

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Nutrição
Programa de Pós-graduação em Nutrição e Alimentos
Mestrado em Nutrição Alimentos



Dissertação

Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em celíacos e seus parentes de primeiro grau

João Luis Ricalde Gervasio

Pelotas, 31 de agosto de 2022.

João Luis Ricalde Gervasio

Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em celíacos e seus parentes de primeiro grau

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito para obtenção ao título de Mestre em Nutrição e Alimentos.

Orientador: Fabiana Torma Botelho

Co-Orientador: Carlos Castilhos de Barros

Pelotas, 2022

João Luis Ricalde Gervasio

Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em celíacos e seus parentes de primeiro grau

Defesa de dissertação, como requisito de obtenção de Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 31 de Agosto de 2022

Banca examinadora:

Carlos Castilho de Barros

Inês Shadock

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a Dra. Fabiana, minha orientadora, por todo aprendizado que me foi passado nesses últimos anos, e principalmente pela sua paciência e compreensão.

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

A colega Clédia, pela paciência e disponibilidade para ensinar a realizar as análises em laboratório.

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

Aos meus filhos Dudu e Luisa, e meus Pais Angela e Marzulo pela compreensão da minha ausência em viagens necessárias em busca desse sonho.

Também a minha companheira Luciâni pelo incentivo de sempre.

RESUMO

GERVÁSIO, João Ricalde. **Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em celíacos e seus parentes de primeiro grau.** Orientador: Fabiana Torma Botelho. 2022. 71f. Dissertação (Mestrado em Nutrição e Alimentos) – Faculdade de Nutrição, Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2022.

A doença celíaca (DC) é caracterizada por ser uma desordem autoimune desencadeada pela ingestão de glúten, tendo como principal manifestação desordens a nível intestinal. Essa desordem estaria ligada a fatores genéticos, principalmente aqueles encontrados no Sistema Leucocitário Humano (HLA), classe II (HLADQ), sendo eles os alelos HLA- DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e HLA- DQ8 (DRB1*04), responsáveis por codificar as proteínas DQ2 e DQ8. Sabe-se que esses alelos estão presentes entre 25 a 30% da população chega até 95%, e os outros 5% dos celíacos teriam desencadeado a doença devido a outros fatores genéticos, sendo assim, foi incluído o rastreamento do HLA-DQ dentre as etapas do diagnóstico da DC, utilizando-se principalmente para pacientes assintomáticos e também para rastreio de grupos de risco para DC. Portanto, o objetivo desse estudo é analisar a frequência e a prevalência dos alelos DQ2 e DQ8 em celíacos, parentes de primeiro grau e pessoas em investigação. No total das amostras coletadas, n = 78, obteve-se n=67 análises e questionários analisados, conferindo um total de 85,9% do total, sendo que deste total 37 amostras (55,2%) com diagnóstico de DC, 13 amostras de parentes de celíacos (19,4 %) e 17 amostras em investigação de DC (25,4%), e 9 amostras perdidas que não conseguimos retorno dos participantes (14,1%). Quanto aos genótipos DQ2 A, DQ2 B, DQ A+B, DQ8 e DQ2 A + B + DQ8 A dos celíacos avaliados (n=37) 23 (62%) tinham pelo menos 1 alelo, sendo DQ2 A (n=3) 13,1%, DQ2 B (n=8) 34,8%, DQ2 AB (n=12) 52,1%, já para o alelo DQ8 (n=7) 30,4% apresentavam-se positivos, e (n=11) 37,8% não apresentaram alelo nenhum. Em relação ao teste genético, a maioria das pessoas em todos os três grupos tinham pelo menos um dos alelos, entretanto, o grupo das pessoas em investigação apresentaram maior porcentagem dos alelos, com menor porcentagem de não ter os alelos estudados entre os grupos. O genótipo DQ2 AB foi o mais encontrado em todos os grupos.

Os celíacos apresentaram maior número de sintomas, patologias e realização de biópsia e testes sorológicos para busca de diagnóstico correto entre os grupos, entretanto, a DC deve ser investigada nos grupos de parentes de celíacos e pessoas em investigação da doença, visto que a maioria tinha parentes celíacos e relataram sintomas e doenças relacionadas à DC, sendo classificados como grupo de risco. Mesmo que esses indivíduos não tenham sintomas clássicos de DC, a realização de biópsia é necessária pois pode-se tratar de indivíduos assintomáticos, evitando assim no futuro maiores complicações relacionadas a essa patologia.

Palavras-chave: Doença celíaca; Glúten; Fatores genéticos; Alelos; Diagnóstico.

ABSTRACT

GERVASIO, João Ricalde. Frequency of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 alleles in celiac patients and their first-degree relatives. Advisor: Fabiana Torma Botelho. 2022. 71f. Dissertation (Master in Nutrition and Food) – Faculty of Nutrition, Postgraduate Program in Nutrition and Food, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

Celiac disease (CD) is characterized by being an autoimmune disorder triggered by the ingestion of gluten, with intestinal disorders as its main manifestation. This disorder would be linked to genetic factors, mainly those found in the Human Leukocyte System (HLA), class II (HLADQ), namely the HLA-DQ2 (DQA1*0501 and DQB1*0201) and HLA-DQ8 (DRB1*04) alleles. , responsible for encoding the DQ2 and DQ8 proteins. It is known that these alleles are present between 25 to 30% of the population, reaching up to 95%, and the other 5% of celiacs would have triggered the disease due to other genetic factors, therefore, HLA-DQ screening was included among the stages of CD diagnosis, being used mainly for asymptomatic patients and also for screening risk groups for CD. Therefore, the aim of this study is to analyze the frequency and prevalence of DQ2 and DQ8 alleles in celiac patients, first-degree relatives and people under investigation. In the total of samples collected, n = 78, n=67 analyzes and analyzed questionnaires were obtained, giving a total of 85.9% of the total, of which 37 samples (55.2%) were diagnosed with CD, 13 samples from relatives of celiac patients (19.4%) and 17 samples under investigation for CD (25.4%), and 9 lost samples that we could not return from the participants (14,1 %). As for the genotypes DQ2 A, DQ2 B, DQ A+B, DQ8 and DQ2 A + B + DQ8 A of the celiac patients evaluated (n=37), 23 (62%) had at least 1 allele, being DQ2 A (n=3) 13.1%, DQ2 B (n=8) 34.8%, DQ2 AB (n=12) 52.1%, while for the DQ8 allele (n=7) 30.4% were positive, and (n=11) 37.8% did not present any allele. As for the genotypes DQ2 A, DQ2 B, DQ A+B, DQ8 and DQ2 A + B + DQ8 A of the celiac patients evaluated (n=37), 23 (62%) had at least 1 allele, being DQ2 A (n=3) 13.1%, DQ2 B (n=8) 34.8%, DQ2 AB (n=12) 52.1%, while for the DQ8 allele (n=7) 30.4% were positive, and (n=11) 37.8% did not present any allele. Regarding genetic testing, most people in all three groups had at least one of the alleles, however, the group of people under investigation had a higher percentage of

alleles, with a lower percentage of not having the alleles studied between the groups. The DQ2 AB genotype was the most found in all groups. Celiac patients had a greater number of symptoms, pathologies and biopsy and serological tests to search for a correct diagnosis between the groups, however, CD should be investigated in the groups of relatives of celiacs and people under investigation of the disease, since most had celiac relatives and reported symptoms and diseases related to CD, being classified as a risk group. Even if these individuals do not have classic symptoms of CD, a biopsy is necessary because it can treat asymptomatic individuals, thus avoiding further complications related to this pathology in the future.

