQ8 em parentes de primeiro grau de celíacos no sul do Brasil**

**Giovana Ribeiro Pegoraro**

**Pelotas, 2018**

**Giovana Ribeiro Pegoraro**

**Frequência dos alelos de risco relacionados aos complexos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em parentes de primeiro grau de celíacos no sul do Brasil**

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.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Castilho Barros

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fabiana Torma Botelho

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> PhD Inês Claudia Schadock

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

P376f Pegoraro, Giovana Ribeiro

Frequência dos alelos de risco relacionados aos complexos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em parentes de primeiro grau de celíacos no sul do Brasil / Giovana Ribeiro Pegoraro ; Carlos Castilho Barros, orientador ; Fabiana Torma Botelho, Ines Claudia Schadock, coorientadoras. — Pelotas, 2018.

69 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Doença celíaca. 2. Glúten. 3. Fatores genéticos. 4. Herdabilidade. I. Barros, Carlos Castilho, orient. II. Botelho, Fabiana Torma, coorient. III. Schadock, Ines Claudia, coorient. IV. Título.

CDD : 641.1

Giovana Ribeiro Pegoraro

Frequência dos alelos de risco relacionados aos complexos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em parentes de primeiro grau de celíacos no sul do Brasil

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

Data da defesa: 11/07/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Carlos Castilho Barros (Orientador)  
Doutor em Ciências Biológicas: Biotecnologia pela Universidade de Mogi das Cruzes

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Torma Botelho (Co-orientadora)  
Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Inês Cláudia Schadock (Co-orientadora)  
PhD em Ciências Biológicas pela Universidade Humboldt de Berlim

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

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, Lorenzo e Geni – minha base – por todos os cuidados e, proteção e, principalmente, pela preocupação que sempre tiveram com o meu futuro, me incentivando e dando forças para o meu crescimento pessoal e profissional.

À minha irmã, Juliana, por ser uma anjinha em minha vida, me fazendo pensar com otimismo frente aos obstáculos e que sempre depositou confiança em meus potenciais.

Ao meu amor, Matheus, por ser o meu melhor amigo e estar ao meu lado me incentivando com palavras positivas, me fazendo sorrir até nos momentos desfavoráveis e, principalmente pelo abraço que sempre me confortou e deu segurança para seguir em frente, na luta por meus objetivos.

À minha avó, Elvira e, ao Sr. Joaquim, por terem me acolhido com tanto carinho em sua casa, durante todo este período.

À minha querida amiga, Mônica, pelo companheirismo e auxílio em todas as etapas deste trabalho, é incrível como funcionamos maravilhosamente bem juntas! Se não fôssemos nós duas, talvez as coisas poderiam ter sido bem mais difíceis.

Ao meu professor orientador, Dr. Carlos Castilho de Barros, e às professoras co-orientadoras, Dr<sup>a</sup> Fabiana Toma Botelho e Dr<sup>a</sup> Ines Schadock, pelos conhecimentos transmitidos e auxílio em minha qualificação profissional.

À Odette Maluf, Helouse Carneiro, Ester Benatti, Neiva Votto e Fabiane dos Santos Ribeiro, pelo auxílio na coleta dos dados desta pesquisa.

Ao Hippo Supermercados (Florianópolis/SC), ACELBRA-SC (Florianópolis/SC), Consultório H2O Nutrição (Blumenau/SC), Confraria Kero Food Truck (Porto Alegre/RS), Hospital Universitário Dr Miguel Riet Corrêa Jr. (Rio Grande/RS), Academia Keep Training (Pelotas/RS) e Armazém da Saúde (Santa Maria/RS) pela disponibilização de espaço para realização de nossas coletas.

## Resumo

PEGORARO, Giovana Ribeiro. **Frequência dos alelos de risco relacionados aos complexos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em parentes de primeiro grau de celíacos no sul do Brasil**. 2018. 69f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

A doença celíaca (DC) é uma doença crônica inflamatória que acomete o intestino delgado, a qual é ocasionada pela associação de três elementos: suscetibilidade genética, resposta autoimune e exposição ao glúten. Calcula-se que apenas 10 a 15% dos celíacos são devidamente diagnosticados. O diagnóstico é feito com base em manifestações clínicas, realização de testes sorológicos, testes genéticos e biópsia intestinal, a qual é considerada o padrão ouro no fechamento do diagnóstico. Os principais determinantes da suscetibilidade genética à DC estão localizados na região que codifica para o Antígeno Leucocitário Humano (HLA) de classe II, mais especificamente nos alelos que constituem os complexos HLA-DQ2 e HLA-DQ8. A partir da identificação desses alelos é possível conhecer o risco de determinadas populações virem a desenvolver a doença e, quando ausentes, pode-se favorecer um diagnóstico de redução de risco. Os parentes de primeiro grau de celíacos são considerados grupo de alto risco para o desenvolvimento da doença devido à grande probabilidade da herdabilidade desses fatores genéticos. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi verificar a frequência dos alelos de risco dos complexos HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) e HLA-DQ8 (DRB1\*04) e associar com a presença de sintomas e doenças relacionadas à DC em parentes de primeiro grau de celíacos no sul do Brasil. Foi aplicado um questionário solicitando dados de caracterização da amostra e incidência de outras doenças e sintomas associados à DC. O DNA genômico foi extraído de células da mucosa bucal. Os alelos foram identificados por reação em cadeia da polimerase. Dos 224 indivíduos participantes, 14 foram excluídos da análise de sintomas por realizarem restrição total de glúten, sendo assim, 67,6% dos indivíduos relataram algum tipo de sintoma associado à DC. As doenças associadas à DC foram referidas por 40,6% e a intolerância à lactose foi mais frequente (18,3%). Foi observado que 87% dos parentes de celíacos possuíam ao menos um dos alelos de risco estudados, sendo que 79,9% apresentaram alelos de risco relacionados ao complexo HLA-DQ2 e 29,9% ao HLA-DQ8. Dos indivíduos positivos para ambos os alelos DQA1\*0501 e DQB1\*0201 do complexo HLA-DQ2, 78,4% relataram sintomas associados à DC ( $p=0,003$ ), sendo a distensão abdominal o sintoma mais frequente ( $p=0,006$ ). Indivíduos portadores do alelo DRB1\*04, marcador do haplótipo DR4-DQ8, referiram maior incidência de osteoporose ( $p=0,02$ ) e hipotireoidismo ( $p=0,04$ ) ao comparar com não portadores deste alelo. Esses resultados ressaltam a importância da genotipagem dos alelos de risco relacionados ao sistema HLA no diagnóstico de DC por estarem associados à maior frequência de outras doenças e sintomas relacionados à DC.

**Palavras-chave:** doença celíaca; glúten; fatores genéticos; herdabilidade.

## Abstract

PEGORARO, Giovana Ribeiro. **Frequency of risk alleles related to HLA-DQ2 and HLA-DQ8 complexes in first-degree relatives of celiac in southern Brazil.** 2018. 69f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

Celiac disease (DC) is a chronic inflammatory disease that affects the small intestine, which is caused by the association of three elements: genetic susceptibility, autoimmune response and exposure to gluten. It is estimated that only 10 to 15% of celiacs are properly diagnosed. The diagnosis is made based on clinical manifestations, serological tests, genetic tests and intestinal biopsy, which is considered the gold standard at the close of the diagnosis. The main determinants of genetic susceptibility to CD are located in the region coding for Class II Human Leukocyte Antigen (HLA), more specifically in the alleles that make up the HLA-DQ2 and HLA-DQ8 complexes. From the identification of these alleles it is possible to know the risk of certain populations developing the disease and, if absent, a risk reduction diagnosis can be favored. First-degree relatives of celiac patients are considered a high-risk group for the development of the disease due to the high probability of inheritance of these genetic factors. Therefore, the objective of the present study was to verify the frequency of the risk alleles of HLA-DQ2 complexes (DQA1 \* 0501 and DQB1 \* 0201) and HLA-DQ8 (DRB1 \* 04) and to associate them with the presence of DC in first-degree relatives of celiac patients in southern Brazil. A questionnaire was applied requesting data characterizing the sample and incidence of other diseases and symptoms associated with CD. Genomic DNA was extracted from cells of the buccal mucosa. The alleles were identified by polymerase chain reaction. Of the 224 participants, 14 were excluded from the analysis of symptoms because they performed a total gluten restriction. Thus, 67.6% of the individuals reported some type of symptom associated with CD. The diseases associated with CD were reported by 40.6% and lactose intolerance was more frequent (18.3%). It was observed that 87% of celiac relatives had at least one of the risk alleles studied, 79.9% of which presented risk alleles related to HLA-DQ2 complex and 29.9% to HLA-DQ8 complex. Of the individuals positive for both HLA-DQ2 complex DQA1 \* 0501 and DQB1 \* 0201 alleles, 78.4% reported symptoms associated with CD ( $p = 0.003$ ), abdominal distension being the most frequent symptom ( $p = 0.006$ ). Individuals with the DRB1 \* 04 allele, a marker of the DR4-DQ8 haplotype, reported a higher incidence of osteoporosis ( $p = 0.02$ ) and hypothyroidism ( $p = 0.04$ ) when compared to non-carriers of this allele. These results highlight the importance of the genotyping of HLA-related risk alleles in the diagnosis of CD because they are associated with a higher frequency of other diseases and symptoms related to CD.

**Key words:** celiac disease; gluten; genetic factors; heritability.

## Lista de Figuras

Figura 1	Patogênese da doença celíaca.....	14
Figura 2	Estrutura gênica do HLA.....	20
Figura 3	Gradiente de risco para o desenvolvimento da DC.....	22
Figura 4	Herança dos alelos HLA-DQ2 e DQ8.....	23
Figura 5	Análise dos resultados da genotipagem por eletroforese.....	30
Figura 6	Frequência dos alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em parentes de primeiro grau de celíacos.....	36



## Lista de Tabelas

Tabela 1	Característica dos <i>primers</i> utilizados na PCR.....	29
Tabela 2	Caracterização da amostra em relação à cidade, estado de origem, sexo, cor, distribuição por idade e parentesco com indivíduos celíacos.....	32
Tabela 3	Presença de sintomas, doenças relacionadas à Doença Celíaca, e restrição de glúten em parentes de primeiro grau de celíacos.....	34
Tabela 4	Percentual de realização de exames relacionados à Doença Celíaca e resultado, em parentes de primeiro grau de celíacos.....	35
Tabela 5	Relação do perfil genético com sintomas associados à Doença Celíaca, em parentes de primeiro grau de celíacos.....	38
Tabela 6	Relação do perfil genético com a presença de doenças relacionadas à Doença Celíaca, em parentes de primeiro grau de celíacos.....	40

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>Revisão bibliográfica.....</b>	<b>13</b>
2.1	Doença Celíaca.....	13
2.1.1	Definição.....	13
2.1.2	Fisiopatologia.....	13
2.1.3	Epidemiologia.....	15
2.1.4	Manifestações clínicas.....	16
2.1.5	Classificação.....	16
2.1.6	Doenças relacionadas.....	17
2.1.7	Diagnóstico.....	18
2.1.8	Tratamento.....	19
2.2	Bases moleculares da doença.....	19
2.2.1	Sistema de Histocompatibilidade.....	19
2.2.2	Haplótipos.....	20
2.2.3	Heterodímeros HLA-DQ2 e HLA-DQ8.....	21
2.2.4	Gradiente de risco.....	21
2.3	Relação da doença celíaca com parentes de primeiro grau de celíacos.....	23
<b>3</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>24</b>
3.1	Objetivo geral.....	24
3.2	Objetivos específicos.....	24
<b>4</b>	<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>25</b>
4.1	População alvo e aspectos éticos.....	25
4.2	Rastreamento de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8.....	26
4.2.1	Coleta de material.....	26
4.2.2	Extração do gDNA.....	27
4.2.3	Amplificação do DNA (PCR).....	28
4.2.4	Retorno dos resultados aos participantes.....	31
4.3	Análise estatística.....	31
<b>5</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>32</b>
5.1	Descrição da amostra.....	32
5.2	Distribuição genotípica.....	35

5.3	Associações dos genótipos com sintomas relatos.....	36
5.4	Associações dos genótipos com doenças relacionadas à DC.....	39
<b>6</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>41</b>
<b>7</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>47</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>48</b>
	<b>Apêndices.....</b>	<b>53</b>
	Apêndice A.....	54
	Apêndice B.....	55
	Apêndice C.....	56
	Apêndice D.....	57
	Apêndice E.....	59
	Apêndice F.....	60
	<b>Anexos.....</b>	<b>62</b>
	Anexo A.....	63
	Anexo B.....	67

## 1 Introdução

A doença celíaca (DC) é um distúrbio autoimune que ocorre em indivíduos predispostos geneticamente, onde o glúten é detectado como um antígeno, desencadeando resposta imune específica (LEBWOHL et al., 2018). Glúten é o termo que se refere a polipeptídeos insolúveis presentes no trigo, centeio e cevada (ABENAVOLI et al., 2015). Atualmente, o único tratamento existente para a DC é a restrição permanente do glúten (ARAÚJO et al., 2010). A DC, quando não tratada, resulta em inflamação do epitélio intestinal, aumento da deposição de linfócitos, atrofia das vilosidades e produção de resposta autoimune, originando um quadro de mal absorção e conseqüentemente o surgimento de diversas manifestações clínicas tanto a nível intestinal como a nível sistêmico (ROSTOM et al., 2006).

O diagnóstico da DC é feito com base nas manifestações clínicas características da doença, realização de testes sorológicos, testes genéticos e biópsia do intestino delgado (HUSBY et al., 2012). A genotipagem dos alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 deve ser realizada por serem os principais fatores de suscetibilidade genética na DC (HUSBY et al., 2012). Essas moléculas são expressas na superfície de células apresentadoras de antígenos, encontradas na lâmina própria do intestino, que contribuem para a ligação dos fragmentos de glúten aos linfócitos T CD4+, provocando resposta imune (GUANDALINI & ASSIRI, 2014).

Um grande número de celíacos permanece sem diagnóstico (WALKER & TALLEY, 2011). Estima-se que para cada caso diagnosticado existe uma média de 5 a 10 casos não diagnosticados (CATASSI et al., 2015). A falha na detecção da DC pode levar a um maior risco de mortalidade; (ARAÚJO et al., 2010). Por isso, existe a necessidade de se realizar o diagnóstico precoce da DC, a fim de evitar complicações a longo prazo e prover melhora na qualidade de vida dos indivíduos que apresentam a doença e a desconhecem. Nesse contexto, avaliar a frequência desses alelos em parentes de primeiro grau de celíacos é uma ferramenta importante para a avaliação de risco para o desenvolvimento da DC.

## **2 Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Doença Celíaca**

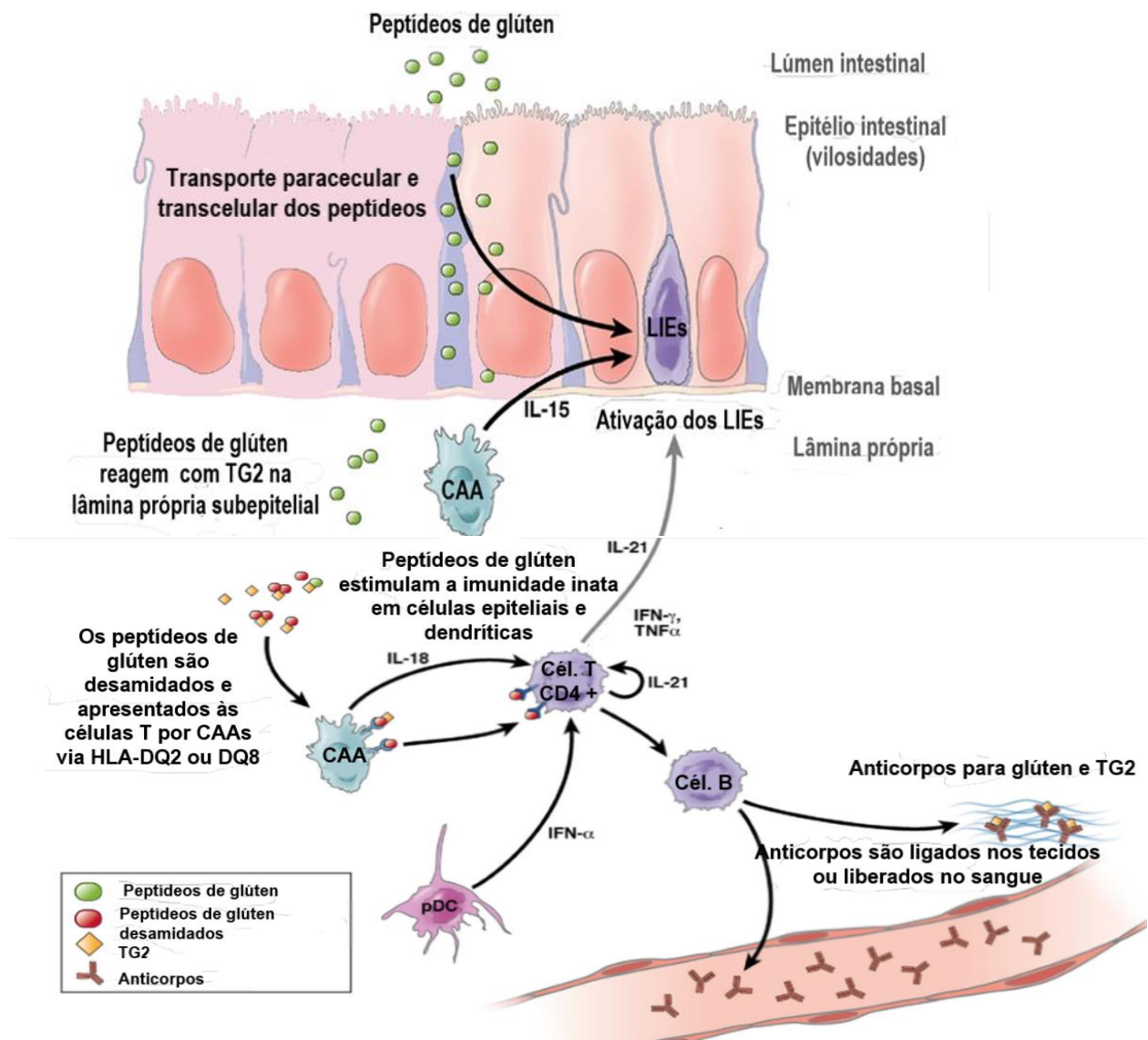
#### **2.1.1 Definição**

A DC é uma doença crônica inflamatória que acomete o intestino delgado e é ocasionada pela associação de três importantes fatores: suscetibilidade genética, resposta autoimune e exposição ao glúten (ARAYA et al., 2015). O glúten é constituído por prolaminas, que são polipeptídeos insolúveis em água, presentes no trigo (gliadina), centeio (secalina), cevada (hordeína), e todos os produtos originários destes (LUDVIGSSON et al., 2013). A aveia não é considerada tóxica aos celíacos, no entanto, recomenda-se evitar seu consumo devido a possibilidade de contaminação cruzada no transporte, armazenamento e embalagem de outros grãos que contenham glúten (GREEN & JABRI, 2003; KOERNER et al., 2011).