Keywords: Celiac disease; Gluten; Genetic factors; alleles; diagnoses.

Lista de Figuras

Projeto de pesquisa

- Figura 1.** Patogênese da Doença Celíaca (DC)
- Figura 2.** Estrutura de HLA-DQ
- Figura 3.** Modelo do ICEBERG Celíaco
- Figura 4.** Imagem Duodeno Saudável
- Figura 5.** Imagem Duodeno com Doença Celíaca (DC)

Artigo Original

Figura 1. Amostra analisada separada pelos grupos

Figura 2. Frequencia dos Alelos em cada grupo

Lista de abreviações

DC: Doença celíaca

HLA: Antígeno Leucocitário Humano

DQ2: proteína codificada pelos alelos DQA1*0504 e DQB1*O201

DQ8: proteína codificada pelo alelo DRB1*04

DQ2-A: alelo DQA1*0504

DQ2-B: alelo DQB1*O201

DQ2-AB: alelos DQA1*0504 e DQB1*O201

DQ8: alelo DRB1*04

HLA-DQ: Antígeno leucocitário humano região II (DQ)

TG2: Transglutaminase humana 2

ANTI-TG2: anticorpo para Transglutaminase humana 2

ANTI-EMA: anticorpo para endomísio

ANTI- AGA: anticorpo para gliadina

IgA: Imunoglobulina A

DLG: Dieta livre de glúten

PCR: Reação em cadeia de polimerase

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

Lista de Tabelas

Projeto de pesquisa

Tabela 1 Primers Utilizados

Tabela 2 Cronograma de atividades

Tabela 3 Orçamento

Artigo original

- Tabela 1** Características sócio demográficas dos celíacos que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro /RJ, 2019
- Tabela 2** Presença de sintomas intra e extra intestinais dos celíacos que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ
- Tabela 3** Exames para Diagnóstico de Doença Celíaca celíacos que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ
- Tabela 4** Presença de outras patologias dos celíacos que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ
- Tabela 5** Características sócio-demográficas dos parentes de celíacos que frequentavam a acelbra do Rio de Janeiro /RJ, 2019.
- Tabela 6** Presença de sintomas intra e extra intestinais dos parentes de celíacos que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ
- Tabela 7** Exames para Diagnóstico de Doença Celíaca nos parentes de celíacos que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ.
- Tabela 8** Presença de outras patologias dos parentes de celíacos que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ.
- Tabela 9** Características sócio demográficas das pessoas em investigação que frequentavam a acelbra do Rio de Janeiro /RJ, 2019

Tabela 10 Presença de sintomas intra e extra intestinais das pessoas em investigação que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ.

Tabela 11 Exames para Diagnóstico de Doença Celíaca das pessoas em investigação que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ

Tabela 12 Presença de outras patologias das pessoas em investigação que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ

Tabela 13 Relação dos sintomas presentes em celíacos, parentes de celíacos e pessoas em investigação na Acelbra/RJ. Pelotas, 2022

Tabela 14 Relação das patologias presentes em celíacos, parentes de celíacos e pessoas em investigação na Acelbra/RJ. Pelotas, 2022

SUMÁRIO

1. Introdução	17
2. Capítulo I – Projeto de Pesquisa	19
2.1 Revisão Bibliográfica	19
2.2 Fisiopatologia	20
2.3 Fatores Genéticos	22
2.4 Estrutura Genética e Proteica do HLA-DQ	22
2.5 HLA-DQ2 e DQ8 na patogênese da doença celíaca	23
2.6 Aplicação Clínica do Teste HLA	23
2.7 Epidemiologia	23
2.8 Diagnóstico	25
2.8.1 Imagens Duodeno Saudável	26
2.8.2 Imagens Duodeno com Doença Celíaca	26
3. Justificativa	30
4. Objetivos	31
4.1 Objetivo Geral	31
4.2 Objetivos Específicos	31
5. Hipóteses	20
6. Materiais e Métodos	35
6.1 População Alvo e Aspectos Éticos	35
6.2 Avaliação do Perfil Clínico	35
6.3 Coleta da Amostra	35

6.4 Extração do GDNA	35
6.5 Amplificação do DNA (PCR)	35
6.6 Retorno dos Resultados e Orientações	36
6.7 Análise Estatística	36
7. Cronograma	37
8. Orçamento	38
9. Referências Bibliográficas	39
10. Relatório de campo	48
11. Capítulo II – Artigo científico	49
11.1 Resumo	50
11.2 Abstract	51
11.3 Introdução	52
11.4 Metodologia	53
11.5 Resultados e discussão	58
11.6 Conclusão	72
11.7 Referências	73
11.8 Apêndices	77
12. Referências bibliográficas	83

1. Introdução

A Doença Celíaca (DC), durante muito tempo foi vista como uma patologia geralmente pediátrica, no entanto, atualmente é definida como uma doença imunológica com manifestações sistêmicas que afetam todas as idades, afetando cerca de 1% da população mundial, sendo mais comum em indivíduos do sexo feminino. O consumo de alimentos contendo glúten, juntamente com a suscetibilidade genética através do Sistema Leucocitário Humano (HLA), são os fatores desencadeantes do desenvolvimento da doença.

Durante o desenvolvimento da doença, a mucosa perde suas vilosidades absorventes e ocorre hiperplasia das criptas entéricas, levando a uma reduzida capacidade de absorver nutrientes.

As manifestações da DC variam, podendo ocorrer desde diarreia, retardo do crescimento, anemia ferropriva, osteoporose, dermatite, até algumas neoplasias. O diagnóstico depende da suspeita clínica, levando a exames laboratoriais com testes de sorologia positiva de imunoglobulina A-transglutaminase tecidual (IgA-tTG), que se positivo deve ser confirmado por biópsia duodenal e histologia, revelando a atrofia vilositária da mucosa intestinal, método considerado o padrão ouro. A DC, no entanto, pode ser assintomática, principalmente em parentes de primeiro grau dos indivíduos portadores, o que pode ser confirmado por genotipagem do antígeno leucocitário humano (HLA) para HLA-DQ2 e HLA-DQ8, alelos que estão relacionados com a patogenicidade da doença, técnica menos invasiva que vem crescendo nos últimos anos. A DC, vai além dos sintomas gastrintestinais, podendo ocorrer um aumento do risco de malignidade e maior mortalidade.

Existe um consenso que ainda há um grande número de celíacos sem diagnóstico, provavelmente pelo amplitude das suas manifestações e também pelo conhecido ICEBERG celíaco. O desafio atualmente é conseguir estabelecer diagnósticos mais precoces, reduzindo o número e o grau de complicações da DC, estabelecendo assim uma melhor qualidade de vida dos pacientes.

A DC com sua susceptibilidade genética, constituídas pelos alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8, os parentes de primeiro grau dos celíacos poderiam apresentar

um maior risco para desenvolverem essa patologia.(WALKER & TALLEY, 2011; CATASSI et al. 2015). (MEGIORNI & PIZZUTI, 2012).

Com base no que foi descrito, este estudo avaliou a frequência desses alelos de risco em celíacos, parentes de primeiro grau de celíacos e pacientes em investigação da DC, em participantes que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ

2. Capítulo I – Projeto de Pesquisa

2.1 Definição

A DC foi descrita pela primeira vez em 1888 por Samuel Gee, no entanto foi em 1953 que o glúten foi descrito como importante fator etiológico dessa patologia (PARZANESE; 2017).

A DC então passou a ser definida como uma enteropatia autoimune mediada por anticorpos através de células T desencadeada pelo glúten, com manifestações intestinas e extra-intestinais, resultando em atrofia das vilosidades, hipertrofia das criptas, inflamação e danos ao revestimento do intestino delgado, em indivíduos portadores do antígeno leucocitário humano, HLA DQ2 / DQ8 (LUDVIGSSON et al., 2013; SHARMA et al., 2020).

Considerado fator ambiental, o glúten é uma mistura de proteínas individuais classificadas em dois grupos, as prolaminas e as gluteínas. As prolaminas tóxicas para celíacos são as gliadinas do trigo, as secalinas do centeio, as hordeínas da cevada e as aveninas da aveia. No trigo, o glúten contribui com aproximadamente 85% do teor das proteínas, restando 15% para as albuminas e globulinas. O teor de prolamina no glúten é geralmente considerado 50% (ABREU et al., 2006). Essas prolaminas apresentam propriedades imunogênicas semelhantes, resultando essa exposição em um grau variável de lesão intestinal (LUDVIGSSON, 2013).

A predisposição genética tem um papel muito importante na DC, pois sabe-se que a mesma está fortemente associada a genes de classe II do *major complex of histocompatibility* (MHC), HLA DQ2 (95%) e HLA DQ8, localizados no cromossoma 6p21; a presença de um ou ambos os genes é necessária para o desenvolvimento da doença, mas não suficiente *per se* e o risco estimado é de cerca de 40% (FERREIRA, 2018).

Esta fração proteica é largamente utilizado na indústria de alimentos, nos setores como panificação, massas, cervejas, entre outros, tendo a função de conferir elasticidade, aderência e estrutura ao alimento. O consumo desta proteína por indivíduos geneticamente predispostos, caracteriza um processo inflamatório envolvendo a mucosa do intestino delgado, levando a atrofia das vilosidades intestinais, má absorção de nutrientes e uma variedade de manifestações clínicas nestes indivíduos. Estas proteínas são resistentes às

enzimas digestivas, podendo levar a uma resposta imunogênica em pacientes com DC (SILVA, 2010).

2.2 Fisiopatologia

A DC, é caracterizada por um processo inflamatório do intestino delgado mediada por linfócitos T, em que o paciente acometido expressa um aumento da infiltração dos linfócitos nas células epiteliais chegando a uma proporção de 25/100 células. Na mucosa intestinal os peptídeos derivados das prolaminas, resistentes as proteases humanas, passam intactas no lúmen do intestino delgado, chegando na mucosa intestinal, esses peptídeos desencadeiam ativações imunológicas capazes de estimularem interleucinas 15, que por sua vez estimulam os linfócitos intraepiteliais causando os danos epiteliais. Os peptídeos do glúten, na submucosa, sofrem então desaminação pela enzima transglutaminase tecidual (ITG). Essa desaminação é que permite a ligação com o HLA-DQ2/DQ8 associados a DC, levando a ativação das células T, causando morte celular e remodelação do tecido com atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas e/ou também a maturação dos plasmócitos, produzindo anticorpos anti ITG tTG e anti gliadina, levando assim as manifestações clínicas e subclínicas dessa patologia. estudos recentes sobre a patogênese da DC, destacaram que interações cruzadas entre CD4⁺ específico para glúten, as células T e a interleucina-15 (IL-15), ativam os linfócitos intra-epiteliais citotóxicos, desencadeando assim as lesões epiteliais (RASHTAK & MURAY, 2012; CIESUNSKI, Z 2016; LUDVIGSSON et al., 2012; YUAN et al., 2013; MALAMUT, 2019).

A Figura 1 apresenta a visão clássica sobre a patogênese da DC. Os peptídeos de glúten na dieta aumentam a permeabilidade epitelial ativando a via de sinalização da zonulina, permitindo que os peptídeos de glúten atravessem a barreira epitelial. A transglutaminase tecidual 2 (TG2) desamida peptídeos de glúten, facilitando para as células apresentadoras de antígenos positivos para HLA-DQ2 / DQ8 (APC). Com a ativação da APC., a célula T CD4⁺ restrita ao HLA-DQ2 / DQ8, que por sua vez produz citocinas para atrair linfócitos intraepiteliais CD8⁺ (IEL) para atacar a mucosa intestinal, resultando em inflamação dos tecidos, apoptose enterocitária e atrofia das vilosidades. As células B são ativadas pelas células T CD4⁺ para produzir anticorpos de auto-

imunidade, incluindo anticorpos tTG, anticorpos endomísiais e anticorpos de gliadina. O papel da interleucina 15 (IL 15) é essencial na patogênese da doença celíaca (ZHU et al., 2019).

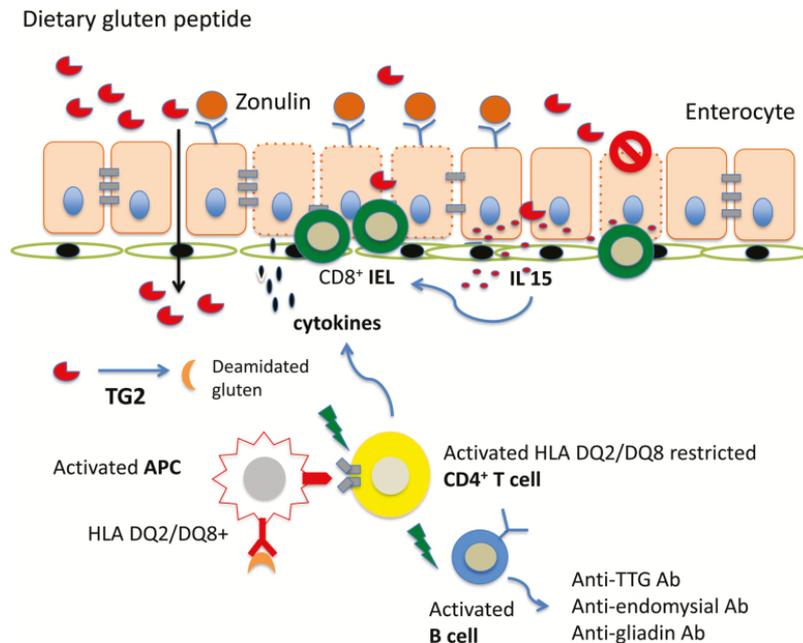


Figura 1: Patogênese da doença celíaca.