#### **2.1.2 Fisiopatologia**

Indivíduos geneticamente predispostos e portadores da doença apresentam intolerância permanente ao glúten. Isto ocorre, pois, os peptídeos de sua composição apresentam como parte estrutural a  $\alpha$ -gliadina que é resistente às enzimas proteolíticas gastrointestinais. Em consequência disso, o glúten chega intacto ao lúmen intestinal e seus peptídeos passam a ser apresentados por células do sistema imune, ativando tanto respostas inatas como adaptativas (YUAN et al., 2013). O desencadeamento de resposta imunitária é mediado principalmente por linfócitos T auxiliares, com consequente liberação de anticorpos e secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas (IL) 1 $\beta$ , IL4, IL6, IL8, IL10, IL15, IL17A, IL21, além de fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interferon  $\gamma$ , os quais são fatores desencadeantes da atrofia das vilosidades intestinais provocando o aparecimento das manifestações clínicas (GUTIERREZ-ACHURY et al., 2011). Além disso, existe uma elevada afinidade das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  dos heterodímeros HLA-DQ2 e HLA-DQ8 com os peptídeos de gliadina, e isto ocorre porque estes peptídeos

apresentam sequências específicas de aminoácidos para esses alelos (GREEN & CELLIER, 2007).



**Figura 1: Patogênese da doença celíaca.** Os peptídeos de glúten são resistentes às proteases intestinais atingindo a lâmina própria via transcelular (por receptores) ou paracelular (por junções apertadas abertas). Uma vez na lâmina própria, os peptídeos são desamidados pela enzima transglutaminase tecidual (TG2), produzindo epítopos imunogênicos que são apresentados via HLA-DQ2 ou DQ8 em células apresentadoras de antígeno (CAAs) às células T CD4+. A partir da ativação linfocitária há a produção de citocinas inflamatórias e aumento dos linfócitos intraepiteliais (LIEs), acarretando em remodelamento da mucosa com hiperplasia das criptas e atrofia das vilosidades. A ativação de

células B levam à produção de anticorpos anti-transglutaminase (anti-tTG). Os peptídeos de glúten estimulam a imunidade inata em células epiteliais e dendríticas (pDC) e a IL-15 liga o sistema imune adaptativo às respostas imunes inatas (Adaptado de: SCHUPPAN et al., 2009; PÉREZ et al., 2012).

### 2.1.3 Epidemiologia

A epidemiologia da DC é frequentemente comparada a um *iceberg*, onde os casos sintomáticos representam a parte visível e os casos assintomáticos ou não diagnosticados caracterizam a porção submersa (CATASSI et al. 2015; YUAN et al., 2013). Essa associação representa que poucas pessoas são devidamente diagnosticadas e que a maioria dos indivíduos possui a doença, mas não sabe. Tal circunstância pode levar ao diagnóstico tardio da DC acarretando em problemas de saúde pública em decorrência do aumento da taxa de mortalidade, a qual parece estar associada à extensão das lesões intestinais e à quantidade de glúten consumida (ARAÚJO et al., 2010; BIAGI & CORAZZA, 2010).

Há alguns anos atrás a DC era descrita somente em áreas geográficas onde alimentos predominantes em glúten eram de cultivo prioritário. No entanto, ao transcorrer dos anos, esse padrão foi alterado em decorrência das mudanças globais na alimentação, pois observou-se um consumo crescente de produtos à base de trigo (CATASSI et al., 2014).

Nesse contexto, diversos estudos têm buscado estimar a prevalência da DC por meio da dosagem de anticorpos específicos (REILLY & GREEN, 2012). Em muitos países essa prevalência encontra-se entre 0,5 e 1% na população em geral (CATASSI et al., 2015). Estudos realizados em doadores de sangue verificaram uma possível prevalência da DC de 1:250 nos Estados Unidos (NOT et al., 1998). Já no Brasil, encontrou-se uma prevalência estimada de 1:681 (Brasília/DF), 1:273 (Ribeirão Preto/SP) e 1:214 (São Paulo/SP) (GANDOLFI et al., 2000; MELO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

Em relação a frequência de DC entre gêneros, nota-se que esta é diagnosticada cerca de duas a três vezes mais em mulheres do que em homens (REILLY & GREEN, 2012). No que diz respeito a ocorrência da doença entre raças percebe-se principalmente o acometimento de indivíduos de cor branca,

porém no Brasil, devido à miscigenação racial, a doença já foi descrita em afrodescendentes (ARAÚJO et al, 2010). Além disso, existe relatos de que a prevalência da doença aumenta com o avançar da idade (REILLY & GREEN, 2012).

#### **2.1.4 Manifestações Clínicas**

Entre os sintomas mais frequentemente relatados por pacientes com DC estão as desordens gastrointestinais como dor abdominal, distensão abdominal, diarreia ou constipação crônica (HUSBY, et al., 2012). Além disso, os pacientes podem apresentar anormalidades extraintestinais, a exemplo de anemia ferropriva, enxaqueca, fadiga, perda de peso, baixa estatura, dificuldade em ganhar peso e estatura, e diversas outras condições ocasionadas por mal absorção de vitaminas e minerais (TAYLOR, et al., 2015). Existem muitos casos de desnutrição associados à presença de DC não tratada, destacando ainda, diversas deficiências de micronutrientes como vitamina D, cálcio, ferro, ácido fólico e vitamina B12, os quais apresentam sítio de absorção principal no intestino delgado (ABENAVOLI et al., 2015).

#### **2.1.5 Classificação**

A DC pode ser clinicamente classificada em: clássica, atípica, assintomática, latente e potencial (HUSBY et al., 2012). A forma clássica é a mais comumente descrita e, compreende o aparecimento de manifestações clínicas gastrointestinais com alterações histopatológicas características (ROSTOM et al., 2006). Já a forma não clássica, ou atípica, é destacada pela ausência de sintomas digestivos, mas presença de manifestações extraintestinais isoladas, onde estes indivíduos geralmente apresentam atrofia das vilosidades, mas, como não apresentam sintomas gastrointestinais, são vistos como assintomáticos, deixando de ser diagnosticados (ROSTOM et al., 2006). A DC assintomática ou silenciosa é caracterizada pela presença de anticorpos específicos positivos para DC, assim como alelos de risco do HLA e achados de biópsia do intestino delgado compatíveis com DC, mas sem manifestações clínicas suficientes para justificar a suspeita da doença, onde



muitas vezes os indivíduos a descobrem por acaso, como por exemplo ao realizar uma endoscopia e biópsia por outro motivo (HUSBY et al., 2012; ROSTOM et al., 2006). A forma latente é característica de indivíduos clinicamente assintomáticos com estrutura intestinal normal, em que modificações histológicas em diferentes graus poderão ser ocasionadas por uma dieta contendo glúten, que posteriormente poderá originar a DC, além disso, esses indivíduos são positivos para os alelos de risco do HLA e podem ou não apresentar sintomas e anticorpos específicos para DC (ROSTOM et al., 2006; HUSBY et al., 2012). Por fim, a DC potencial é caracterizada pela presença de anticorpos específicos da DC e alelos de risco do HLA, no entanto, sem anormalidades histopatológicas intestinais onde o indivíduo pode ou não ter manifestações clínicas, e pode ou não vir a desenvolver a doença futuramente (HUSBY et al., 2012).

#### **2.1.6 Doenças relacionadas**

A DC é considerada uma doença sistêmica a qual pertence ao grupo das doenças autoimunes. Nesse contexto, existem relatos de que esta tenha sua prevalência aumentada na presença de outras doenças autoimunes, e isto pode ser justificado pela fisiopatologia em comum entre elas, a qual engloba mecanismos ambientais e genéticos. Dentre essas doenças, destaca-se: hepatite autoimune, diabetes mellitus tipo 1, tireoidite autoimune, dermatite herpetiforme, psoríase, artrite reumatoide, dentre outras (LAURET & RODRIGO, 2013). Também se acredita que a presença de algumas síndromes, a exemplo da síndrome de Down, síndrome de Turner e síndrome de Williams também estejam relacionadas ao aumento da prevalência de DC (PELKOWSKI & VIEIRA, 2014). Além disso, existem outras doenças que são frequentemente encontradas em celíacos, como por exemplo, intolerância à lactose, hipotireoidismo, osteoporose e infertilidade (CASSOL et al., 2007) Estudos também associam a DC, quando não tratada, ao risco do desenvolvimento de malignidades intestinais, a exemplo do carcinoma de intestino e Linfoma intestinal não-Hodgkin (HAN et al., 2015; CASSOL, et al., 2007).

### 2.1.7 Diagnóstico

Calcula-se que apenas 10 a 15% dos celíacos são devidamente diagnosticados, o que provavelmente esteja relacionado às diversas formas clínicas da doença e sintomas semelhantes a outras doenças gastrointestinais (WALKER & TALLEY, 2011). O diagnóstico da DC é feito com base nas manifestações clínicas características da doença, realização de testes sorológicos, testes genéticos e biópsia intestinal (HUSBY et al., 2012).

Alguns testes sorológicos podem ser utilizados como testes iniciais em pacientes com suspeita clínica de DC (KELLY et al. 2015). Os testes sorológicos para anti-gliadina eram frequentemente utilizados como auxiliares no diagnóstico da DC, mas atualmente são pouco empregados por terem sensibilidade e especificidade baixas, estando entre apenas 80% e 90% (ADRIAANSE & LEFFLER, 2015). Por isso os anticorpos anti-transglutaminase (tTG) e anti-endomísio (EMA) são os mais comumente utilizados como testes sorológicos para o diagnóstico da DC (KELLY et al. 2015). A sensibilidade para EMA é superior a 90% e sua especificidade aproximadamente 100%. Este teste é menos sensível em indivíduos que possuem poucas lesões intestinais e em crianças menores de 2 anos de idade, mas mesmo assim, EMA está associado ao desenvolvimento de atrofia de vilosidades, sendo então considerado um bom marcador potencial da DC (ADRIAANSE & LEFFLER, 2015). Já o teste sorológico tTG apresenta sensibilidade e especificidade superiores a 95%, portanto também pode exercer papel no diagnóstico de DC (ADRIAANSE & LEFFLER, 2015)

No que diz respeito aos testes genéticos, a genotipagem de alelos específicos considerados de risco relacionados aos heterodímeros HLA-DQ2 e HLA-DQ8 pode ser realizada. A identificação desses alelos funciona como diagnóstico de análise de risco, uma vez que indivíduos que são negativos para esses alelos apresentarão uma probabilidade reduzida de acometimento da doença. Por isso, esse procedimento pode ser utilizado como primeira opção em indivíduos assintomáticos que apresentam alguma condição relacionada, auxiliando na avaliação da necessidade da realização de exames posteriores (HUSBY et al., 2012). Apesar de ter uma importante associação com a DC, a

presença dos alelos HLA não é suficiente para diagnosticar a DC, tornando indispensável a realização de outros exames (TAYLOR et al., 2015)

A confirmação do diagnóstico de DC somente poderá ser efetuada a partir da realização de endoscopia com biópsia do intestino delgado, a qual é considerada o padrão-ouro no fechamento do diagnóstico da doença (CASSOL et al., 2007). Existem alterações histopatológicas típicas da DC, as quais permitem avaliar o grau de lesão intestinal, podendo ser classificadas segundo Marsh, pelas características atróficas, hiperplásicas e infiltrativas (HUSBY et al., 2012).

### **2.1.8 Tratamento**

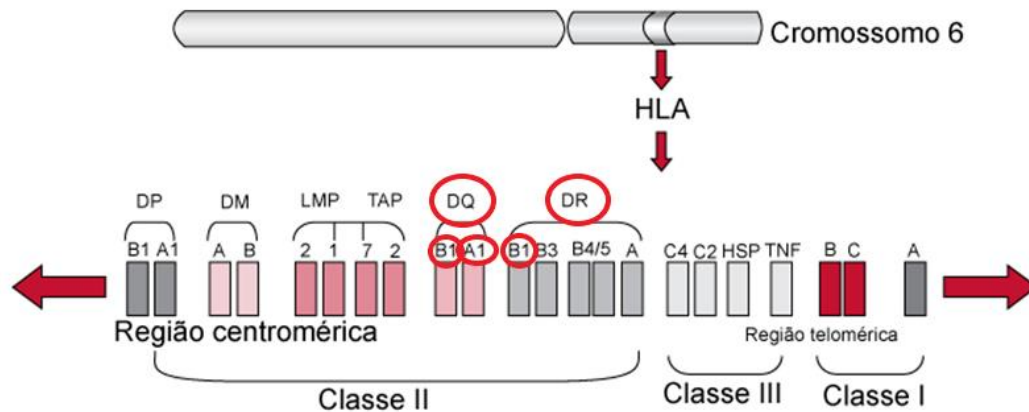
Atualmente, a única forma de tratamento eficaz da DC é a restrição alimentar baseada em uma dieta rigorosamente sem glúten ao longo de toda a vida do paciente celíaco. Para isso, deve-se excluir o trigo, o centeio, a cevada, a aveia e todos os produtos fabricados a partir destes (ARAÚJO et al, 2010). Ressalta-se que pequenas quantidades também são tóxicas, e que este cuidado deve ser estendido até mesmo ao consumo de certos medicamentos que contenham glúten como excipiente (BAI et al., 2013).

A retirada integral do glúten da vida do celíaco ocasiona atenuação dos sintomas, assim como melhora nos níveis sorológicos e padrões histológicos. Cerca de 70% dos indivíduos referem melhora dos sintomas em duas semanas após a implantação da dieta sem glúten (BAI et al., 2013).

## **2.2 Bases Moleculares da Doença**

### **2.2.1 Sistema de Histocompatibilidade**

No braço curto do cromossomo seis (região 6p21.3) existem genes que codificam proteínas que atuam no reconhecimento e apresentação de antígenos, a exemplo das proteínas do sistema HLA- Human Leucocyte Antigen (Antígeno Leucocitário Humano) (LUND et al., 2015; ABADIE et al., 2011).



**Figura 2: Estrutura gênica HLA.** Esquema identificando os genes HLA de classe I, de classe II (DR, DQ e DP) e os de classe III (Adaptado de: SILVA, et al., 2008). Nota: os genes e os alelos destacados contemplam os que foram estudados no presente estudo.

### 2.2.2 Haplótipos

Devido a extrema proximidade dos genes, existe um forte desequilíbrio de ligação entre os genes HLA-DRB, HLA-DQA e HLA-DQB, permitindo que certas combinações de alelos sejam herdadas juntas. O grupamento de alelos existentes no mesmo cromossomo que normalmente são herdados juntos é denominado haplótipo. Os portadores de DQ8, por exemplo, geralmente apresentam o haplótipo DR4, carregando os alelos DRB1\*04 – DQA1\*03:01 – DQB1\*03:02. Já os portadores de DQ2, por sua vez, podem possuir três haplótipos: 1) haplótipo DR3, quando herdado em sua conformação *cis* (ambos genes no mesmo cromossomo), carregando os alelos DRB1\*03:01 – DQA1\*05:01 – DQB1\*02:01, que codificam o heterodímero DQ2.5; 2) haplótipo DR7, quando adquirido na conformação *cis* transportando os alelos DRB1\*07 – DQA1\*02:01 – DQB1\*02:02, que codificam o heterodímero DQ2.2; e 3) haplótipo DR5 + DR7, presente na configuração *trans* (genes localizados em cromossomos homólogos distintos), transportando os alelos DRB1\*11/12 – DQA1\*05:05 – DQB1\*03:01 – DRB1\*07 – DQA1\*02:01 – DQB1\*02:02, que também codificam para o heterodímero DQ2.5 (ABADIE et al., 2011; MEGIORNI & PIZZUTI, 2012).

### 2.2.3 Heterodímeros HLA-DQ2 e HLA-DQ8

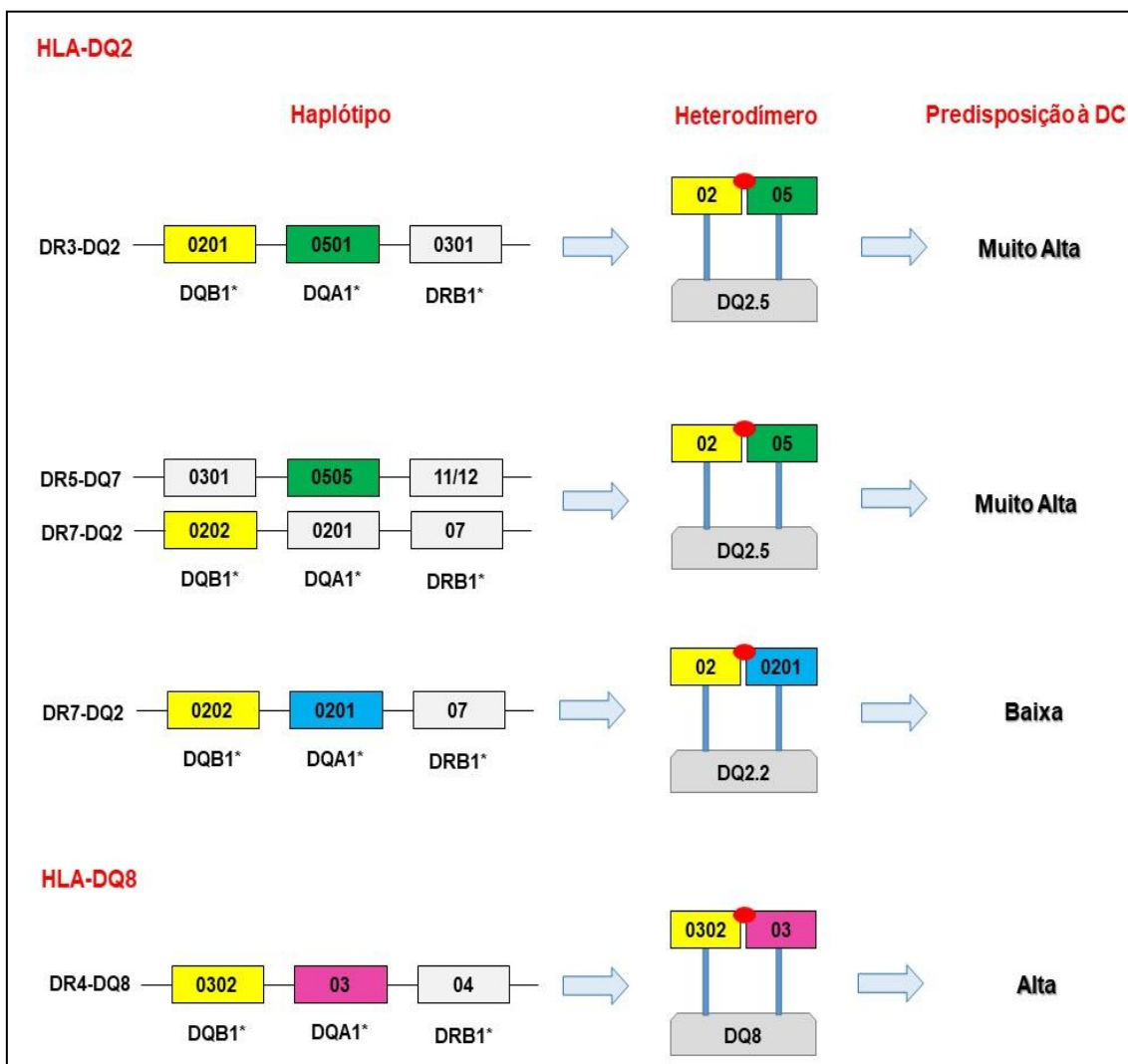
Os principais genes determinantes da suscetibilidade genética para a DC estão localizados na região do HLA de classe II. A proteína HLA-DQ é formada por duas cadeias diferentes ( $\alpha$  e  $\beta$ ), sendo necessária a expressão dos dois genes (HLA-DQA e HLA-DQB) para a produção de um heterodímero (ABADIE et al., 2011; POLLO et al., 2013).

Variações dos alelos localizados na região do HLA são responsáveis por 40% do risco genético de manifestação da DC (RUIZ-ORTIZ et al., 2014). Dentro dessa região, os alelos de risco que possuem maior relação com a DC são os relacionados ao heterodímero HLA-DQ2 (codificado pelos alelos DQA1\*0501 e DQB1\*0201), os quais estão presentes na maioria dos indivíduos afetados pela doença (90%), e ao HLA-DQ8 (codificado pelos alelos DQA1\*0301 e DQB1\*0302) que é encontrado em 5% destes pacientes. Destaca-se também que cerca de 5% dos celíacos transportam somente um dos dois alelos de risco do HLA-DQ2 (geralmente o DQB1 \* 0201), sendo considerados “meio HLA-DQ2 positivos” (LIONETTI et al., 2014; TAYLOR et al., 2015). Estima-se que esses alelos estejam presentes em 30 % da população em geral, no entanto, menos de 3% vem a desenvolver a doença (TAYLOR et al., 2015).

Existem outros alelos envolvidos com a DC e que estão fora do sistema HLA, chamados não-HLA. Estes representam 60% do risco genético para o desenvolvimento da doença. No entanto, devido ao grande número de genes envolvidos, a contribuição de cada variação para a herdabilidade da DC é muito baixa quando comparada aos componentes do HLA (SHUMANN et al., 2017).

### 2.2.4 Gradiente de risco

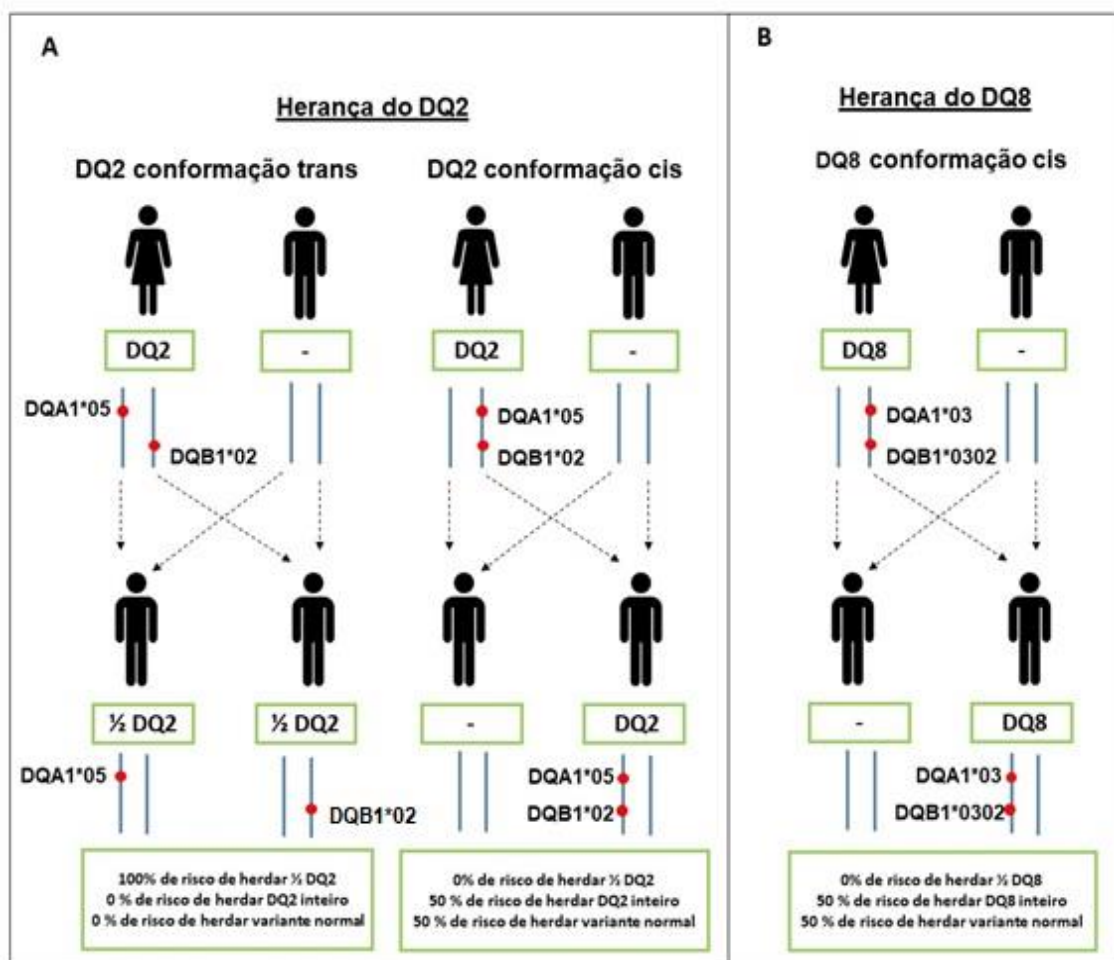
A predisposição à DC depende da expressão de heterodímeros, conforme apresentado na figura 3.



**Figura 3: Gradiente de risco para o desenvolvimento da DC.** O HLA-DQ2 é o principal fator de risco genético relacionado à DC. A maioria dos pacientes celíacos expressam o heterodímero HLA-DQ2.5, o qual é codificado pelos alelos HLA-DQA1\*0501 e HLA-DQB1\*0201. Esses alelos são transportados em cis no haplótipo DR3-DQ2 ou em trans nos haplótipos DR5-DQ7 e DR7-DQ2. O HLA-DQ2.2, outra variante da molécula HLA-DQ2 (codificado pelos alelos HLA-DQA1\*0201 e HLA-DQB1\*0201), configuram um baixo risco para o desenvolvimento da DC. Além disso, os pacientes celíacos podem ser portadores da isoforma de risco do HLA-DQ8, cujos alelos estão no haplótipo DR4-DQ8, e que configuram um alto risco para DC (Adaptado de ABADIE et al., 2011).

### 2.3 Relação da doença celíaca com parentes de primeiro grau de celíacos

O fato de um indivíduo ser parente de primeiro grau (pais, irmãos e filhos) de um celíaco, faz com que este já possua um risco aproximado de 5 a 20% para também desenvolver a doença. Esses dados são adequados quando os alelos HLA relacionados à DC não são conhecidos nos celíacos (TAYLOR et al., 2015). Quando os alelos associados à DC são identificados nos celíacos, as estimativas do risco de DC para esses familiares aumentam, conforme apresentado na figura 3.



**Figura 4: Herança dos alelos HLA-DQ2 e DQ8.** Modos de hereditariedade da suscetibilidade à DC relacionada ao DQ2 (A) e ao DQ8 (B), em famílias nas quais um dos progenitores possui o respectivo alelo HLA suscetível à doença e o outro não possui a respectiva suscetibilidade. (Adaptado de TAYLOR et al, 2015).

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Verificar a frequência dos alelos de risco dos complexos HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) e HLA-DQ8 (DRB1\*04) e associar com a presença de sintomas e doenças relacionadas à DC em parentes de primeiro grau de celíacos no sul do Brasil.

#### **3.2 Objetivos específicos**

Caracterizar a amostra em relação à cidade e estado de origem, idade, sexo, cor da pele e parentesco com celíacos;

Verificar a frequência dos alelos de risco relacionadas aos complexos HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) e HLA-DQ8 (DRB1\*04) nos parentes de primeiro grau de celíacos;

Associar esses alelos aos sintomas típicos de DC nos parentes de primeiro grau de celíacos;

Correlacionar os alelos estudados à presença de doenças associadas à DC;

Orientar os indivíduos que apresentarem os alelos DQA1\*0501 e DQB1\*0201 e/ou DRB1\*04 a buscarem auxílio médico para a investigação, acompanhamento e verificação de um possível diagnóstico de DC.



## **4 Materiais e Métodos**

### **4.1 População alvo e aspectos éticos**

Trata-se de um estudo descritivo, do tipo transversal, que foi realizado nas cidades de Florianópolis e Blumenau, no estado de Santa Catarina e, nas cidades de Porto Alegre, Pelotas, Rio Grande e Santa Maria, no estado do Rio Grande do Sul.

Para inclusão no estudo, o indivíduo deveria ser livre do diagnóstico da DC e parente de primeiro grau (pais, irmãos ou filhos) de celíacos comprovadamente diagnosticados por biópsia do intestino delgado. O tamanho da amostra foi calculado utilizando o programa GPower®, com nível de confiança de 95%, sendo obtida uma amostra de conveniência (mínima) de 220 indivíduos.

Os indivíduos foram convidados a participar da pesquisa através de meios de comunicação, a exemplo das redes sociais e sites da Associação do Celíacos do Brasil do Estado de Santa Catarina (ACELBRA-SC) e do Estado do Rio Grande do Sul (ACELBRA-RS), assim como cartazes fixados em estabelecimentos que comercializavam produtos sem glúten. Após o convite, as coletas foram realizadas na ACELBRA-SC (Florianópolis) mediante assinatura do responsável pela mesma, de um ofício autorizando a realização da pesquisa (Apêndice A) e no Hippo Supermercados (Florianópolis/SC), Consultório H2O Nutrição (Blumenau/SC), Confraria Kero Food Truck (Porto Alegre/RS), Hospital Universitário Dr Miguel Riet Corrêa Jr. (Rio Grande/RS), Academia Keep Training (Pelotas/RS) e Armazém da Saúde (Santa Maria/RS), também mediante autorização prévia dos responsáveis pelos mesmos.

Os pesquisadores responsáveis explicaram o objetivo, as etapas e retorno do estudo aos participantes. Foi esclarecido que a confidencialidade para manter a privacidade dos sujeitos será mantida em sigilo e os resultados serão somente utilizados para fins de pesquisa. Também foi informado de que não existem riscos no estudo e o benefício em participar da pesquisa foi que os indivíduos conheceram de forma gratuita o seu perfil genético para os alelos HLA associados à DC, receberam orientações e foram encorajados a buscar auxílio médico para investigação de um possível diagnóstico de DC, ou seja, a consulta com o médico foi recomendada e não fez parte do estudo, ficando a critério dos indivíduos, pais ou responsáveis pela criança/adolescente investigar a

possibilidade da doença. Adicionalmente, os resultados poderão auxiliá-los na prevenção dos agravos da DC, além de que os resultados serão incorporados ao conhecimento científico e posteriormente a situações de ensino-aprendizagem, além de contribuir para uma proposta de maior divulgação da DC em nossa região.

A participação dos indivíduos no estudo foi de forma voluntária, onde todos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), concordando em participar da pesquisa (Apêndices B e C).

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas, sob número de CAAE: 62209416.4.0000.5317, e de acordo com as normas estabelecidas pela Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012, 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 (Anexos A e B).

A pesquisa e coleta de dados foi realizada após aprovação do projeto pelo CEP e assinatura do TCLE pelos participantes. 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 científicas envolvendo seres humanos e em utilizar o material de dados obtidos na pesquisa exclusivamente para a finalidade prevista ou conforme o consentimento do participante.

## **4.2. Rastreamento de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8**

### **4.2.1 Coleta de material**

Todos os parentes de primeiro grau dos celíacos que concordaram em participar do estudo e que assinaram o TCLE, tiveram suas células da mucosa bucal coletadas em local previamente estabelecido, como citado anteriormente no item 4.1. Para a coleta de células da mucosa bucal, o indivíduo foi solicitado previamente a fazer um enxágue bucal com água mineral, a fim de reduzir a presença de DNA bacteriano e resíduos alimentares. Posteriormente, utilizando um *swab* estéril, esfregou-se várias vezes entre as duas bochechas do participante. Após a coleta, o *swab* foi embalado e identificado com o número do

indivíduo, guardado diretamente em gelo e armazenado em caixa térmica, para posterior transporte ao laboratório de Nutrifisiogenômica da Faculdade de Nutrição da UFPel, onde foram realizadas as análises. Esse procedimento de coleta de saliva foi realizado em duplicata para eventuais necessidades de repetir as análises.

Além disso, foi aplicado um questionário com questões sociodemográficas e de saúde aos participantes do estudo (Apêndice D). O questionário foi elaborado pelos responsáveis pela pesquisa, realizando adaptações no questionário utilizado por Cassol et al. (2007) que avaliou o perfil clínico dos membros da ACELBRA-SC.

#### **4.2.2 Extração do gDNA**

A extração do gDNA foi uma adaptação do método descrito por MILLER, DYKES e POLESKY (1988), realizada da seguinte forma: o swab foi colocado em um tubo de eppendorf de 1,5 mL contendo 300 µL de EAR Buffer (Protocolo para volume final de 1 litro do EAR Buffer: 100 mL de Tris HCl 1 M pH 8,5; 10 mL de EDTA 0,5 M pH 8; 2 g de SDS – Dodecil Sulfato de Sódio – mais 11,7 g de NaCl e o restante de água destilada) e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL), posteriormente levado ao agitador de soluções tipo vórtex (Phoenix Luferco modelo AP56) e incubado em banho seco (WR Research) a temperatura de 55°C por no mínimo 4 horas. Após este período, o tubo foi agitado no vórtex e resfriado no gelo por 5 minutos e em seguida inverteu-se o swab. Após, o tubo foi levado à centrífuga (Microcentrífuga digital de bancada da Nova instruments modelo NI 1808), a 15000 rpm/1 min, feito isso, retirou-se o swab. Em seguida, adicionou-se 100 µL de solução de precipitação de proteínas gelada (Protocolo para volume final de 1 litro: 490,7 g de acetato de potássio, 115 mL de ácido acético e o restante de água destilada) o tubo foi agitado no vórtex e levado a centrífuga a 13500 rpm/ 5 min, sendo obtido o sobrenadante, o qual foi transferido para um novo tubo contendo 400 µL de isopropanol 100%, posteriormente foi agitado manualmente e mantido a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, levou-se o tubo à centrífuga a 13500 rpm/ 5 min, feito isso, descartou-se o sobrenadante e lavou-se o pellet uma vez com 500 µL de etanol 70%, após, foi novamente centrifugado a 13500 rpm/ 5 min. A seguir, o pellet foi secado, 15

minutos no papel e 10 minutos no banho seco com os tubos abertos. Finalmente, o pellet foi ressuspensionado em 50  $\mu$ L de TE Buffer (Protocolo para volume final de 1 litro: 100 mL de Tris HCl 100 mM pH 7,4; 2 mL de EDTA 0,5 M pH 8 e o restante de água destilada) agitado em vórtex, e mantido no banho seco por 15 minutos. Após o processo de extração, as amostras foram mantidas refrigeradas até o momento da amplificação do DNA.