2.3 Fatores Genéticos

A doença celíaca é caracterizada por respostas restritas a HLA-DQ2/DQ8 de células T CD4 + à proteínas de glúten de cereais. O HLA-DQ é o principal locus mediador do efeito ligado ao HLA na doença celíaca, a variante DQ2 ($DQA1 * 05 / DQB1 * 02$), está presente em 95% dos indivíduos com DC, e apenas 5% dos pacientes carrega o DQ8 ($DQA1 * 03 / DQB1 * 0302$). Comparado com outras doenças associadas ao HLA, a evidência para a associação primária desta é fortemente associada para DC (SOLLID, 2005).

2.4 Estrutura genética e proteica de *HLA-DQ*

Os genes que codificam as moléculas de HLA são encontrados no complexo MHC no cromossomo 6. As moléculas de HLA envolvidas na DC são codificadas em uma região conhecida como classe II no loco do *DQ* (outros

genes da classe II incluem *DR* e *DP*). Os loci *HLA-DQA1* e *DQB1* codificam para as cadeias α e β , respectivamente, que se associam como heterodímeros na superfície da APC, formando uma fenda que liga antígenos peptídicos. APC, célula apresentadora de antígeno; HLA, antígeno leucocitário humano; MHC, principal complexo de histocompatibilidade.

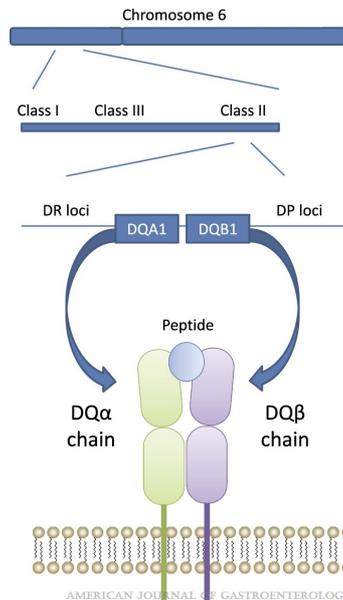


Figura 2. Estrutura de HLA - DQ

2.5 HLA-DQ2 e DQ8 na patogênese da DC

As moléculas de HLA-DQ são responsáveis pela apresentação de antígenos peptídicos às células T CD4⁺. Cada tipo de HLA apresenta um conjunto diferente de antígenos peptídicos, com base na sequência de aminoácidos presente na região de ligação peptídica do heterodímero, sendo assim HLA-DQ2 e o DQ8 apresentam peptídeos específicos derivados do glúten, antes de se ligar ao DQ2 ou DQ8, os peptídeos de glúten nativos são convertidos em partículas carregadas negativamente no intestino, na qual é chamada de desaminação feita pela transglutaminase 2 do tecido (TG2). As células apresentadoras de antígeno apresentam glúten desaminado ligado ao HLA-DQ2 ou DQ8 para provocar uma resposta de células T CD4⁺ específica ao glúten, iniciando a inflamação e gerando a DC, no entanto esse processo patogênico não é ativo na maioria dos indivíduos que codificam DQ2 ou DQ8, pois apenas aproximadamente 3% dos indivíduos positivos para DQ2 ou DQ8

desenvolvem doença celíaca. Nos casos em que ambos DQ2 e DQ8 forem detectados, a DC pode ser descartada, pois não há codificação nenhum desses alelos. Indivíduos que apresentam como positivos para DQ2 ou DQ8, significa que o paciente é apenas permissivo para DC, essa positividade indica que o indivíduo é capaz de ter ou desenvolver doença celíaca. Portanto, o alto valor preditivo negativo da tipagem HLA se torna uma parte importante da investigação da DC (BROWN, 2019).

2.6 Aplicação clínica do teste de HLA

O teste HLA deve ser considerado para exclusão da doença, para apoiar o diagnóstico da DC e para identificar parentes de primeiro grau em risco, mostrando-se presentes mesmo em uma dieta sem glúten. Um resultado de HLA-DQ2 e / ou DQ8 é sugestivo para a doença celíaca, no entanto exames adicionais são necessários para diagnosticar esta doença. Porém atualmente sabe-se que se o HLA-DQ2 ou DQ8 estiver ausente, a DC é improvável e a triagem de anticorpos não é necessária (BROWN, 2019; SCIURTI, 2018).

2.7 Epidemiologia

A DC, tem se mostrado mais frequente em toda população mundial com incidência de aproximadamente de 1% desta população. Estudos recentes mostraram que a DC também é uma doença comum nos países em desenvolvimento como Oriente Médio, Sul da Ásia, África e América do Sul. No Brasil, a prevalência de DC mostrou variação significativa, provavelmente devido aos diferentes graus de miscigenação étnica que compõem essa população. Os estudos realizados durante a última década em distintas regiões brasileiras mostraram taxas de prevalência variando de 1: 214 a 1: 681 em doadores de sangue presumivelmente saudáveis e de 1: 119 a 1: 417 na população geral. A variação geográfica nas taxas de prevalência também pode ser devida a diferenças no background genético, diferenças de exposição ao glúten relacionadas à idade e / ou a alterações nos fatores de risco ambientais. Devido ao padrão amplamente variável de seu espectro clínico, o diagnóstico confirmatório de DC pode não ser feito em um primeiro momento, ficando o paciente sem diagnóstico por vários anos (ALMEIDA, 2013).

A FIGURA 3, demonstra bem esse quadro epidemiológico, onde apenas uma parte dos doentes possui a doença clínica realmente diagnosticada, levando a essa evolução de afirmações da crescente mundial. Como a maioria dos indivíduos apresentam a DC silenciosa e assintomática tornando o diagnóstico mais difícil. A doença celíaca, geralmente acomete mais crianças de 6 meses a 5 anos de idade, no entanto pode ocorrer em qualquer idade, sendo mais comum nos adultos a partir da quinta década. O sexo feminino é o mais afetado tendo uma prevalência de 3:1 em relação ao sexo masculino. (QUEIROZ et al., 2004; RITO NOBRE, 2007; PARZANESE, 2017;).

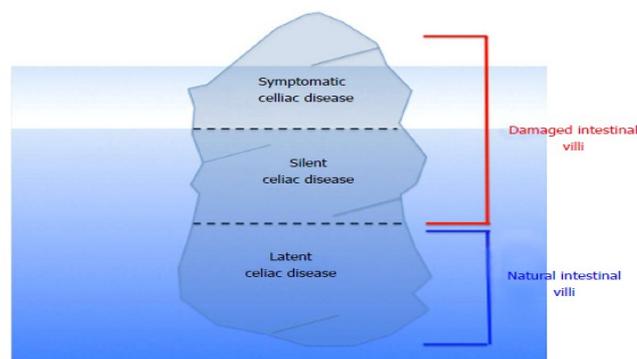


Figura 3: O "modelo de iceberg" idealizando a interação entre a composição genética da doença celíaca e a exposição ao glúten, o gatilho ambiental da doença (WALKER & TALLEY, 2011; CATASSI et al. 2015)

2.8 Diagnóstico

Os distúrbios relacionados ao glúten, desde a DC, alergia ao trigo e sensibilidade não celíaca ao glúten, apresentam uma epidemiologia bem relevante, com uma prevalência global estimada de aproximadamente 5%. Embora esses distúrbios tenham vias patogênicas bem características no seu desenvolvimento, apresentam manifestações clínicas muito semelhantes, o que tornam seus diagnósticos difíceis. Para chegar num diagnóstico efetivamente correto, é necessária uma abordagem bem específica, combinando a história clínica do paciente, sintomas, testes sorológicos e histológicos.