Dessa amostra, de 1 a 5  $\mu$ L foram suficientes para a realização da análise dos alelos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando *primers* específicos para o reconhecimento de alelos da DC.

#### 4.2.3 Amplificação do DNA (PCR)

Para comprovar a presença de DNA nas amostras extraídas, realizou-se PCR com o gene controle da alfa-actinina isoforma do músculo esquelético 3 (ACTN3) baseando-se no método utilizado por Schadock et al. (2015). Foram feitas algumas adaptações a partir do protocolo original.

Os alelos amplificados neste estudo foram DQA1\*0501, DQB1\*0201 (HLA-DQ2) e DRB1\*04 (HLA-DQ8). A amplificação do DNA foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), com adaptações do método proposto por SACCHETTI et al., (1997). Para isso, na primeira reação (mix 1) utilizou-se 10  $\mu$ L de GoTaq (PROMEGA, USA), 4  $\mu$ L do mix de primers DQA1\*0501 e DQB1\*0201 na concentração de 5 pmol, 4  $\mu$ L de água ultrapura e 2  $\mu$ L da amostra de DNA, já na segunda reação (mix 2) foi utilizado 10  $\mu$ L de GoTaq, 2  $\mu$ L do mix de primers DRB1\*04 na concentração de 5 pmol, 6  $\mu$ L de água ultrapura e 2  $\mu$ L da amostra de DNA. Para amplificação do DNA, as reações foram levadas ao Termociclador (Amplitherm) com temperatura inicial de 95°C/5 min, desnaturação a 94°C/ 20 seg, anelamento a 56°C/ 10 seg, extensão a 72°C/ 20 seg, e extensão final de 72°C/5min, repetidos em 35 ciclos, para obtenção do produto da PCR.

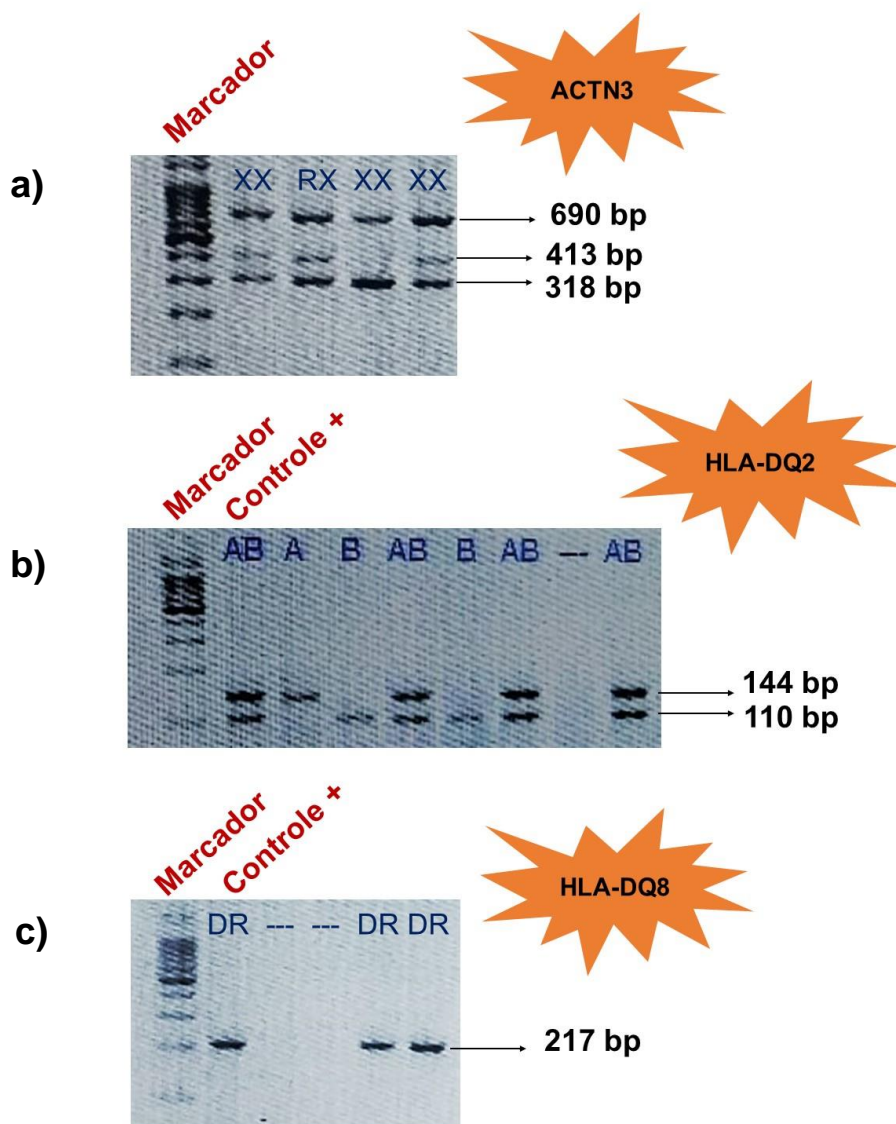
Para confirmação do tamanho do fragmento amplificado, 10 $\mu$ L do produto da PCR foram aplicados em gel de agarose 3% e SYBR® Safe (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA), submetidos à eletroforese horizontal em tampão de corrida TBE 1X (50 mL TBE 10X e 450 mL de água destilada. Protocolo TBE 10X para volume final de 1 litro: 108 g de Tris Base 890 mM, 55 g de ácido bórico

890 mM, 40 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 20 mM e o restante de água destilada). Como marcador de peso molecular, utilizou-se 4 µL de marcador de 100 bp (PROMEGA, USA). A visualização do DNA foi realizada em transiluminador com luz ultravioleta (WR Research) e pelo fotodocumentador LabWorks 4.6 (LabWorks Inc., USA) para visualização das bandas e seus tamanhos.

**Tabela 1:** Característica dos *primers* utilizados na PCR.

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>	<b>Comprimento dos produtos da PCR</b>
hDQA10501f	5'-AGCAGTTCTACGTGGACCTGGGG-3'	144 bp
hDQA10501r	5'-GGTAGAGTTGGAGCGTTTAATCAGA-3'	
hDQB10201f	5'-CGCGTGCGTCTTGTGAGCAGAAG-3'	110 bp
hDQB10201r	5'-GGCGGCAGGCAGCCCCAGCA-3'	
hDRB104f	5'-GGTTAAACATGAGTGTCAATTTCTTAAAC-3'	217 bp
hDRB104r	5'-GTTGTGTCTGCAGTAGGTGTC-3'	
hACTN3f	5'-CGCCCTTCAACAACCTGGCTGGA-3'	690 bp
hACTN3r	5'-GATGAGCCCGAGACAGGCAAGG-3'	
hACTN3Tif	5'-CAACACTGCCCGAGGCTGACTG-3'	318 bp
hACTN3Cir	5'-CATGATGGCACCTCGCTCTCGG-3'	413 bp

bp = pares de base; hDQA10501f, hDQA10501r, hDQB10201f e hDQB10201r para HLA-DQ2; hDRB104f e hDRB104r para HLA-DQ8. [Adaptado de SACCHETTI et al., 1997]; hACTN3f, hACTN3r, hACTN3Tif e hACTN3Cir para ACTN3 (gene controle) [Adaptado de SCHADOCK et al., 2015].



**Figura 5: Análise dos resultados da genotipagem por eletroforese.** a) gel de agarose 2% identificando o polimorfismo ACTN3 r577x como gene controle. b) gel de agarose 3% mostrando os alelos de risco para o complexo HLA-DQ2, onde a banda de 144 bp indica o alelo DQA1\*05, e a banda de 110 bp o alelo DQB1\*02. Na parte superior dessa imagem, encontra-se o diagnóstico da genotipagem para os alelos de risco: subunidade alfa (A) e beta (B), assim como os resultados negativos (-). c) gel de agarose 3% demonstrando o alelo DRB1\*04 do complexo HLA-DQ8 (DR) com a banda de 217 bp e os negativos (-). Na primeira coluna de cada imagem se tem o marcador comercial da PROMEGA (USA) de 100 bp.

#### **4.2.4 Retorno dos resultados aos participantes**

Ao concluir as análises em laboratório, todos os participantes receberam individualmente, via e-mail, dois arquivos no formato “pdf”, um contendo o resultado da genotipagem dos alelos e outro com as orientações acerca da interpretação do mesmo (Apêndices E e F). Na descrição do resultado foi colocado os três alelos com seus respectivos resultados (positivo ou negativo) e abaixo a especificação do método de PCR empregado, destacando que na comparação de métodos distintos poderá haver discrepâncias, devido a diferentes frequências de resultados falso positivo ou falso negativo inerentes de cada método. Os indivíduos positivos para algum dos alelos estudados foram encorajados a buscar auxílio médico para realização de outros exames para verificar a possível ocorrência da doença e seguir em acompanhamento médico ao longo da vida.

#### **4.3 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada no programa estatístico STATA versão 12.0. A frequência das variáveis de caracterização da amostra, assim como a frequência dos alelos de risco relacionados aos complexos HLA-DQ2 e HLA-DQ8, sintomas e doenças relacionadas à DC foram expressas em percentuais. Para verificar a associação entre os alelos de risco e sintomas relativos à DC, assim como a associação entre os alelos e doenças relacionadas à DC, foi utilizado o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) de Pearson. O nível de significância estabelecido foi de  $p < 0,05$ . Após a identificação de significância estatística, realizou-se um pós-teste com teste de Qui-quadrado de Pearson a fim de verificar qual perfil/alelo esteve efetivamente associado com as variáveis sintomas e doenças relacionadas.

## 5 Resultados

### 5.1 Descrição da amostra

A amostra obtida no presente estudo foi de 224 indivíduos, com média de idade de  $34,8 \pm 23,5$  anos, sendo mais prevalente indivíduos adultos (44,2%) (tabela 2). A amostra foi constituída nos estados de Santa Catarina (47,8%) e Rio Grande do Sul (52,2%), conforme apresentado na tabela 2.

**Tabela 2:** Caracterização da amostra em relação à cidade, estado de origem, sexo, cor da pele, distribuição por idade e parentesco com indivíduos celíacos (n=224).

		<b>n</b>	<b>Percentual</b>
<b>Cidade de origem</b>	Blumenau	24	10,7%
	Florianópolis	83	37,1%
	Pelotas	18	8,0%
	Porto Alegre	81	36,2%
	Rio grande	13	5,8%
	Santa Maria	5	2,2%
<b>Estado de origem</b>	Rio Grande do Sul	117	52,2%
	Santa Catarina	107	47,8%
<b>Sexo</b>	Feminino	129	57,6%
	Masculino	95	42,4%
<b>Cor da pele</b>	Branca	213	95,1%
	Parda	11	4,9%
<b>Distribuição por idade (anos)</b>	0 a 10	51	22,8%
	11 a 20	27	12,1%
	21 a 59	99	44,2%
	60 ou +	47	20,9%
<b>Parentesco</b>	Filhos	70	31,3%
	Irmãos	53	23,7%
	Pais	101	45,0%

Ao analisar a frequência de indivíduos oriundos do estado de Santa Catarina, percebe-se que a maioria residia na cidade de Florianópolis (37,1%). Já no estado do Rio Grande do Sul, houve predominante participação de indivíduos de Porto Alegre (36,2%, Tabela 2). Da população estudada, a maioria



foi de cor branca (95,1%), do sexo feminino (57,6%) e, em relação ao parentesco, pais de celíacos (45,0%, Tabela 2).

No que diz respeito à restrição de glúten (tabela 3), 31,2% dos participantes referiram praticá-la, onde, 24,2% realizavam de forma parcial, pois evitavam consumir alimentos que contêm glúten apenas em casa, devido à possível contaminação cruzada para seus parentes celíacos. A restrição completa de glúten foi relatada por 6,2% dos participantes a fim de se obter melhora nos sintomas associados à DC, dessa forma, esses indivíduos foram excluídos da análise para frequência de sintomas. Adicionalmente, 2,7% dos participantes nunca tiveram contato com o glúten por se tratarem de crianças em aleitamento materno exclusivo.

A maioria dos indivíduos relatou algum tipo de sintoma relacionado à DC (67,6%), sendo a distensão abdominal (33,8%) e a dor abdominal (23,0%) os sintomas gastrointestinais mais frequentes. Quanto aos sintomas extraintestinais, os mais descritos foram lesões de pele (14,8%) e dores de cabeça/enxaqueca (13,8%). Os demais sintomas estudados estão descritos na Tabela 3.

Quanto às doenças que estão normalmente associadas à DC, 40,6% dos participantes referiram apresentar ao menos uma delas, sendo as mais frequentemente descritas: intolerância à lactose (18,3%), hipotireoidismo (11,2%), osteoporose (8,5%) e artrite reumatoide (7,6%; Tabela 3).

**Tabela 3:** Restrição de glúten, presença de sintomas e doenças relacionadas à Doença Celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos (n=224).

Restrição de glúten n (%)		Sintomas n (%)		Doenças relacionadas n (%)	
Frequência geral	68 (31,2)	Frequência geral	142 (67,6)	Frequência geral	91 (40,6)
Restrição parcial	54 (24,2)	Dor abdominal	48 (23,0)	Intolerância à lactose	41 (18,3)
Restrição total	14 (6,2)	Distensão abdominal	71 (33,8)	Osteoporose	19 (8,5)
Ainda não introduziu glúten na dieta	6 (2,7)	Diarreia	26 (12,4)	Hipotireodismo	25 (11,2)
		Constipação	30 (14,3)	Artrite reumatoide	17 (7,6)
		Dificuldade em ganhar peso	18 (8,6)	Infertilidade	4 (1,8)
		Dificuldade em ganhar altura	8 (3,8)	Abortos	6 (2,7)
		Emagrecimento	11 (5,2)	APLV	6 (2,7)
		Anemia	18 (8,6)	DM1	1 (0,5)
		Dor de Cabeça ou enxaqueca	29 (13,8)	Autismo	1 (0,5)
		Lesões de pele	31 (14,8)	Lúpus	1 (0,5)
				Tireoidite de Hashimoto	2 (0,9)
				Dermatite Herpetiforme	3 (1,3)

APLV: alergia à proteína do leite de vaca; DM 1: Diabetes Mellitus tipo 1. Frequência geral se refere ao total de relatos de cada item estudado.

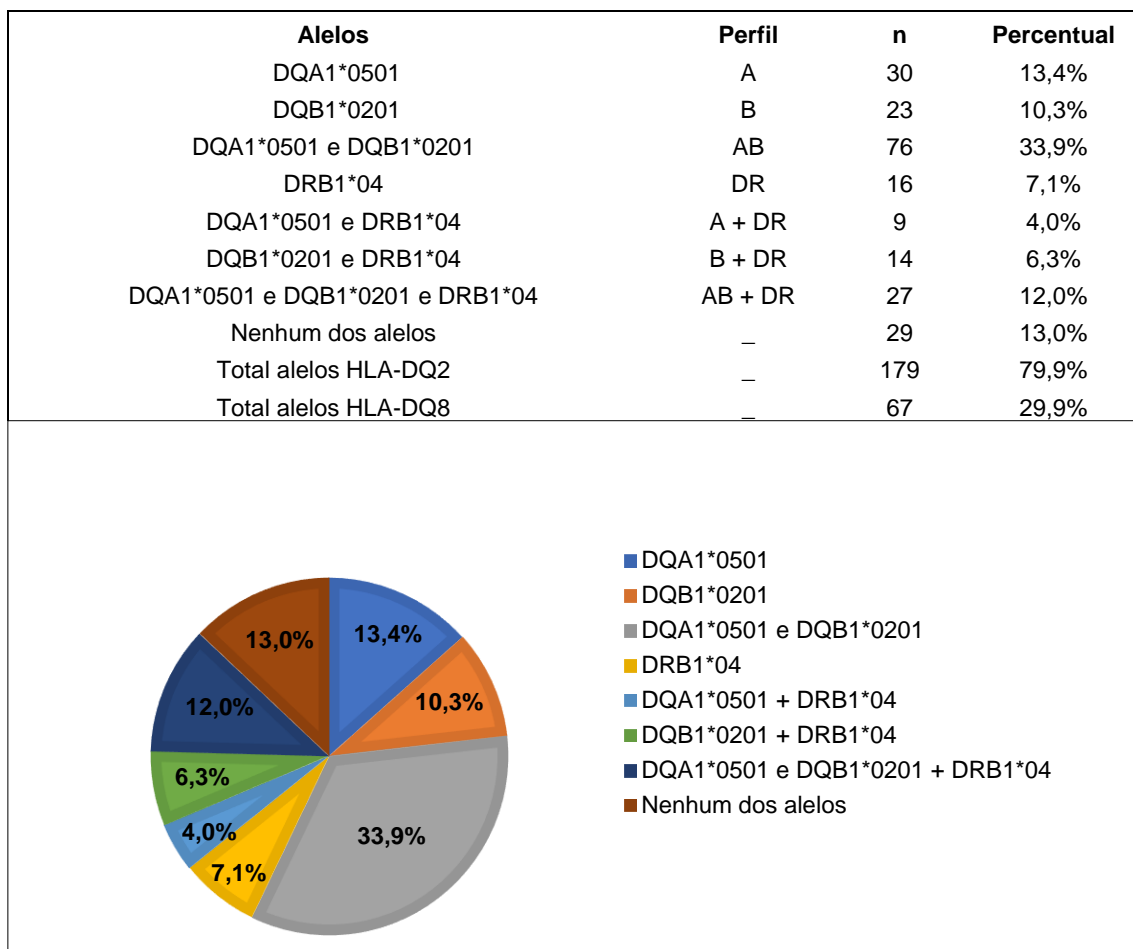
Além disso, destaca-se que 47,3% dos participantes referiram suspeitar de ter a doença, e que segundo os mesmos, isso se deve à presença de sintomas característicos da doença ou devido ao familiar ser celíaco. Considerando essa suspeita, os indivíduos foram questionados sobre a realização de exames que auxiliam no diagnóstico da DC, onde então 43,8% referiram já ter realizado algum destes, sendo os exames mais citados: sorológicos constituindo de anticorpos anti-transglutaminase (tTG) (29,9%), anticorpos anti-endomísio (EMA) (22,8%) seguidos por biópsia do intestino delgado (19,2%) (Tabela 4). Ressalta-se que os resultados foram predominantemente normais.

**Tabela 4:** Percentual de realização de exames relacionados à Doença Celíaca e resultado, em parentes de primeiro grau de celíacos (n=98)

Exames	n (%) de realização	Resultado n (%)	
		Normal	Alterado
Anticorpos anti-transglutaminase (tTG)	67 (29,9)	65 (97,0)	2 (3,0)
Anticorpos anti-endomísio (EMA)	51 (22,8)	48 (94,1)	3 (5,9)
Anticorpos anti-gliadina (GLI)	14 (6,3)	11 (78,6)	3 (21,4)
Biópsia do intestino delgado	43 (19,2)	43 (100,0)	0 (0,0)
Genotipagem dos alelos HLA-DQ2	15 (6,7)	6 (40,0)	9 (60,0)
Genotipagem dos alelos HLA-DQ8	12 (5,4)	9 (75,0)	3 (25,0)

## 5.2 Distribuição genotípica

Em relação à distribuição dos alelos de risco relacionados ao sistema HLA, 87,0% dos indivíduos apresentaram ao menos um desses alelos, sendo que 79,9% foram positivos para os alelos de risco do HLA-DQ2 e 29,9% para o HLA-DQ8. Apenas 13,0% dos indivíduos foram negativos para todos os alelos estudados. Os percentuais obtidos para a presença de cada alelo e perfil genético dos indivíduos estão representados na figura 6.



**Figura 6: Frequência dos alelos de risco relacionados ao HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em parentes de primeiro grau de celíacos (n=224).** O perfil genético foi descrito no painel superior e representado como A, B ou AB para a presença de um ou dois dos alelos de risco para DQ2, e como DR para a presença do alelo de risco para DQ8. Também foram descritos os indivíduos negativos para todas as análises, mas que foram positivos para os genes usados como controle quanto a avaliação da qualidade da amostra de DNA extraída das células bucais. O painel inferior ilustra a distribuição do perfil genético descrito na tabela do painel superior.

### 5.3 Associações do genótipo com sintomas relatados

Comparando os perfis genéticos com o total de relatos de sintomas relacionados à DC foi observado que no perfil DQ2 exclusivo os portadores do perfil chamado aqui de AB [presente no haplótipo DR3-DQ2 (configuração CIS) ou DR5-DQ7+DR7-DQ2 (configuração TRANS)] relataram mais frequentemente

a presença de algum dos sintomas relacionados à DC (78,4%;  $p=0,003$ ; Tabela 5).

Ao comparar o perfil genético com a presença de sintomas relacionados à DC, foi observado maior frequência de distensão abdominal no perfil "AB" ( $p=0,006$ ). O mesmo ocorreu ao avaliar os alelos DQA1\*0501 e DQB1\*0201 no perfil DQ2 exclusivo ( $p=0,003$ ). Ao verificar os demais sintomas, não foi encontrada diferença (Tabela 5).

**Tabela 5:** Relação do perfil genético com sintomas associados à Doença Celíaca, em parentes de primeiro grau de celíacos (n=210).

Perfil genético detalhado	Frequência total perfil genético n (%)	Sintomas n (%)														
		GI	EI	Totais	Valor P pós-teste	Dor abdominal	Distensão abdominal	Valor P pós-teste	Diarreia	Constipação	Dificuldade em ganhar peso	Dificuldade em ganhar altura	Emagrecimento	Anemia	Dor de cabeça / enxaqueca	Lesões de pele
A	26 (12,4)	9 (34,6)	13 (50,0)	16 (61,5)		5 (19,2)	4 (15,4)	0,05	2 (7,7)	3 (11,5)	6 (23,1)	2 (7,7)	0 (0,0)	1 (6,9)	4 (15,4)	2 (7,7)
B	21 (10,0)	7 (33,3)	8 (38,1)	11 (52,4)		4 (20,0)	3 (14,3)	0,05	4 (19,1)	1 (4,8)	3 (14,3)	1 (4,8)	1 (4,8)	0 (0,0)	3 (14,3)	1 (4,8)
AB	71 (33,8)	35 (49,3)	34 (47,9)	57 (80,3)		19 (26,8)	33 (46,5)	<b>0,006</b>	9 (12,7)	15 (21,1)	3 (4,2)	3 (4,2)	6 (8,5)	11 (15,5)	10 (14,1)	12 (16,9)
DR	15 (7,1)	9 (60,0)	3 (20,0)	9 (60,0)		4 (26,7)	8 (53,3)	0,15	2 (13,3)	1 (6,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (6,7)	1 (6,7)	3 (20,0)
A + DR	9 (4,3)	2 (22,2)	3 (33,3)	4 (44,4)	–	2 (22,2)	2 (22,2)	0,72	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (11,1)	0 (0,0)	2 (22,2)	0 (0,0)
B + DR	15 (7,1)	7 (46,7)	6 (40,0)	9 (60,0)		5 (33,3)	4 (26,7)	0,78	4 (26,7)	1 (6,7)	2 (14,3)	1 (6,7)	1 (6,7)	1 (6,7)	3 (20,0)	4 (26,7)
AB + DR	26 (12,4)	17 (65,4)	10 (38,5)	19 (73,1)		8 (30,8)	10 (38,5)	0,66	4 (15,4)	3 (11,5)	3 (11,5)	0 (0,0)	2 (7,7)	2 (7,7)	0 (0,0)	4 (15,4)
Negativo	27 (12,9)	10 (37,0)	13 (48,2)	17 (62,9)		1 (3,7)	7 (25,9)	0,39	1 (3,7)	6 (22,2)	1 (3,7)	1 (3,7)	0 (0,0)	2 (7,4)	6 (22,2)	5 (18,5)
valor P		0,14	0,59	0,10		0,29	<b>0,02</b>	–	0,37	0,26	0,06	0,84	0,51	0,32	0,38	0,45
<b>Perfil DQ2 exclusivo</b>																
A	35 (16,7)	11 (31,4)	16 (47,5)	20 (57,1)	0,24	7 (20,0)	6 (17,1)	<b>0,03</b>	2 (5,7)	3 (8,6)	6 (17,1)	2 (5,7)	1 (2,9)	1 (2,9)	6 (17,1)	2 (5,7)
B	36 (17,1)	14 (38,9)	14 (38,9)	20 (55,6)	0,12	9 (25,7)	7 (19,4)	0,05	8 (22,2)	2 (5,6)	5 (13,9)	2 (5,6)	2 (5,6)	1 (2,8)	6 (16,7)	5 (13,9)
AB	97 (46,2)	52 (53,6)	44 (45,4)	76 (78,4)	<b>0,003</b>	27 (27,8)	43 (44,3)	<b>0,003</b>	13 (13,4)	18 (18,6)	6 (6,2)	3 (3,1)	8 (8,3)	13 (13,4)	10 (10,3)	16 (16,5)
Negativo	42 (20,0)	19 (45,2)	16 (38,1)	26 (61,9)	0,38	5 (11,9)	15 (33,8)	0,87	3 (7,1)	7 (16,7)	1 (2,4)	1 (2,4)	0 (0,0)	3 (7,1)	7 (16,7)	8 (19,1)
valor P		0,11	0,81	<b>0,02</b>	–	0,21	<b>0,006</b>	–	0,12	0,19	0,06	0,80	0,21	0,11	0,60	0,37
<b>Perfil DQ8 exclusivo</b>																
DR	65 (31,0)	35 (53,9)	22 (33,9)	41 (63,1)		19 (29,2)	24 (36,9)		10 (15,4)	5 (7,7)	5 (7,7)	1 (1,5)	4 (6,2)	4 (6,2)	6 (9,2)	11 (16,9)
Negativo	145 (69,0)	61 (42,1)	68 (46,9)	101 (69,7)	–	29 (20,1)	57 (32,4)	–	16 (11,0)	25 (17,2)	13 (9,0)	7 (4,8)	7 (4,8)	14 (9,7)	23 (15,9)	20 (13,8)
valor P		0,11	0,08	0,35		0,15	0,52		0,38	0,07	0,76	0,25	0,69	0,40	0,20	0,55

A = alelo DQA1\*0501 (DQ2 -  $\alpha$ ); B = alelo DQB1\*0201 (DQ2 -  $\beta$ ); AB = alelos DQA1\*0501 e DQB1\*0201 (DQ2 -  $\alpha\beta$ ); DR = alelo DRB1\*04 (DQ8); A + DR = alelos DQA1\*0501(DQ2 -  $\alpha$ ) e DRB1\*04 (DQ8); B + DR = alelos DQB1\*0201 (DQ2 -  $\beta$ ) e DRB1\*04 (DQ8); AB + DR = alelos DQA1\*0501 e DQB1\*0201 (DQ2 -  $\alpha\beta$ ) e DRB1\*04 (DQ8); GI = gastrointestinais; EI = extraintestinais.

#### **5.4 Associações dos genótipos com doenças relacionadas à DC**

Quando analisadas as distribuições no perfil DQ8 exclusivo, os portadores do alelo DRB1\*04, presente no haplótipo DR4-DQ8, apresentam maior frequência de osteoporose (~3 vezes,  $p=0,02$ ) e hipotireoidismo (~2 vezes,  $p=0,04$ ) comparando com não portadores (Tabela 6). Não foram encontradas diferenças nas distribuições do perfil genético detalhado e do perfil DQ2 comparado com a presença de doenças relacionadas à DC.

**Tabela 6:** Relação do perfil genético com a presença de doenças relacionadas à Doença Celíaca, em parentes de primeiro grau de celíacos (n=224).

Perfil genético detalhado	Frequência total perfil genético n (%)	Doenças relacionadas n (%)												
		Frequência total	Intolerância à lactose	Osteoporose	Hipotireoidismo	Artrite reumatoide	Infertilidade	Abortos	APLV	DM 1	Autismo	Lúpus	Tireoidite de Hashimoto	Dermatite Herpetiforme
A	30 (13,4)	15 (50,0)	7 (23,3)	4 (13,3)	4 (13,3)	1 (3,3)	0 (0,0)	1 (3,3)	2 (6,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
B	23 (10,3)	9 (39,1)	7 (30,4)	2 (8,7)	3 (13,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (4,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
AB	76 (33,9)	32 (42,1)	14 (18,4)	3 (3,9)	5 (6,6)	9 (11,8)	2 (2,6)	4 (5,3)	3 (3,9)	0 (0,0)	1 (1,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (2,6)
DR	16 (7,1)	7 (43,7)	3 (18,7)	3 (18,7)	4 (25,0)	2 (12,5)	1 (6,2)	0 (0,0)	1 (6,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (6,2)	1 (6,2)	1 (6,2)
A + DR	9 (4,0)	4 (44,4)	1 (11,1)	1 (11,1)	1 (11,1)	1 (11,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
B + DR	14 (6,3)	6 (42,9)	2 (14,3)	2 (14,3)	2 (14,3)	1 (7,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
AB + DR	27 (12,0)	12 (44,4)	3 (11,1)	4 (14,8)	5 (18,5)	1 (3,7)	1 (3,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Negativo	29 (13,0)	6 (20,7)	4 (13,8)	0 (0,0)	1 (3,4)	2 (6,9)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,4)	0 (0,0)
<i>valor P</i>		0,51	0,65	0,21	0,31	0,56	0,71	0,67	0,55	0,40	0,96	0,07	0,26	0,58
<b>Perfil DQ2 exclusivo</b>														
A	40 (17,9)	20 (50,0)	8 (20,0)	6 (15,0)	5 (12,5)	2 (5,0)	0 (0,0)	1 (2,5)	2 (5,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
B	37 (16,5)	15 (40,5)	9 (24,3)	4 (10,8)	5 (13,5)	1 (2,7)	0 (0,0)	1 (2,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
AB	102 (45,5)	43 (42,2)	17 (16,7)	6 (5,9)	10 (9,8)	10 (9,8)	3 (2,9)	4 (3,9)	3 (2,9)	1 (1,0)	1 (1,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (2,0)
Negativo	45 (20,1)	13 (28,9)	7 (15,6)	3 (6,7)	5 (11,1)	4 (8,9)	1 (2,2)	0 (0,0)	1 (2,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (2,2)	2 (4,4)	1 (2,2)
<i>valor P</i>		0,25	0,71	0,32	0,93	0,48	0,53	0,61	0,59	0,75	0,75	0,26	0,05	0,66
<b>Perfil DQ8 exclusivo</b>														
DR	67 (29,9)	29 (43,3)	9 (13,4)	10 (14,9)	12 (17,9)	5 (7,5)	2 (3,0)	0 (0,0)	1 (1,5)	1 (1,5)	0 (0,0)	1 (1,5)	1 (1,5)	1 (1,5)
Negativo	157 (70,1)	62 (39,5)	32 (20,4)	9 (5,7)	13 (8,3)	12 (7,6)	2 (1,3)	6 (3,8)	5 (3,2)	0 (0,0)	1 (0,6)	0 (0,0)	1 (0,6)	2 (1,3)
<i>valor P</i>		0,60	0,22	<b>0,02</b>	<b>0,04</b>	0,96	0,38	0,11	0,47	0,13	0,51	0,13	0,53	0,90

A = alelo DQA1\*0501 (DQ2 -  $\alpha$ ); B = alelo DQB1\*0201 (DQ2 -  $\beta$ ); AB = alelos DQA1\*0501 e DQB1\*0201 (DQ2 -  $\alpha\beta$ ); DR = alelo DRB1\*04 (DQ8); A + DR = alelos DQA1\*0501(DQ2 -  $\alpha$ ) e DRB1\*04 (DQ8); B + DR = alelos DQB1\*0201 (DQ2 -  $\beta$ ) e DRB1\*04 (DQ8); AB + DR = alelos DQA1\*0501 e DQB1\*0201 (DQ2 -  $\alpha\beta$ ) e DRB1\*04 (DQ8) .



## 6 Discussão

A base genética da suscetibilidade à DC envolve uma ampla gama de genes, no entanto, os alelos de risco relacionados aos genes do sistema HLA-DQ2 e DQ8 estão presentes em 90-95% dos celíacos e por isso constituem o conjunto de genes mais importantes na avaliação do risco genético para o desenvolvimento da DC (SHUMANN et al., 2017; MEGIORNI & PIZZUTI, 2012). Apesar da importância destes alelos, eles são insuficientes para o desencadeamento da DC, pois estima-se que estejam presentes em 30% da população em geral (TAYLOR et al., 2015). No presente estudo, foi avaliada a frequência destes alelos em parentes de primeiro grau de celíacos de dois estados no sul do Brasil, identificando uma alta prevalência destes alelos nestes indivíduos. Adicionalmente foram identificadas associações dos alelos de risco para as subunidades alfa e beta do complexo HLA-DQ2 com sintomas relacionados à DC, especialmente com distensão abdominal, e do alelo DRB1\*04 presente no haplótipo DR4-DQ8 com osteoporose e hipotireoidismo. Além disso foi realizada uma descrição geral da distribuição destes alelos, sintomas e doenças relacionadas nestas populações.

A alta frequência dos alelos de risco dos complexos HLA-DQ2/DQ8 e a baixa parcela de resultados negativos, nos parentes de primeiro grau de celíacos analisados no presente estudo, ajuda a delinear o risco destes indivíduos a desenvolverem DC. Até o momento, não encontramos pesquisas semelhantes ao presente estudo avaliando os alelos de risco relacionados à DC em parentes de primeiro grau de celíacos nos estados do RS e SC, mas encontramos em outros estados do Brasil. Um estudo realizado com 126 familiares de primeiro grau de celíacos, na cidade de Recife (PE, Brasil), identificou a presença dos alelos de risco DQA1\*0501 e DQB1\*0201 (DQ2) e DQB1\*0302 (DQ8), sendo que os alelos do complexo HLA-DQ2 foram encontrados em 66 indivíduos (52,4%) e o alelo de risco do complexo HLA-DQ8 foi verificada em 20 indivíduos (15,9%), enquanto que 13 (10,3%) expressaram os três alelos de risco e 27 (21,4%) foram negativos para todos os alelos estudados, observando uma frequência total dos alelos dos complexos HLA-DQ2/DQ8 em 78,6% da amostra (CASTRO-ANTUNES et al., 2011). Em outro estudo na cidade de Brasília (DF,

Brasil), realizado com 193 parentes de primeiro grau de celíacos, 131 indivíduos (67,8%) foram positivos para os alelos de risco do HLA-DQ2 e apenas 9 (4,6%) para o alelo do complexo HLA-DQ8, mas ao associar DQ8 com a presença dos alelos do complexo HLA-DQ2, encontrou-se 42 pessoas (21,9%). Ainda nesse mesmo estudo, apenas 11 indivíduos (5,7%) foram negativos para todos os alelos de risco estudados, dessa forma, encontrou-se uma prevalência total dos alelos dos complexos HLA-DQ2/DQ8 de 94,3% (MARTINS et al., 2010). Alta prevalência de DQ2/DQ8 (89,6%) em parentes de celíacos, também foi encontrada em outro estudo brasileiro, na cidade de Cascavel (PR) (CECILIO & BONATTO, 2015). O presente estudo e os estudos citados anteriormente têm uma coisa em comum, os alelos HLA-DQ2 são muito mais prevalentes que o DQ8, os resultados diferem em números, mas as principais tendências são na verdade as mesmas. Em contraste, as diferenças podem ser devidas em parte ao número relativamente pequeno de participantes em todos os estudos, uso de diferentes metodologias, mas também podem ser atribuídas à heterogeneidade das origens populacionais de cada região brasileira. O Brasil tem uma distribuição heterogênea de três contribuições ancestrais: europeia (branca), africana (preta) e indiana (marrom). Esse processo reflete na variação da composição genética das populações atuais, onde se estima que a região Sul seja predominantemente de origem europeia (74%) e que as regiões nordeste e centro-oeste tenham uma população muito mais diversificada, sendo respectivamente, 51 % e 58% de origem europeia, 17% e 26% africanos e 32% e 16% indígenas (MANTA et al., 2013).