A DC pode ter o diagnóstico tardio, o que pode influenciar de forma negativa a adesão dos portadores à terapia nutricional, já que representa inúmeros alimentos nocivos. A taxa de diagnóstico da DC está aumentando em

todo o mundo, devido a grande parte de uma maior valorização da variabilidade na apresentação clínica. Até a década de 1950, a DC era diagnosticada com base em observações clínicas focadas em características de má absorção, a partir de 1955/1956, com o desenvolvimento da biópsia intestinal é que houve uma mudança substancial no paradigma do diagnóstico da DC. Desde então, a enteropatia dependente de glúten, com base na avaliação histológica da mucosa intestinal, tem sido o "padrão ouro" e definitivo para o diagnóstico da DC.

Na década de 1980, foram desenvolvidos testes sorológicos sensíveis e específicos dos níveis de anticorpos para a doença celíaca, que são a anti-transglutaminase 2 (anti-TG2) e antiendomísio (anti-EMA) e caso necessário para anti-gliadina (anti-DGP), essa no entanto é menos específica.

Atualmente estes testes são usados como o primeiro critério de análise quando há suspeita de DC, caso os indivíduos apresentem esta sorologia positiva é que devem ser submetidos à análise de biópsia intestinal, onde alterações histológicas características como atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas. Há também os marcadores genéticos HLA-DQ2 e / ou HLA-DQ8, antígenos leucocitários presentes nos indivíduos com DC. KASWALA, 2015; KELLY, 2015; POPP, 2019).

A DC se manifesta de diferentes maneiras, desde sintomas gastrointestinais sem causa aparente, como também aqueles indivíduos que apresentam síndrome do intestino irritável, diarreia crônica, dermatites, anemia ferropriva sem causa aparente, são candidatos a uma investigação mais detalhada sobre o possível diagnóstico positivo para DC (FORD, 2009).

Durante o exame de endoscopia digestiva alta, são realizadas pelo menos quatro biópsias duodenais, as alterações microscópicas encontradas são classificadas em uma análise histológica e alterações compatíveis com DC são avaliadas e descritas de acordo com a infiltração linfocitária, padrão das criptas e a atrofia vilositária. Para realizar esta classificação é utilizada os critérios de Marsh, proposta em 1992, e é a mais utilizada ainda hoje.

Os sintomas do paciente frequentemente correlacionam-se com o grau de lesão tecidual. As alterações descritas são:

•**Marsh I:** lesão infiltrativa; arquitetura vilosa e mucosa normal; aumento de LIE (>30-40 linfócitos por 100 enterócitos contados).

•**Marsh II:** lesão hiperplásica; semelhante ao Marsh I, mas apresenta também hiperplasia de criptas.

•**Marsh III:** lesão destrutiva; subdividido em IIIa - atrofia vilosa parcial; IIIb - atrofia vilosa subtotal e IIIc - atrofia vilosa total. (SILVA, 2010; U VOLTA, 2011.)

Em contrapartida em 2012, foi proposto pela Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN), que para diagnosticar a DC em pacientes pediátricos com sintomas consistentes de DC, sem a necessidade de confirmação pela biópsia, utilizasse o algoritmo ESPGHAN, onde este sugere que valores 10 vezes acima de IgAtTG normal, assim como marcadores genéticos HLA DQ2 e DQ8, já seriam suficientes para tal diagnóstico (HUSBY et al., 2012).



Figura 4. Imagem real do duodeno saudável. Fonte: DOS SANTOS, 2020.(imagens cedidas)



Figura 5. Imagem real do duodeno acometido com Doença Celíaca. Fonte: DOS SANTOS, 2020.(imagens cedidas)

2.9 Classificação e tratamento

A classificação da DC, são variáveis dependendo do indivíduo, com isso pode receber, além da classificação de Marsh, uma distinção de acordo com os tipos de sintomas declarados. Portanto a DC pode ser classificada como :

1. **Doença celíaca clássica típica:** os sintomas dessa forma de DC são encontrados em <50% dos pacientes, como diarreia, perda de peso, dor e desconforto abdominal e fadiga, manifestando-se entre 6 a 24 meses de idade.
2. **Doença celíaca atípica:** normalmente os portadores de DC nessa condição não apresentam distúrbios gastrointestinais e sim extraintestinais como deficiência de ferro, fadiga, enzimas hepáticas elevadas ou infertilidade. Acredita-se que a forma de DC atípica é responsável pela maior proporção dos pacientes diagnosticados, ocorrendo principalmente entre crianças com idade superior a 24 meses, adultos e idosos.
3. **Doença celíaca silenciosa:** forma de DC assintomática apesar de apresentar evidência sorológica e histológica de DC, normalmente está presente em indivíduos com antecedentes familiares de DC, doenças autoimunes associadas como Diabetes Mellitus tipo 1 , distúrbios genéticos como síndrome de Down, Turner ou Williams. Existe um consenso que esta forma esteja presente em pelo menos 20% dos indivíduos portadores dessa patologia, na qual na grande maioria das vezes são diagnosticados através de rastreamentos populacionais.
4. **Doença celíaca não responsiva:** mesmo com uma dieta livre de glúten os sintomas clínicos como também anormalidades laboratoriais típicas da DC aparecem inalterados ou recorrentes.
5. **Doença celíaca refratária:** diagnóstico específico dentro da categoria de DC não responsiva, mantem a persistência dos sintomas clínicos e anormalidades histológicas após pelo menos 6 meses de uma dieta livre de glúten, bem como ausência de outros fatores predisponentes,

acomete cerca de 1% dos portadores de DC. (LUDVIGSSON et al., 2012; LIONETTI et al., 2011; TULLY et al., 2008; PARZANESE et al., 2017).

Nos últimos anos pesquisas realizadas a outras formas de tratamento da DC que não a Dieta Livre de Glúten (GFD) estão sendo estudadas, no entanto a GFD continua sendo o único tratamento eficaz disponível até o momento (ITZLINGER, 2018).

A adesão a GFD leva à melhora dos sintomas intestinais e extra-intestinais, também a ausência de autoanticorpos, juntamente o retorno do crescimento das vilosidades intestinais, bem como um efeito protetor parcial para várias complicações. Esta dieta pode, no entanto além de oferecer as vantagens descritas acima, também oferecer algumas desvantagens como redução da qualidade de vida, gerada pela aceitação à doença, a restrição alimentar e distúrbios psicológicos relacionados ao medo de contaminação involuntária, através do consumo de alimentos contaminados, sejam eles pela forma de armazenamento, como também através da produção sem o devido controle necessário. Por esse motivo, a GFD deve ser prescrita somente quando o diagnóstico de DC for estabelecido por meio de sorologia e histologia duodenal conforme protocolo baseado nas evidências. Em indivíduos com CD sintomática a dieta deve ser reservada aqueles que referem sintomas, pois existe o risco de desenvolverem às complicações e consequências comuns da DC que vão desde o risco de osteoporose, má absorção até tumores malignos, enquanto os assintomáticos podem ser mantidos em uma dieta contendo glúten, pois a literatura atual não oferece evidências suficientes para retirada de glúten total da dieta, no entanto é necessário manter o acompanhamento regular (TYE-DIN, 2018).