Em comparação com outros países, um estudo de Minnesota (EUA) avaliou 344 parentes de uma coorte de pacientes celíacos onde os alelos de risco DQ2 foram identificados em 73,5% dos indivíduos, 13,4% foram DQ8 positivo, ambos DQ2 e DQ8 positivos foram encontrados em 6,7% dos participantes e 19,8% foram negativos para todos os alelos de risco avaliados (RUBIO-TAPIA et al., 2008). Em um estudo semelhante realizado no Chile, os autores mensuraram HLA-DQ2, DQ8 e DQ7 em 157 parentes de 1º grau de celíacos positivos para anticorpos tTG e encontraram a presença de DQ2 em 87,9% dos parentes, e tanto para a presença de DQ8 quanto para DQ7 encontrou-se uma frequência de 52,2% (ARAYA et al., 2015). Já o estudo

realizado na Finlândia, uma considerável proporção (em torno de 20%) dos 245 parentes de 1º grau de celíacos estudados, poderiam ser excluídos de futuras triagens pois não possuem nenhum dos alelos HLA de maior risco para DC (KARINEN et al., 2006).

Algumas diferenças, inclusive dentro de um mesmo país, podem ser visualizadas em decorrência de fatores relacionadas à origem da população ou até mesmo a existência de outros fatores genéticos não relacionados ao sistema HLA. Além disso, a exposição a fatores ambientais variados também pode interferir, como o uso de medicamentos à base de interferon- $\alpha$ , presença de infecções intestinais e práticas de introdução alimentar na infância (SABATINO & CORAZZA, 2009; GUTIERREZ-ACHURY et al., 2011).

Em relação à distribuição dos relatos de sintomas observados no presente estudo, a maior frequência de distensão abdominal relatada já foi descrita em outros estudos. Um estudo com 145 pacientes celíacos cadastrados na ACELBRA-SC, questionou os participantes sobre a sintomatologia prévia ao diagnóstico, onde como sintoma gastrointestinal destacou-se a ocorrência de distensão (71,8%) e dor abdominal (71%), e como sintoma extraintestinal obteve-se maior ocorrência de baixo peso (52,4%) e anemia (50,3%) (CASSOL et al., 2007). Esse resultado vai ao encontro do presente estudo, onde o sintoma gastrointestinal mais relatado foi distensão abdominal (33,8%), seguido de dor abdominal (23,0%). Outro estudo realizado em 434 parentes de primeiro grau de celíacos na Índia, identificou que 64,9% desses indivíduos tinham um ou mais sintomas relacionados à DC e 35% eram completamente assintomáticos (MISHRA et al., 2016). O sintoma gastrointestinal mais frequentemente citado foi dor abdominal (15,4%). Já em relação aos sintomas extraintestinais, destacou-se a anemia (33,6%). Esses achados corroboram com o presente estudo onde obteve-se uma frequência total de sintomas relacionados à DC de 67,6% e de 32,4% assintomáticos, no entanto, dor abdominal foi o segundo sintoma gastrointestinal mais citado, e anemia foi o terceiro sintoma extraintestinal mais frequente.

Em relação às doenças relacionadas à DC, a maior frequência de relatos de intolerância à lactose observada no presente estudo está de acordo com o que já foi relatado em um estudo com pacientes celíacos (CASSOL et al., 2007).

A intolerância à lactose está aumentada em indivíduos celíacos e isto é explicado tanto devido à redução da secreção de tripsina pancreática, a qual é responsável por ativar a enzima lactase que degrada a lactose, como em decorrência do dano às vilosidades intestinais onde a lactase está localizada (ABENAVOLI et al., 2015). No entanto, essa doença também pode estar presente em decorrência de outras situações, como por exemplo, alactasia ou hipolactasia congênita, deficiência primária de lactase (redução natural e progressiva ao longo da vida) ou hipolactasia secundária à outras doenças intestinais. Além disso, a lactose quando não absorvida pode levar ao surgimento de sintomas gastrointestinais (OJETTI et al., 2005). Independente da sua causa - a própria DC ou uma segunda condição - a lactose, quando não absorvida, pode levar a sintomas gastrointestinais típicos da DC. Por outro lado, cerca de 70% da população mundial possui deficiência primária de lactase (HEYMAN, 2006). Isso pode sugerir que alguma parcela da alta frequência de sintomas gastrointestinais encontrada no presente estudo pode ser causada pela intolerância à lactose, e não pela DC.

No presente estudo foi possível identificar também que a presença dos dois alelos DQA1\*0501 e DQB1\*0201 relativos ao complexo HLA-DQ2 estão associados à incidência de sintomas relacionados à DC de forma mais frequente ( $p=0,003$ ). No estudo de Zubillaga et al. (2002), os resultados apontaram para uma alta prevalência da apresentação clássica da doença com sintomas típicos em portadores da DC que possuíam duas cópias do alelo DQB1\*02 relacionado ao complexo HLA-DQ2. Por outro lado, o estudo de Rubio-Tapia et al. (2008), identificou a presença de 21 indivíduos assintomáticos (dos 39 novos casos de DC), desta forma não foi possível associar a presença de sintomas típicos da DC com os alelos, no entanto, os autores concluíram que possuir os alelos de risco DQ2 é o principal fator de risco para o desenvolvimento da DC. Adicionalmente, está consolidado que o heterodímero HLA-DQ2.5 é responsável pelo risco muito elevado de predisposição à DC (ABADIE et al., 2011).

Adicionalmente, observou-se associação da presença do alelo DRB1\*04, presente no haplótipo DR4-DQ8 com presença de osteoporose e hipotireoidismo nos parentes de celíacos, onde a frequência de osteoporose foi três vezes maior, e de hipotireoidismo foi duas vezes maior em indivíduos positivos para o mesmo

alelo do que em parentes não portadores. No entanto, uma vez que este alelo é menos frequente e a população estudada é reduzida, devido à dificuldade de se encontrar estas pessoas em especial, o número de pessoas totais relacionadas para estas análises foi bastante baixo, sugerindo que novos estudos, inclusive com indivíduos não relacionados a pacientes com DC, serão necessários para confirmar se realmente a genotipagem do alelo DRB1\*04 pode ser um marcador de risco para osteoporose e hipotireoidismo.

No entanto, outros estudos também avaliaram esta questão, assim como a relação da DC com outras doenças com fundo auto-imune. No estudo de Spadaccino et al. (2008), foi estimada a prevalência de DC em 276 italianos com doenças autoimunes da tireoide, e o perfil genético de 10 novos casos de DC foi de 8 indivíduos positivos para DQ2 e 2 positivos para DQ8. Ademais, Karhus et al. (2018) que avaliaram DQ2/DQ8 e suas associações com indicadores de saúde em 2293 indivíduos em uma coorte por 5 anos na Dinamarca, identificaram os alelos HLA DQ2 e/ou DQ8 nos 9 participantes celíacos e encontraram associação do DQ2.5 com níveis mais altos do hormônio estimulante da tireoide (TSH). Os autores não encontraram relação dos alelos com DM1 e outras doenças autoimunes atribuindo ao número baixo de participantes com DM1 e à falta de poder da amostragem.

Em relação à osteoporose, sabe-se que a DC, quando não tratada, pode também ser a causa dessa doença, o que provavelmente esteja relacionado à diminuição da absorção de cálcio e vitamina D a nível intestinal (PELKOWSKI & VIEIRA, 2014). No entanto, também existe a relação de distúrbios metabólicos ósseos com fatores genéticos associados ao sistema HLA de classes I e II, a exemplo de B7, DR15 e DQ6, que foram relacionados a uma menor densidade mineral óssea em mulheres pós-menopausa em uma população grega (DOUROUDIS et al., 2007). Embora a associação entre os complexos HLA-DQ2 / DQ8 e DC esteja bem estabelecida, esses achados não explicam a relação dos mesmos alelos com outras doenças relacionadas à DC, como encontrado no presente estudo para osteoporose e hipotireoidismo, e existe a necessidade de mais estudos.

De forma não homogênea, alguns indivíduos relataram resultados de exames específicos para DC, onde a maioria referiu ter feito sorologia para tTG ou EMA. Infelizmente, o número de resultados positivos é tão baixo que não foi possível relacionar estes resultados à distribuição genotípica desta amostra, impedindo qualquer conclusão quanto a associação dos genótipos estudados e estes resultados. Por outro lado, algumas pessoas realizaram a genotipagem para HLA-DQ2 e HLA-DQ8 sendo que os resultados destas análises tiveram alta correlação com os obtidos pela técnica usada neste trabalho, confirmando a validade do método aqui utilizado. Pequenas incoerências são esperadas devido a diferença das ocorrências de falso positivo e falso negativo inerentes a cada uma das metodologias.

Em suma, os dados aqui apresentados mostram o perfil de distribuição dos alelos de risco relacionados ao HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em parentes de primeiro grau de celíacos das populações do RS e de SC, podendo ser utilizados como referência para futuros estudos nestas populações com relação à DC. Também foi possível mostrar a associação de alguns perfis genéticos com a frequência de sintomas típicos de DC, assim como a prevalência de doenças relacionadas à DC nesta população, dados importantes para a inferência de risco de desenvolvimento da DC nos parentes de primeiro grau de pacientes celíacos.

## 7 Conclusões

Esses achados salientam a importância da investigação de alelos de risco dos complexos HLA-DQ2/DQ8 em parentes de primeiro grau de celíacos. Esta conclusão é baseada na grande incidência destes alelos nesta população e de suas associações com sintomatologia típica de DC, o que pode indicar, em estudos de risco, a necessidade da realização da biópsia nos indivíduos portadores de ambos alelos relacionados ao complexo HLA-DQ2, quando estes indivíduos apresentam sintomatologia relacionada à DC, mesmo estando negativos na sorologia específica para a doença. Além disso, tais alelos mostraram associações diferentes com a maior ocorrência de doenças e sintomas relacionados à DC, mostrando serem potenciais marcadores para osteoporose e hipotireoidismo nesta população, embora novos estudos sejam necessários para confirmar essas associações.

## 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 of Immunology**, v.29, p. 493-525, 2011.

ABENAVOLI, L.; DELIBASIC, M.; PETA, V.; TURKULOV, V.; DE LORENZO, A.; MEDIC-STOJANOSKA, M. Nutritional profile of adult patients with celiac disease. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.19, p.4285-4292, 2015.

ADRIAANSE, M.; LEFFLER, D.A. Serum Markers in the Clinical Management of Celiac Disease. **Digestive Diseases**, v. 33, n. 2, p. 236 – 243, 2015.

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

ARAYA, M.; OYARZUN, A.; LUCERO, Y.; ESPINOSA, N.; PÉREZ-BRAVO, F. DQ2, DQ7 and DQ8 Distribution and clinical manifestations in celiac cases and their first-degree relatives. **Nutrients**, v. 7, p. 4955-4965, 2015.

BAI, J.C.; FRIED, M.; CORAZZA, G.R.; SHUPPAN, D., FARTHING, M.; CATASSI, C.; et al. World Gastroenterology Organization Global Guidelines on Celiac Disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 47, n. 2, p. 121-126, 2013.

BIAGI, F.; CORAZZA, G.R. Mortality in celiac disease. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, p. 158 – 162, 2010.

CASSOL, C.A.; De PELLEGRIN, C.P.; WAHYS, M.L.C.; PIRES, M.M.S.; NASSAR, S.M. Perfil clínico dos membros da Associação dos Celíacos do Brasil – regional de Santa Catarina (ACELBRA-SC). **Arquivos de Gastroenterologia**, São Paulo, v.44, p.257-265, 2007.

CASTRO-ANTUNES, M.M.; CROVELLA, S.; BRANDÃO, L.A.C.; GUIMARÃES, R.L.; MOTTA, M.E.F.A.; SILVA, G.A.P. 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.

CATASSI, C.; GATTI, S.; FASANO, A. The new epidemiology of celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 59, suplemento 1, p. 7-9, 2014.

CATASSI, C.; GATTI, S.; LIONETTI, E. World perspective and celiac disease epidemiology. **Digestive Diseases**, v.33, p.141-146, 2015.



CECILIO, L.A.; BONATTO, M.W. Prevalência do HLA DQ2 e DQ8 em pacientes portadores da doença celíaca, nos seus familiares e na população em geral. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 28, n. 3, p. 183-185, 2015.

DOUROUDIS, K.; TARASSI, K.; ATHANASSIADES, T.; GIANNAKOPOULOS, F.; KOMINAKIS, A.; THALASSINOS, N.; et al. HLA alleles as predisposal factors for postmenopausal osteoporosis in a Greek population. **Tissue Antigens**, v.69, p.592-596, 2007.

GANDOLFI, L.; PRATESI, R.; CORDOBA, J.C.; TAUIL, P.L.; GASPARIN, M.; CATASSI, C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *The American Journal of Gastroenterology*, v.95, p.689-692, 2000.

GUANDALINI, S.; ASSIRI, A. Celiac disease: A review. **JAMA Pediatrics**, v.168, p.272 – 278, 2014.

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

GREEN, P.H.R.; JABRI, B. Coeliac disease. **Lancet**, v.362, p. 383-391, 2003.

GUTIERREZ-ACHURY, J.; ALMEIDA, R.C.; WIJMENGA, C. Shared genetics in coeliac disease and other immune-mediated diseases. **Journal of Internal Medicine**, v. 269, n. 6, p. 591 – 603, 2011.

HAN, Y.; CHEN, W.; LI, P.; YE, J. Association between coeliac disease and risk of any malignancy and gastrointestinal malignancy – a meta-analysis. **Medicine**, v.94, 2015.

HEYMAN, M.B. Lactose intolerance in infants, children and adolescents. **Pediatrics**, v.118, n.3, p.1279-1286, 2006.

HUSBY, S.; KOLETZKO, S.; KORPONAY-SZABÓ, I.R.; MEARIN, M.L.; PHILLIPS, A.; SHAMIR, R.; et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 136 – 160, 2012.

KARHUS, L.L.; THUESEN, B.H.; SKAABY, T.; RUMESSEN, J.J.; LINNEBERG, A. The distribution of HLA DQ2 and DQ8 haplotypes and their association with health indicators in a general Danish population. **United European Gastroenterology Journal**, v.6, n.6, p.866-878, 2018.

KARINEN, H.; KARKKAINEN, P.; PIHLAJAMAKI, J.; JANATUINEN, E.; HEIKKINEN, M.; JULKUNEN, R.; et al. HLA genotyping is useful in the evaluation of the risk for coeliac disease in the 1<sup>st</sup>-degree relatives of patients with coeliac disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.41, p.1299-1304, 2006.

KELLY, C.P.; BAI, J.C.; LIU, E.; LEFFLER, D.A. Advances in diagnosis and management of celiac disease. **Gastroenterology**, v.148, p.1175-1186, 2015.

KOERNER, T.B.; CLÉROUX, C.; POIRIER, C.; CANTIN, I.; ALIMKULOV, A. ELAMPARO, H. Glúten contamination in the Canadian commercial oat supply. **Food Additives & Contaminants**, v.28, p.705-710, 2011.

LAURET, E.; RODRIGO, L. Celiac disease and autoimmune-associated conditions. **BioMed Research International**, v.2013, p. 1-17, 2013.

LEBWHOL, B.; SANDER, D.S.; GREEN, P.H.R. Coeliac Disease. **Lancet**, v. 391, p. 70 – 81, 2018.

LIONETTI, E.; CASTELLANETA, S.; FRANCAVILLA, R.; PULVIRENTI, A.; TONUTTI, E.; AMARRI, S.; et al. Introduction of gluten, Hla status, and the risk of celiac disease in children. **The New England Journal of Medicine**, v. 371, p. 1295-1303, 2014.

LUDVIGSSON, J.F.; LEFFLER, D.A.; BAI, J.; BIAGI, F.; FASANO, A.; GREEN, P.H.R.; et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. **Gut**, v. 62, p. 43-52, 2013.

LUND, F.; HERMANSEN, M.N.; PEDERSEN, M.F.; HILLIG, T.; HANSEN, H.T.; SÖLÉTORMOS, G. Mapping of HLA-DQ haplotypes in a group of Danish patients with celiac disease. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation**, v. 75, n. n. 6, p. 519 – 522, 2015.

MANTA, F.S.N.; PEREIRA, R.; VIANNA, R.; ARAÚJO, A.R.B.; GITAÍ, D.L.G.; SILVA, D.A.; et al. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. **PLOS ONE**, v.8, n.9, p. 1 – 11, 2013.