Ultimamente, cientistas buscam além da GFD, outras formas de tratamento a DC, muitos estudos estão sendo realizados, como o acetato de larazotida e proteases específicas ao glúten, que teriam como mecanismo de ação impedir que o glúten atravessasse a barreira intestinal. Já as proteases visariam a degradação do glúten em fragmentos menores no estômago, antes destes chegarem ao duodeno. Também existem estudos com anticorpos monoclonais da IL-15 e também uma vacina como estratégias terapêuticas para promover a redução à sensibilidade ao glúten pelos peptídeos de gliadina.

Apesar desses estudos apresentarem alguns benefícios aos indivíduos com DC, eles apresentam alguns efeitos colaterais importantes e também nenhum deles tem uma eficácia totalmente satisfatória a ponto de sugerir que estes indivíduos passem a ter uma dieta contendo glúten sem o risco de apresentarem sintomas e alterações da doença (CAIO, 2019).

3- Justificativa

A genotipagem do HLA-DQ é indicada pela ESPGHAN, para rastreamento de possíveis candidatos à DC. Sabe-se que a distribuição desse marcador genético varia entre 30- 40% na população em geral, no entanto em celíacos a prevalência pode ser de até 95%, e outros fatores genéticos completariam a predisposição a esta patologia. Estudos estão emergindo com o propósito de elucidar a real contribuição do HLA-DQ no desenvolvimento da DC em diferentes grupos populacionais de celíacos. Além de, buscar associação de fatores genéticos que possuem maior associação com o desenvolvimento da doença, bem como, investigar associação com grau de lesão intestinal. O esclarecimento dos fatores genéticos envolvidos e a sua prevalência entre celíacos podem determinar o mecanismo pelo qual a DC se desenvolve em diferentes populações. Além disso, traçar um perfil de prevalência de fatores genéticos predisponentes pode fomentar uma maior utilização destes testes, bem como o conhecimento de uma possível relação dos alelos com a gravidade da doença possam auxiliar na prática clínica.

4- OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Determinar a prevalência dos genótipos HLA-DQ2 (DQA1*0504 e DQB1*O201) e HLA-DQ8 (DRB1*04) e associar a presença dos alelos com o grau de lesão intestinal em celíacos e sintomatologia em parentes de primeiro grau.

4.2 Objetivos Específicos

Verificar a frequência dos alelos HLA- DQ2 (DQA1*0504 e DQB1*O201) e HLA-DQ8 (DRB1*04) e em celíacos e seus parentes de primeiro grau;

Verificar associação entre os haplotipos DQ2 (DQA1*0504 e DQB1*O201) e DQ8 (DRB1*04) e grau de lesão intestinal (Classificação de Marsh) em celíacos;

Verificar associação entre os haplotipos DQ2 (DQA1*0504 e DQB1*O201) e DQ8 (DRB1*04) e outras doenças auto-imunes em celíacos;

Verificar associação entre os haplotipos DQ2 (DQA1*0504 e DQB1*O201) e DQ8 (DRB1*04) e sintomatologia de Doença Celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos;

Verificar associação entre os haplotipos DQ2 (DQA1*0504 e DQB1*O201) e DQ8 (DRB1*04) e outras doenças auto-imunes em parentes de primeiro grau de celíacos.

5- Materiais e Métodos

5.1 População Alvo e Aspectos Éticos

Trata-se de um estudo descritivo, do tipo transversal, que será realizado na Associação de Celíacos do Brasil do Rio de Janeiro (ACELBRA-RJ), entidade de iniciativa popular e sem fins lucrativos. Será realizado o rastreamento de alelos HLA-DQ2 (DQA1*0504 e DQB1*0201) e HLA-DQ8 (DRB1*04) entre os celíacos cadastrados na associação e que frequentam as reuniões da ACELBRA- RJ. Será realizado convite por e-mail e divulgação em meios de comunicação, tais como, o site da ACELBRA-RJ. Será esclarecido aos participantes e/ou responsáveis os objetivos do estudo e parâmetros éticos, sobre a confidencialidade, para manter a privacidade dos sujeitos e os dados obtidos foram mantidos em sigilo e somente os resultados serão usados para fins de pesquisa. Também será informado de que não existem riscos no estudo e o benefício de participar na pesquisa é o fato de auxiliar no embasamento da utilização da genotipagem para predisponentes à DC. Os participantes serão selecionados de forma não aleatória, por critério de conveniência. Para o cálculo do tamanho da amostra será feito contato com a ACELBRA/RJ para verificar quantos celíacos estão cadastrados, e será calculado de acordo com o programa G*Power, serão incluídos indivíduos de qualquer idade, desde que apresente diagnóstico confirmado de DC parentes de celíacos e também indivíduos em investigação. Será explicado o objetivo e todas as etapas do estudo à diretoria da ACELBRA/RJ (APÊNDICE A) o qual, concordando, o presidente da associação assinará a Carta de Anuência, consentindo com a realização da pesquisa no local.

A participação dos celíacos neste estudo será voluntária e poder-se-ia interrompê-la a qualquer momento. Estando ciente de que a identidade dos celíacos e/ou responsáveis permaneceram confidenciais durante todas as etapas do estudo, aqueles que aceitarem participar após as explicações, assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE; APÊNDICE B), regulamentando a participação no estudo. O projeto de pesquisa já foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Medicina, de acordo com as normas estabelecidas pela Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 e visou atender

ao código de Ética dos Nutricionistas que dispõe que as atividades sejam executadas com cautela a prevenir a ocorrência de riscos ou prejuízos aos indivíduos.

A pesquisa e coleta de dados só será realizada após aprovação do projeto pelo CEP e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pelos celíacos ou responsáveis. 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. Os dados serão mantidos por 5 (cinco) anos em pasta protegida, sem identificação de qualquer participante, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

6.2 Avaliação do Perfil Clínico

A fim de avaliar o perfil dos celíacos do estudo foi adaptado um questionário já validado e testado na mesma população, constituído de questões abertas e fechadas (CASSOL et al., 2007; APÊNDICE C). O questionário aborda dados de identificação, bem como critérios de investigação sobre origem dos participantes. Também foi questionado sobre a sintomatologia apresentada pelos celíacos antes do diagnóstico e patologias associadas a DC. Para avaliar a fidelidade do diagnóstico da DC nesses pacientes, também foi questionado o método pelo qual o paciente obteve o diagnóstico: biópsia, testes sorológicos e genotipagem de alelos HLA. O questionário foi aplicado por pesquisador previamente treinado, juntamente com coleta da saliva, após preenchimento do termo do TCLE.