MARTINS, R.C.A.; GANDOLFI, L.; MODELLI, I.C.; ALMEIDA, R.C.; CASTRO, L.C.; PRATESI, R. Serologic screening and genetic testing among Brazilian patients with celiac disease and their first-degree relatives. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 47, n. 3, p. 257 – 262, 2010.

MELO, S.B.C.; FERNANDES, M.I.M.; PERES, L.C.; TRONCON, L.E.A.; GALVÃO, L.C. Prevalence and demographic characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. **Digestive Diseases and Sciences**, v.51, p.1020-1025, 2006.

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

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.

MISHRA, A.; PRAKASH, S.; KAUR, G.; SREENIVAS, V.; AHUJA, V.; GUPTA, S.D.; et al. Prevalence of celiac disease among first-degree relatives of Indian celiac disease patients. **Digestive and Liver Disease**, v. 48, p. 255 – 259, 2016.

NOT, T.; HORVATH, K.; PARTANEN, J.; HAMMED, A.; MAGAZZU, G.; FASANO, A. Celiac disease risk in the USA: high prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.33, p.494-498, 1998.

OJETTI, V.; NUCERA, G.; MIGNECO, A.; GABRIELLI, M.; LAURITANO, C.; DANESE, S.; et al. High prevalence of celiac disease in patients with lactose intolerance. **Digestion**, v. 71, p. 106 – 110, 2005.

OLIVEIRA, R.P.; SDEPANIAN, V.L.; BARRETO, J.A.; CORTEZ, A.J.; CARVALHO, F.O.; BORDIN, J.O.; 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.

PELKOWSKI, T.D.; VIEIRA, A.J. Celiac disease: Diagnosis and management. **American Family Physician**, v.89, p.99-105, 2014.

PÉREZ, L.C.; VILLASANTE, G.C.; RUIZ, A.C.; LÉON, F. Non-dietary therapeutic clinical trials in coeliac disease. **European Journal of Internal Medicine**, v. 23, p. 9 -14, 2012.

POLLO, M.J.F.C.; PEÑA, M.I.A.; PÉREZ, M.L.V.; PRIETO, E.V.; VALLE, I.V.G.; RUIZ, J.M.; et al. Celiac disease and HLA-DQ genotype: Diagnosis of diferente genetic risk profiles related to the age in Badajoz, southwestern Spain. **Revista Española de Enfermedades digestivas**, Madrid, v.105, p.469-476, 2013.

REILLY, N.R.; GREEN, P.H.R. Epidemiology and clinical presentations of celiac disease. **Seminars in Immunopathology**, v.34, p. 473-478, 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, 2006.

RUBIO-TAPIA, A.; DIKE, C.T.V.; LAHR, B.D., ZINSMEISTER, A.R.; EL-YOUSSEF, M.; MOORE, S.B.; et al. Predictors of family risc for celiac disease: A population-based study. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 6, n. 9, p. 983 – 987, 2008.

RUBIO-TAPIA, A.; JANSSON-KNODELL, C.L.; RAHIM, M.W.; SEE, J.A.; MURRAY, J.A. Influencia del género en la presentación clínica y enfermedades asociadas en adultos con enfermedad celíaca (EC). **Gaceta Médica de México**, v. 152, p. 38 – 46, 2016.

RUIZ-ORTIZ, E.; MONTRAVETA, M.; CABRÉ, E.; HERRERO-MATA, M.J.; PUJOL-BORELLI, R.; PALOU, E.; et al. HLA-DQ2/DQ8 and HLA-DQB1\* 02 homozygosity typing by real-time polymerase chain reaction for the assessment of celiac disease genetic risk: evaluation of Spanish celiac population. **Tissue Antigens**, v.84, p.545-553, 2014.

SACCHETTI, L.; SARRANTONIO, C.; PASTORE, L.; CARLINO, V.; CALCAGNO, G.; FERRAJOLO, A.; et al. Rapid identification of HLA DQA1\*0501, DQB1\*0201, and DRB1\*04 alleles in celiac disease by a PCR- based methodology. **Clinical Chemistry**, v.4, 1997.

SCHADOCK, I.; SCHNEIDER, A.; SILVA, E.D.; BUCHWEITZ, M.R.D.; CORREA, M.N.; PESQUERO, J.B.; et al. Simple method to genotype the ACTN3 r577x polymorphism. **Genetic testing and molecular biomarkers**, v. 19, n. 5, p.1 – 5, 2015.

SCHUMANN, M.; SIEGMUND, B.; SCHULZKE, J.D.; FROMM, M. Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier. **Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology**, v. 3, n. 2, p. 150 – 162, 2017.

SCHUPPAN, D.; JUNKER, Y., BARISANI, D. Celiac disease: From pathogenesis to novel therapies. **Gastroenterology**, v. 137, p. 1912 – 1933, 2009.

SILVA, M.E.R.; MORY, D.; DAVINI, E. Marcadores genéticos e autoimunes do diabetes melito tipo 1: da teoria para a prática. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 52, n. 2, p. 166-180, 2008.

SPADACCINO, A.C.; BASSO, D.; CHIARELLI, S.; ALBERGONI, M.P.; D'ODORICO, A.; PLEBANI, M.; et al. Celiac disease in North Italian patients with autoimmune thyroid diseases. **Autoimmunity**, v.41, n.1, p.116-1221, 2008.

TAYLOR, A.K.; LEBWOHL, B.; SNYDER, C.L.; GREEN, P.H.R. Celiac Disease. **GeneReviews [Internet]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1727/>>. Acesso em: 25 out. 2016.

WALKER, M.N.; TALLEY, N.J. Clinical value of duodenal biopsies – Beyond the diagnosis of celiac disease. **Pathology Research and Practice**, v.207, p.538-544, 2011.

YUAN, J.; GAO, J.; LIU, F.; WIJIMENGA, C.; CHEN, H.; GILISSEN, L.J.W.J. The tip of the “celiac iceberg” in China: A systematic review and meta-analysis. **Plos One**, v.8, 2013.

LLAGA, P.; VIDALES, M.C.; ZUBILLAGA, I.; ORMAECHEA, V.; GARCÍA-URKÍA, N.; VITORIA, J.C. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genetic markers and clinical presentation in celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.34, p.548-554, 2002.

## APÊNDICES

## Apêndice A – Ofício para autorização do projeto na ACELBRA-SC



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE NUTRIÇÃO



### OFÍCIO PARA AUTORIZAÇÃO DE PROJETO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO NA ASSOCIAÇÃO DOS CELÍACOS DO BRASIL DE SANTA CATARINA (ACELBRA-SC)

Prezado (a) Senhor (a):

Venho por meio deste solicitar sua autorização para a realização do estudo intitulado: **“Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e relação com o risco de desenvolvimento da doença celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos”**, nesta instituição.

Esse estudo será desenvolvido por alunos e professores da Faculdade de Nutrição da UFPel, sob orientação do Professor Dr. Carlos Castilho de Barros e Professora Dra. Fabiana Torma Botelho. O objetivo desse estudo é verificar a frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e relacioná-los com o risco de desenvolvimento da doença celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos. A análise dos alelos será realizada por meio da coleta de saliva dos indivíduos. As amostras de saliva serão encaminhadas ao Laboratório de Nutrifisiogenômica da Faculdade de Nutrição da UFPel para posteriores análises dos alelos no DNA. Ainda, será aplicado um questionário com questões sócio demográficas e sobre saúde dos indivíduos. Após a análise dos resultados, esperamos encontrar uma determinada frequência de HLA-DQ2 e DQ8 nos parentes de primeiro grau dos celíacos, pois conforme encontrado na literatura, parentes de primeiro grau de celíacos apresentam uma maior chance de desenvolver a doença, com frequência cerca de dez vezes maior que na população em geral. Além disso, estudos mostram que casos não tratados podem levar a diversas complicações como câncer intestinal, outras doenças autoimunes e até mesmo a morte. Os resultados da presente pesquisa irão contribuir para o diagnóstico precoce da doença celíaca que, em alguns casos, é assintomática, visando à melhora na qualidade de vida dos indivíduos que apresentam a doença e a desconhecem. Teremos o compromisso ético de preservar os sujeitos envolvidos no estudo, assim como a instituição. A pesquisa não apresenta nenhum risco para os indivíduos e para a instituição e os resultados do estudo serão retornados para os seus participantes e incorporados ao conhecimento científico.

Na certeza de contar com vosso apoio, desde já agradeço colocando-me ao seu inteiro dispor para outros esclarecimentos.

Atenciosamente,

Giovana Ribeiro Pegoraro – Mestranda no Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos da UFPel. Telefone: (53) 98412.0794. E-mail: giovana.pegoraro@hotmail.com.

Considerando as informações acima, confirmo ter sido informado(a) por escrito e verbalmente dos objetivos desta pesquisa. Desta forma, Eu Odette Maluf, Responsável pela Associação dos Celíacos do Brasil de Santa Catarina, autorizo a realização desta pesquisa nessa instituição.





Assinatura e carimbo

## Apêndice B – TCLE para maiores de dezoito anos

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Pesquisador responsável:** Giovana Ribeiro Pegoraro. **Instituição:** Universidade Federal de Pelotas. **Endereço:** Rua Gomes Carneiro, nº 1. Centro. Pelotas – RS **Telefone:** (53) 9841.20794

Concordo em participar do estudo “**Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e relação com o risco de desenvolvimento da doença celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos**”, o qual tem por objetivo verificar a frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e relacioná-los com o risco de desenvolvimento da doença celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos.

O rastreamento dos alelos será realizado pela coleta de saliva para posterior identificação em laboratório. Para isso, você precisará coletar saliva, apenas enxaguando a boca antes com água tratada e esfregando um cotonete de cabo comprido várias vezes entre as duas bochechas. Ainda, 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 uma vez que existe um grande número de indivíduos que possuem a doença e a desconhecem, e considerando que parentes de primeiro grau de celíacos apresentam uma maior chance de desenvolver a doença, com frequência cerca de dez vezes maior que na população em geral, tornam-se um grupo de risco. Além disso, a falha na detecção da doença celíaca junto ao fracasso no tratamento pode levar a diversas complicações como câncer intestinal, outras doenças autoimunes e até mesmo a morte.

Fui informado que não existem riscos no estudo e o benefício é que para os casos confirmados da presença dos alelos, 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 dos alelos realizadas com o resultado, interpretação e orientações.

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.

**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. Este Formulário de Consentimento Pré-Informado será assinado por mim e arquivado na instituição responsável pela pesquisa.

Nome: \_\_\_\_\_

Identidade: \_\_\_\_\_

ASSINATURA: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**AUTORIZAÇÃO:** Eu \_\_\_\_\_, autorizo a coleta de minha saliva, assim como seu 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.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Giovana Ribeiro Pegoraro. Faculdade de Nutrição. Campus Porto. Rua Gomes Carneiro, nº 1. Contatos: (53) 9841.20794 / giovana.pegoraro@hotmail.com

**ASSINATURA PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### Pesquisador colaborador

Nome: \_\_\_\_\_

ASSINATURA: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFPel. Contato: (53) 3284-4960.

## Apêndice C – TCLE para menores de dezoito anos

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Pesquisador responsável:** Giovana Ribeiro Pegoraro. **Instituição:** Universidade Federal de Pelotas. **Endereço:** Rua Gomes Carneiro, nº 1. Centro. Pelotas – RS **Telefone:** (53) 9841.20794

Concordo que meu(minha) filho(a) ou \_\_\_\_\_ participe do estudo “**Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e relação com o risco de desenvolvimento da doença celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos**”, o qual tem por objetivo verificar a frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e relacioná-los com o risco de desenvolvimento da doença celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos.

O rastreamento dos alelos será realizado pela coleta de saliva para posterior identificação em laboratório. Para isso, meu filho ou \_\_\_\_\_ precisará coletar saliva, apenas enxaguando a boca antes com água tratada e esfregando 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 uma vez que existe um grande número de indivíduos que possuem a doença e a desconhecem, e considerando que parentes de primeiro grau de celíacos apresentam uma maior chance de desenvolver a doença, com frequência cerca de dez vezes maior que na população em geral, tornam-se um grupo de risco. Além disso, a falha na detecção da doença celíaca junto ao fracasso no tratamento pode levar a diversas complicações como câncer intestinal, outras doenças autoimunes e até mesmo a morte.

Fui informado que não existem riscos no estudo e o benefício é que para os casos confirmados da presença dos alelos, será orientada à investigação médica de possível diagnóstico da doença celíaca, ou seja, a consulta com o médico será recomendada e não faz parte do estudo, ficando a critério dos pais ou responsáveis pela criança/adolescente investigar a possibilidade da doença. Ainda, receberei retorno sobre as análises dos alelos realizadas com o resultado, interpretação e orientações.

Como já me foi dito, a participação do meu(minha) filho(a) ou \_\_\_\_\_ 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.

**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) ou \_\_\_\_\_ participe do estudo. Este Formulário de Consentimento Pré-Informado será assinado por mim e arquivado na instituição responsável pela pesquisa.

Nome da criança/adolescente: \_\_\_\_\_

Representante Legal: \_\_\_\_\_

Vínculo Familiar ou Legal do representante: \_\_\_\_\_

Identidade do representante: \_\_\_\_\_

ASSINATURA: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**AUTORIZAÇÃO:** Eu \_\_\_\_\_, autorizo a coleta, armazenamento e posterior utilização em análises da saliva do meu(minha) filho(a) ou \_\_\_\_\_.

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.

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Giovana Ribeiro Pegoraro. Faculdade de Nutrição. Campus Porto. Rua Gomes Carneiro, nº 1. Contatos: (53) 9841.20794 / giovana.pegoraro@hotmail.com

ASSINATURA PESQUISADOR RESPONSÁVEL: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### Pesquisador colaborador

Nome: \_\_\_\_\_

ASSINATURA: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFPel. Contato: (53) 3284-4960.



**Apêndice D - Questionário com questões sociodemográficas e sobre saúde dos participantes do estudo**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS**

**Pesquisa:** *Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e relação com o risco de desenvolvimento da doença celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos.*

**Pesquisadores responsáveis:** Giovana Ribeiro Pegoraro, Fabiana Torma Botelho e Carlos Castilho de Barros

1. Nome: \_\_\_\_\_
2. Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
3. Idade: \_\_\_\_\_
4. Sexo: ( ) masculino ( ) feminino
5. Cor: ( ) branca ( ) parda ( ) negra
6. Você tem algum familiar com doença celíaca? ( ) sim ( ) não  
Se sim, quantos e qual o grau de parentesco? \_\_\_\_\_
7. Marque abaixo alguns dos sintomas/problemas que você tenha:
 

( ) diarreia	( ) anemia
( ) dor abdominal	( ) lesões de pele
( ) distensão abdominal	( ) outros – Quais? _____
( ) dificuldade em ganhar peso	( ) ausência de sintomas
( ) dificuldade em ganhar altura	
( ) emagrecimento	
8. Marque se você possui uma ou mais doenças abaixo:
 

( ) hipotireoidismo	( ) osteoporose
( ) diabetes mellitus tipo 1	( ) intolerância à lactose
( ) infertilidade	( ) intolerância à proteína do leite de vaca
( ) abortos de repetição	( ) artrite reumatóide
( ) dermatite herpetiforme	( ) outras – Quais? _____
( ) síndrome de Down	( ) não possui nenhuma destas doenças
( ) deficiência de IgA	
( ) síndrome de Turner	
( ) síndrome de Williams	
9. Alguma vez desconfiou em ter a doença celíaca? ( ) sim ( ) não.  
Se sim, por quê? \_\_\_\_\_
10. Se desconfiou em ter a doença celíaca, buscou investigar?  
( ) sim ( ) não ( ) não se aplica
11. Se buscou investigar, realizou algum dos exames abaixo? Qual foi o resultado?
 

( ) dosagem de anticorpos anti-endomísio: ( ) normal ( ) alterado
( ) dosagem de anticorpos anti-transglutaminase: ( ) normal ( ) alterado
( ) dosagem de HLA-DQ2: ( ) normal ( ) alterado

- ( ) dosagem de HLA-DQ8: ( ) normal ( ) alterado  
( ) biópsia do intestino delgado: ( ) normal ( ) alterado ( ) inconclusivo  
( ) não se aplica
12. Se você fez a biópsia intestinal, foram coletados 4 fragmentos do intestino? ( ) sim ( ) não ( ) não sei.  
E foi realizada a contagem de linfócitos? ( ) sim ( ) não ( ) não sei
13. Se desconfiou e não investigou, qual foi o motivo?  
( ) receio da realização dos exames  
( ) receio do resultado dos exames  
( ) receio em ir ao médico  
( ) não tive tempo  
( ) os sintomas não me incomodam  
( ) não tenho sintomas graves  
( ) não irei parar de consumir glúten, se tiver a doença  
( ) falta de recurso financeiro  
( ) outro. Qual? \_\_\_\_\_  
( ) não se aplica
14. Faz restrição de glúten na dieta? ( ) sim ( ) não.  
Por quê? \_\_\_\_\_

**Apêndice E – Modelo de entrega do resultado da genotipagem dos alelos aos participantes**



**Universidade Federal de Pelotas  
Faculdade de Nutrição  
Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos**



---

**Pesquisa:** *"Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e relação com o risco de desenvolvimento da doença celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos"*

**Pesquisadores responsáveis:** Giovana Ribeiro Pegoraro, Mônica Schiavon da Costa, Fabiana Torma Botelho e Carlos Castilhos Barros .

---

**Nome do(a) participante:**

**Resultado da genotipagem dos alelos:**

DQA1\*0501 (Alelo  $\alpha$  do HLA-DQ2) →

DQB1\*0201 (Alelo  $\beta$  do HLA-DQ2) →

DRB1\*04 (HLA-DQ8) →

**Observação:** A identificação dos alelos foi feita a partir da técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), com adaptações do método realizado por SACCHETTI et al., (1997)\*. Desta forma, na comparação de métodos distintos poderá haver discrepâncias devido a diferentes frequências de resultados falso positivo ou falso negativo inerentes de cada método.

\*SACCHETTI, L.; SARRANTONIO, C.; PASTORE, L.; CARLINO, V.; CALCAGNO, G.; FERRAJOLO, A.; et al. Rapid identification of HLA DQA1\*0501, DQB1\*0201, and DRB1\*04 alleles in celiac disease by a PCR- based methodology. Clinical Chemistry, v.4, 1997.

**Apêndice F – Orientações acerca do resultado da genotipagem dos alelos  
para os participantes**



**Universidade Federal de Pelotas  
Faculdade de Nutrição  
Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos**



---

**Pesquisa:** *"Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e relação com o risco de desenvolvimento da doença celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos"*

**Pesquisadores responsáveis:** Giovana Ribeiro Pegoraro, Mônica Schiavon da Costa, Fabiana Torma Botelho e Carlos Castilhos Barros

---

**Observações sobre o resultado**

Parentes de primeiro grau (pais, irmãos e filhos) de celíacos possuem um risco aproximado de 5 a 20% para o desenvolvimento da Doença Celíaca (DC), no entanto, apresentando os alelos de risco associados à DC, as chances para que estes indivíduos também se tornem celíacos aumentam<sup>1</sup>.

A **ausência** dos alelos HLA associados à DC pode funcionar como diagnóstico de redução de risco, uma vez que indivíduos negativos para os mesmos apresentam uma probabilidade reduzida de acometimento da doença<sup>2</sup>. Por outro lado, a **presença** destes alelos é considerada necessária, mas não suficiente para o aparecimento da doença<sup>1</sup>.

Os alelos HLA-DQ2 são encontrados em mais de 90% dos celíacos, os HLA-DQ8 entre 5 a 10%, e uma pequena parcela possui meio HLA-DQ2 (apenas um dos alelos que o constituem - DQA1\*0501 ou DQB1\*0201) <sup>1</sup>. No entanto, estes alelos também podem ser encontrados em cerca de 30% da população em geral, contudo, somente 3% vêm a desenvolver a doença<sup>1</sup>. Sendo assim, apenas o teste genético não pode ser utilizado como diagnóstico da doença celíaca.

O diagnóstico da DC é feito com base na associação entre presença de manifestações clínicas características da doença, realização de testes sorológicos, teste genético e biópsia intestinal<sup>2</sup>. Entretanto, é importante salientar que a confirmação definitiva da DC se faz pela realização da biópsia de intestino delgado, por meio da identificação de alterações histopatológicas típicas da doença, sendo considerado o

padrão-ouro no fechamento do diagnóstico<sup>2</sup>, ou seja, o teste genético realizado, não confirma o diagnóstico da doença celíaca.

### **Atenção!!!!**

- Não exclua o glúten da sua alimentação sem possuir um diagnóstico concreto da Doença Celíaca, ou seja, a partir da confirmação por biópsia intestinal.
- Se você for positivo para os alelos estudados, procure o seu médico e siga em acompanhamento.

### **Referências**

1. TAYLOR, A.K.; LEBWOHL, B.; SNYDER, C.L.; GREEN, P.H.R. Celiac Disease. **GeneReviews [Internet]**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1727/>>. Acesso em: 25 out. 2016.
2. HUSBY, S.; KOLTZKO, S.; KORPONAY-SZABO, I.R.; MEARIN, M.L.; PHILLIPS, A.; SHAMIR, R.; et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.54, n.1, p.136-160, 2012.

**ANEXOS**

## Anexo A – Parecer consubstanciado do CEP: PROJETO DE PESQUISA

UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Rastreamento de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em parentes de primeiro grau de celíacos cadastrados na Associação dos Celíacos do Brasil de Santa Catarina (ACELBRA - SC)

**Pesquisador:** GIOVANA RIBEIRO PEGORARO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 62209416.4.0000.5317

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.848.263

#### Apresentação do Projeto:

A doença celíaca (DC) é uma doença crônica inflamatória que acomete o intestino delgado, sendo fundamentalmente ocasionada pela associação de três elementos: suscetibilidade genética, resposta autoimune e exposição ao glúten. Calcula-se que apenas 10 a 15% dos celíacos são devidamente diagnosticados. O diagnóstico da DC é tradicionalmente feito com base nas manifestações clínicas características da doença, realização de testes sorológicos e biópsia intestinal. A DC pode ser diagnosticada clinicamente em: clássica, não clássica, latente e assintomática. A DC assintomática é encontrada principalmente entre familiares de primeiro grau de pacientes celíacos. Esta forma clínica vem sendo relatada com maior frequência nas últimas décadas, após a elaboração de marcadores sorológicos específicos. Os principais determinantes da suscetibilidade genética para a DC estão localizados na região do HLA de classe II, mais especificamente nos genes HLA-DQ, os quais são formados por duas cadeias diferentes ( e ). Os alelos destes genes têm sido úteis no diagnóstico da DC, sendo um método menos invasivo evitando métodos invasivos desnecessários. Além disso, permitem o estudo da prevalência familiar dos alelos indesejáveis, favorecendo o diagnóstico nos indivíduos com as formas menos graves. Dessa forma, a presente pesquisa visa reforçar a importância de se realizar o diagnóstico precoce da doença, a fim de evitar complicações em longo prazo e objetivando a melhora na qualidade de

**Endereço:** Rua Prof Araujo, 465 sala 301  
**Bairro:** Centro **CEP:** 96.020-360  
**UF:** RS **Município:** PELOTAS  
**Telefone:** (53)3284-4960 **Fax:** (53)3221-3554 **E-mail:** cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 1.848.263

vida dos indivíduos que apresentam a doença e a desconhecem. Para isso serão rastreados alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 que predisõem à Doença Celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos cadastrados na Associação dos Celíacos do Brasil do Estado de Santa Catarina (ACELBRA - SC). Serão coletadas amostras de saliva dos parentes dos celíacos registrados na associação, diante da concordância por escrito como voluntários à pesquisa. Após esclarecimentos e assinatura do TCLE, o DNA genômico será extraído das células bucais presentes na saliva. Para a genotipagem dos alelos DQA1\*0501, DQB1\*0201 e DRB1\*04, serão utilizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores nucleotídicos específicos. Com estes resultados os parentes dos pacientes serão classificados de acordo com o risco de apresentarem a DC. Após, receberão esclarecimentos e orientações para proteção à saúde.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Rastrear alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 que predisõem à Doença Celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos cadastrados na Associação dos Celíacos do Brasil do Estado de Santa Catarina (ACELBRA - SC).

Objetivo Secundário:

Verificar a frequência dos alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) nos parentes de primeiro grau dos celíacos cadastrados na associação;

Verificar a frequência do alelo HLA-DQ8 (DRB1\*04) nos parentes de primeiro grau dos celíacos cadastrados na associação;

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

Associar o perfil clínico dos parentes de primeiro grau com a presença dos alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) e HLA-DQ8 (DRB1\*04);

Correlacionar a presença de doenças como síndrome de Down, síndrome de Turner, síndrome de Williams, deficiência de Imunoglobulina A (IgA) seletiva, diabetes mellitus tipo 1, artrite reumatoide e tireoidite autoimune com a predisposição dos alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) e HLA-DQ8 (DRB1\*04);

Orientar os indivíduos que apresentarem os alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) e/ou HLA-DQ8 (DRB1\*04) a buscarem auxílio médico para a investigação da doença e verificação de um possível diagnóstico de DC.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

- Com relação aos riscos, os autores escreveram "Considera-se que os riscos são mínimos pois a

<b>Endereço:</b> Rua Prof Araujo, 465 sala 301	<b>CEP:</b> 96.020-360
<b>Bairro:</b> Centro	
<b>UF:</b> RS	<b>Município:</b> PELOTAS
<b>Telefone:</b> (53)3284-4960	<b>Fax:</b> (53)3221-3554
<b>E-mail:</b> cep.famed@gmail.com	



UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 1.848.263

coleta de saliva dos indivíduos e a aplicação do questionário são considerados métodos de pesquisa simples e menos invasivos.” Considero adequado.

- Com relação aos benefícios, os autores escreveram neste item do formulário da Plataforma Brasil: “O benefício de participar da pesquisa é o fato de que os resultados poderão auxiliá-los na prevenção dos agravos da DC, além de que os resultados serão incorporados ao conhecimento científico e posteriormente a situações de ensino-aprendizagem, além de contribuir para uma proposta de maior divulgação da DC em nossa região.” Considero adequado. E na metodologia do projeto foi mencionado que “Após a análise dos resultados e confirmação dos alelos HLA DQ2 e DQ8 relacionados à DC, será realizada uma reunião individual e reservada, com os indivíduos envolvidos no estudo para explicar a confirmação do teste genético e a necessidade de pesquisar o diagnóstico de DC.”

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Serão rastreados alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 que predisõem à Doença Celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos cadastrados na Associação dos Celíacos do Brasil do Estado de Santa Catarina (ACELBRA - SC). Serão coletadas amostras de saliva dos parentes dos celíacos registrados na associação, diante da concordância por escrito como voluntários à pesquisa. Após esclarecimentos e assinatura do

TCLE, o DNA genômico será extraído das células bucais presentes na saliva. Para a genotipagem dos alelos DQA1\*0501, DQB1\*0201 e DRB1\*04, serão utilizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores nucleotídicos específicos. Com estes resultados os parentes dos pacientes serão classificados de acordo com o risco de apresentarem a DC. Após, receberão esclarecimentos e orientações para proteção à saúde.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

OK

**Recomendações:**

OK

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

OK

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301				
Bairro: Centro		CEP: 96.020-360		
UF: RS	Município: PELOTAS			
Telefone: (53)3284-4960	Fax: (53)3221-3554	E-mail: cep.famed@gmail.com		

UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 1.848.263

Outros	Qualificacao.jpg	03/12/2016 19:52:48	Patricia Abrantes Duval	Aceito
Outros	PROJETO_Giovana.pdf	03/12/2016 19:52:27	Patricia Abrantes Duval	Aceito
Outros	ACELBRA_GIOVANA.pdf	03/12/2016 19:51:10	Patricia Abrantes Duval	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_823748.pdf	10/11/2016 23:48:43		Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	10/11/2016 23:41:20	GIOVANA RIBEIRO PEGORARO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_menores.doc	10/11/2016 23:40:16	GIOVANA RIBEIRO PEGORARO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_maiores.doc	10/11/2016 23:40:00	GIOVANA RIBEIRO PEGORARO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	10/11/2016 23:35:33	GIOVANA RIBEIRO PEGORARO	Aceito
Outros	Questionario.docx	09/11/2016 22:17:28	GIOVANA RIBEIRO PEGORARO	Aceito
Outros	oficio_para_autorizacao_do_projeto.docx	09/11/2016 22:12:58	GIOVANA RIBEIRO PEGORARO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PELOTAS, 03 de Dezembro de 2016

Assinado por:  
Patricia Abrantes Duval  
(Coordenador)

Endereço: Rua Prof Araujo, 465 sala 301  
Bairro: Centro CEP: 96.020-360  
UF: RS Município: PELOTAS  
Telefone: (53)3284-4960 Fax: (53)3221-3554 E-mail: cep.famed@gmail.com

## Anexo B – Parecer consubstanciado do CEP: EMENDA

UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e relação com o risco de desenvolvimento da doença celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos

**Pesquisador:** GIOVANA RIBEIRO PEGORARO

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 62209416.4.0000.5317

**Instituição Proponente:** Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.626.304

#### Apresentação do Projeto:

A doença celíaca (DC) é uma doença crônica inflamatória que acomete o intestino delgado, sendo fundamentalmente ocasionada pela associação de três elementos: suscetibilidade genética, resposta autoimune e exposição ao glúten. Calcula-se que apenas 10 a 15% dos celíacos são devidamente diagnosticados. O diagnóstico da DC é tradicionalmente feito com base nas manifestações clínicas características da doença, realização de testes sorológicos e biópsia intestinal. A DC pode ser diagnosticada clinicamente em: clássica, não clássica, latente e assintomática. A DC assintomática é encontrada principalmente entre familiares de primeiro grau de pacientes celíacos. Esta forma clínica vem sendo relatada com maior frequência nas últimas décadas, após a elaboração de marcadores sorológicos específicos. Os principais determinantes da suscetibilidade genética para a DC estão localizados na região do HLA de classe II, mais especificamente nos genes HLA-DQ, os quais são formados por duas cadeias diferentes. Os alelos destes genes têm sido úteis no diagnóstico da DC, sendo um método menos invasivo. Além disso, permitem o estudo da frequência familiar dos alelos indesejáveis, favorecendo o diagnóstico nos indivíduos com as formas menos graves.

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

Verificar a frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e relacioná-los com o risco de

**Endereço:** Av Duque de Caxias 250

**Bairro:** Fragata

**CEP:** 96.030-001

**UF:** RS

**Município:** PELOTAS

**Telefone:** (53)3284-4960

**Fax:** (53)3221-3554

**E-mail:** cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.626.304

desenvolvimento da doença celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos.

**Objetivo Secundário:**

- \* Verificar a frequência dos alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) e HLA-DQ8 (DRB1\*04 - DQA1\*03:01 - DQB1\*03:02) nos parentes de primeiro grau de celíacos;
- \* Relacionar a presença/ausência dos alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) e HLA-DQ8 (DRB1\*04 - DQA1\*03:01 - DQB1\*03:02) com o risco de desenvolvimento da doença celíaca nos parentes de primeiro grau de indivíduos celíacos;
- \* Associar a presença/ausência de sintomas dos parentes de primeiro grau de celíacos com a presença dos alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) e HLA-DQ8 (DRB1\*04 - DQA1\*03:01 - DQB1\*03:02);
- \* Caracterizar o perfil sociodemográfico e de saúde dos indivíduos que compõem a amostra;
- \* Correlacionar a presença de doenças como síndrome de Down, síndrome de Turner, síndrome de Williams, deficiência de Imunoglobulina A (IgA) seletiva, diabetes mellitus tipo 1, artrite reumatoide e tireoidite autoimune com a predisposição dos alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) e HLA-DQ8 (DRB1\*04 - DQA1\*03:01 - DQB1\*03:02);
- \* Orientar os indivíduos que apresentarem os alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) e/ou HLA-DQ8 (DRB1\*04 - DQA1\*03:01 - DQB1\*03:02) a buscarem auxílio médico para a investigação da doença e verificação de um possível diagnóstico de DC.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Considera-se que os riscos são mínimos pois a coleta de saliva dos indivíduos e a aplicação do questionário são considerados métodos de pesquisa simples e menos invasivos.

**Benefícios:**

O benefício de participar da pesquisa é o fato de que os resultados poderão auxiliá-los na prevenção dos agravos da DC, além de que os resultados serão incorporados ao conhecimento científico e posteriormente a situações de ensino-aprendizagem, além de contribuir para uma proposta de maior divulgação da DC em nossa região.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo descritivo, do tipo transversal, que será realizado que será realizado nas cidades de Florianópolis/SC, Blumenau/SC, Porto Alegre/RS, Pelotas/RS, Rio Grande/RS e Santa Maria/RS, com parentes de primeiro grau de celíacos. Será feito o rastreamento de alelos HLA-DQ2

Endereço: Av Duque de Caxias 250  
Bairro: Fragata CEP: 96.030-001  
UF: RS Município: PELOTAS  
Telefone: (53)3284-4960 Fax: (53)3221-3554 E-mail: cep.famed@gmail.com

**UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS**



Continuação do Parecer: 2.628.304

e HLA-DQ8 da doença celíaca nestes indivíduos. O tamanho da amostra foi calculado, sendo obtida uma amostra mínima de 220 indivíduos. A análise dos alelos será realizada por meio da coleta de saliva. As amostras serão encaminhadas ao Laboratório de Nutrifisiogenômica da Faculdade de Nutrição da UFPEl para posteriores análises dos alelos no DNA. Ainda, será aplicado um questionário com questões sociodemográficas e sobre saúde dos indivíduos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

OK

**Recomendações:**

OK

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

OK

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	parecerConsubiadoGiovana.pdf	27/04/2018 14:28:13	Patricia Abrantes Duval	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1010699_E1.pdf	18/03/2018 22:31:01		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_Giovana.pdf	18/03/2018 22:06:16	GIOVANA RIBEIRO PEGORARO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_menores.pdf	18/03/2018 22:05:55	GIOVANA RIBEIRO PEGORARO	Aceito
Outros	Qualificacao.jpg	03/12/2016 19:52:48	Patricia Abrantes Duval	Aceito
Outros	ACELBRA_GIOVANA.pdf	03/12/2016 19:51:10	Patricia Abrantes Duval	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	10/11/2016 23:41:20	GIOVANA RIBEIRO PEGORARO	Aceito
Outros	Questionario.docx	09/11/2016 22:17:28	GIOVANA RIBEIRO PEGORARO	Aceito

**Endereço:** Av Duque de Caxias 250

**Bairro:** Fragata

**CEP:** 96.030-001

**UF:** RS

**Município:** PELOTAS

**Telefone:** (53)3284-4960

**Fax:** (53)3221-3554

**E-mail:** cep.famed@gmail.com

UFPEL - FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE PELOTAS



Continuação do Parecer: 2.626.304

Outros	oficio_para_autorizacao_do_projeto.doc x	09/11/2016 22:12:58	GIOVANA RIBEIRO PEGORARO	Aceito
--------	---	------------------------	-----------------------------	--------

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PELOTAS, 27 de Abril de 2018

---

**Assinado por:**  
**Patricia Abrantes Duval**  
**(Coordenador)**