6.3 Coleta da Amostra

Todos os celíacos que concordarem em participar do estudo e assinarem o TCLE, terão suas salivas coletadas no momento das reuniões da ACELBRA/RJ ou local previamente definido. Para a coleta de saliva, o indivíduo enxaguará a boca com água tratada e esfregará o swab várias vezes entre as duas bochechas. Após, o swab será fechado e identificado com o número do indivíduo

e armazenado em caixa térmica com gelo. Esse procedimento de coleta de saliva deve ser realizado em duplicada para eventuais necessidades de repetir as análises. Neste mesmo momento foi aplicado o questionário, previamente validado, com o objetivo de caracterizar a amostra.

6.4 Extração do GDNA

O swab contendo a saliva e células de descamação do participante será encubado em um tubo de 2mL, com 600 µL de solução de lise e 8 µL de proteinase K por 40 minutos a 55 °C. Após este processo será realizada a centrifugação a 16000 por um minuto e em seguida é retirado o algodão. Após, adicionam-se 200 µL de solução de precipitação de proteína e leva-se ao vortex durante 20 segundos e em sequência a amostra é centrifugada a 16000 por três minutos. O sobrenadante é salvo em um novo tubo de 1,5 mL. A precipitação dos ácidos nucleicos é feita pela adição de 600 µL de isopropanol, seguida de centrifugação a 16000 g por 15 minutos. O pellet formado é lavado sequencialmente duas vezes pela adição de etanol 70% e centrifugação. Após secar a temperatura ambiente por 10 minutos, o DNA é diluído com 30 µL de solução de hidratação. Desta amostra, de 1 a 5 µL são suficientes para a realização da análise dos polimorfismos pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando primers específicos para o reconhecimento para os alelos de Doença Celíaca. Método de extração de gDNA adaptado do método descrito por MILLER, DYKES e POLESKY (1988).

6.5 Amplificação do DNA (PCR)

Os alelos que serão amplificados neste estudo serão o DQA1*0504 e DQB1*0201 (DQ2) e DRB1*04 (DQ8). A reação de amplificação será realizada em volume final de 25 µl contendo 0.2mmol/L de dNTPs, 2.0mmol/L de MgCl₂, 0.4µmol/L de cada iniciador, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®) e 100ng de DNA genômico. As amostras serão inicialmente desnaturadas a 95 °C por 5 minutos e, em seguida, submetidas a 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 45 segundos, anelamento a 56 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 30 segundos seguidos de extensão final de 72 °C por 30 segundos. Para confirmação do

tamanho do fragmento amplificado, 10µl do produto da PCR serão aplicados em gel de agarose a 1% e submetidos à eletroforese horizontal em tampão de corrida TBE. Como marcador de peso molecular, serão utilizados 100pb DNA Ladder® (Biolabs). A visualização do DNA será realizada com Syber Safe (Invitrogen®) em transiluminador com luz ultravioleta. Método de amplificação de DNA baseado no método descrito por CAMBIEN et al. (1992). Os primers que foram utilizados estão representados na Tabela 1.

Primer	Sequência	Comprimento dos produtos da PCR (bp)
DQA1*0501	5'-AGCAGTTCTACGTGGACCTGGGG-3' 5'-GGTAGAGTTGGAGCGTTTAATCAGA-3'	144
DQB1*0201	5'-CGCGTGCGTCTTGTGAGCAGAAG-3' 5'-GGCGGCAGGCAGCCCCAGCA-3'	110
DRB1*04	5'-GGTAAACATGAGTGTCAATTTCTAAAC-3' 5'-GTTGTGTCTGCAGTAGGTGTC-3'	177
AC-1	5'-CGAAACCCAGTCCCCACCCG-3' 5'-CCTCCATACCCAGTGCCC-3'	238
AC-2	5'-GCAGAGTACCTGAAACAGGA-3' 5'-CATTACAGTAGCTTACCCA-3'	491

pb: pares de base; * DQA1*0501 e DQB1*0201 para DQ2;* DRB1*04 para DQ8; AC1 e AC2 usado para controle de amplificação. Adaptado de Sacchetti, 1997.

6. 6 Retorno dos Resultados e Orientações

Após a análise dos resultados, os dados serão repassados aos participantes, primeiro por e-mail individualmente, com o resultado de cada participante, depois por palestra sobre os dados encontrados na pesquisa, realizando uma comparação do que foi encontrado em outros estudos e populações, por meio de palestra. Neste mesmo momento, serão abordados ainda, temas relevantes para a qualidade na alimentação, enfatizando a importância de uma dieta isenta de glúten e o cuidado com contaminação cruzada.

6.7 Análise Estatística

A análise de dados será realizada por meio do software STATA® e Microsoft Office Excel® 2010. As frequências dos alelos serão comparadas usando o teste de Fisher. O nível de significância estabelecido foi de $p < 0.05$.

7- CRONOGRAMA

A programação das atividades do projeto está ilustrada na Tabela 3. A revisão bibliográfica ocorrerá durante todo o período da pesquisa com propósito de atualização sobre novas evidências em relação ao tema abordado. Inicialmente o projeto será qualificado e enviado ao comitê de ética em pesquisa, dada a apreciação, se iniciará a coletas das amostras de saliva e aplicação dos questionários. Após a conclusão desta etapa serão realizadas as análises estatísticas e início da elaboração do artigo para publicação e da dissertação. Concluída a parte teórica do projeto, será realizada a defesa.

Tabela 2: Cronograma das atividades do projeto

	2020											2021				
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D		J	F	M	A	M
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X					
Qualificação									X							
Envio para Comite de Ética										X						
Extração de DNA	X															
Identificação dos alelos	X															
Análises estatísticas	X											X				
Elaboração do artigo													X			
Elaboração da Dissertação														X		
Defesa												X				X

8 - ORÇAMENTO

Os custos com os materiais necessários ao projeto de pesquisa serão buscados nos órgãos de fomento à pesquisa, por meio de editais e por recursos próprios. O delineamento dos custos do projeto pode ser visualizado na Tabela 4.

Tabela 3: Orçamento dos custos do projeto

Materiais	Custos
Primers e reagentes da PCR	R\$ 2000,00
Reagentes	R\$ 150,00
Swabs	R\$ 200,00
Xerox	R\$ 30,00
Total	R\$ 2380,00

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

LUDVIGSSON, Jonas F et al. "The Oslo definitions for coeliac disease and related terms." *Gut* vol. 62,1 (2013): 43-52. doi:10.1136/gutjnl-2011-301346

SHARMA, Natasha et al. "Pathogenesis of Celiac Disease and Other Gluten Related Disorders in Wheat and Strategies for Mitigating Them." *Frontiers in nutrition* vol. 7 6. 7 Feb. 2020, doi:10.3389/fnut.2020.00006

ABREU, Rejane W. de et al. Detection of gluten in foods by means of ELISA *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)* [online]. 2006, vol.65, n.3, pp. 176-180. ISSN 0073-9855.

LUDVIGSSON JF, Rubio-Tapia A, van Dyke CT, Melton LJ, Zinsmeister AR, Lahr BD, et al. Increasing incidence of celiac disease in a North American population. *The American journal of gastroenterology*. 2013 May 19;108(5):818–24.

FERREIRA, Fátima & Inácio, Filipe. Pathology associated with wheat: IgE and non-IgE mediated allergy, celiac disease, non-celiac hypersensitivity, FODMAP (Fermentable, Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides and Polyols). (2018). *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*. 26. 171-187

SILVA, Tatiana Sudbrack da Gama e; FURLANETTO, Tania Weber. Diagnóstico de doença celíaca em adultos. *Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo*, v.56, n.1, p.122-126, 2010.

RASHTAK S, Murray JA. Review article: coeliac disease, new approaches to therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(7):768-781.

CIESUNSKI, J. Z; Kotze, Lorete Maria da Silva; Utiyama, Shirley Ramos da Rosa. Celiac disease treatment; state of the art. ***GED gastroenterol. endosc. dig*** ; 35(3): 114-121, jul.-set. 2016. *Ilustrado*. Artigo em Português | LILACS | ID: biblio-2446

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

YUAN, J., GAO J.; LI, X.; LIU, F.; WIJMENGA, C.; CHEN, H., et.al. The Tip of the "Celiac Iceberg" in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. (2013)

MALAMUT G, Cording S, Cerf-Bensussan N. Recent advances in celiac disease and refractory celiac disease. *F1000Res*. 2019; 8:F1000 Faculty Rev-969. Published 2019 Jun 26. doi:10.12688/f1000research.18701.1

ZHU,Julie et al.“Celiac Disease: Against the Grain in Gastroenterology.” *Journal of the Canadian Association of Gastroenterology* vol. 2,4 (2019): 161-169. doi:10.1093/jcag/gwy042

SOLLID LM, Lie BA. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *ClinGastroenterol Hepatol*. 2005;3(9):843-851.

BROWN NK, Guandalini S, Semrad C, Kupfer SS. A Clinician's Guide to Celiac Disease HLA Genetics. *Am J Gastroenterol*. 2019;114(10):1587-1592.

SCIURTI M, Fornaroli F, Gaiani F, et al. Genetic susceptibility and celiac disease: what role do HLA haplotypes play?. *Acta Biomed*. 2018;89(9-S):17-21. Published 2018 Dec 17

ALMEIDA LM, Castro LC, Uenishi RH, et al. Diminuição da prevalência de doença celíaca em idosos brasileiros. *World J Gastroenterol* . 2013; 19 (12): 1930-1935. doi: 10.3748 / wjg.v19.i12.1930

NOBRE, S. Rito; SILVA, T. e CABRAL, J.E. Pina. Doença celíaca revisitada. *J Port Gastreterol*. [online]. 2007, vol.14, n.4 [citado 2020-06-14], pp.184-193.

QUEIROZ, MS et al. Prevalência de doença celíaca em crianças brasileiras de baixa estatura. *Braz J Med Biol Res* [online]. 2004, vol.37, n.1

POPP A, Kivelä L, Fuchs V, Kurppa K. Diagnosing Celiac Disease: Towards Wide-Scale Screening and Serology-Based Criteria?. *Gastroenterol Res Pract*. 2019;2019:2916024. Published 2019 Aug 6.

KELLY CP, Bai JC, Liu E, Leffler DA. Advances in diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*. 2015 May;148(6):1175–86.

KASWALA DH, Veeraraghavan G, Kelly CP, Leffler DA. Celiac Disease: Diagnostic Standards and Dilemmas. *Diseases*. 2015;3(2):86-101. Published 2015 Jun 16.

FORD AC, Ching E, Moayyedi P. Meta-analysis: yield of diagnostic tests for coeliac disease in dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009 Jul;30(1):28-36.

VOLTA U, Villanacci V. Celiac disease: diagnostic criteria in progress. *Cell Mol Immunol*. 2011;8(2):96-102.

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

LUDVIGSSON, F. J.; LEFFLER, A. D.; BAI, J. C.; BIAGI, F.; FASANO, A. et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. Original Article. 2012.

LIONETTI, E.; Catassi, C. New Clues in Celiac Disease Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. *International Reviews of Immunology*. v.30. p.219–231. 2011.

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

ITZLINGER A, Branchi F, Elli L, Schumann M. Gluten-Free Diet in Celiac Disease- Forever and for All?. *Nutrients*. 2018;10(11):1796. Published 2018 Nov 18.

TYE-DIN JA, Galipeau HJ, Agardh D. Celiac Disease: A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel Therapies. *Front Pediatr*. 2018;6:350. Published 2018 Nov 21.

CAIO G, Volta U, Sapone A, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med*. 2019;17(1):142. Published 2019 Jul 23

Guia do Clínico para a Doença Celíaca HLA Genetics/American Journal of Gastroenterology 114 (10): 1587-1592, outubro de 2019.

APÊNDICE A

Carta de autorização da ACELBRA



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

OFÍCIO PARA AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA PARA REALIZAÇÃO DE DISSERTAÇÃO NA ASSOCIAÇÃO DE CELÍACOS DO BRASIL

Prezado (a) Senhor (a):

Venho por meio deste solicitar sua autorização para a realização do estudo intitulado: "Análise da Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em celíacos e seus parentes de primeiro grau" nessa instituição.

Esse estudo será desenvolvido por alunos e professores do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da UFPel, sob orientação da Professora Dra. Fabiana Torma Botelho e Professor Dr. Carlos Castilho de Barros. O objetivo desse estudo é rastrear a presença de alelos HLA DQ2 e DQ8 da Doença Celíaca (DC) entre os celíacos e seus parentes de primeiro grau. A análise dos alelos será realizada pela coleta de saliva dos celíacos vinculados a ACELBRA, que serão encaminhadas para o Laboratório de Nutriflogênica da Faculdade de Nutrição/UFPel, para posterior análises dos alelos no DNA. Realizando as análises dos alelos, teremos a prevalência dos genes envolvidos na DC dentre os participantes. Esses resultados irão contribuir para determinar a prevalência dos genes entre os celíacos estudados, além de possibilitar comparação com achados de outros estudos, bem como, elucidar o papel da genotipagem como uma ferramenta nas etapas da investigação da DC. 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 dados/resultados do estudo serão retornados para os seus participantes.

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

Atenciosamente,

João Luis Ricalde Gervasio - Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, UFPel. Telefone: (53) 99705-6988, e-mail: jlgervasio@yahoo.com.br, Fabiana Torma Botelho – Prof. da Faculdade de Nutrição da UFPel. Telefone: (53) 8105.0759, e-mail: fabibotelho@hotmail.com e Carlos Castilho de Barros – Prof. da Faculdade de Nutrição da UFPel, e-mail: barrosccpel@gmail.com.

Considerando as informações acima, confirmo ter sido informado (a) por escrito e verbalmente dos objetivos desta pesquisa. Desta forma, Eu _____, responsável pela Associação Brasileira de Celíacos do Brasil, Rio de Janeiro (ACELBRA-RJ), autorizo a realização desta pesquisa nessa instituição.

Assinatura e carimbo

APÊNDICE B

Termo de consentimento livre e esclarecido para celíacos ou responsáveis

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisadores responsáveis: João Luis Ricalde Gervasio, Fabiana Torma Botelho e Carlos Castilho de Barros. **Instituição:** Universidade Federal de Pelotas. **Endereço:** Rua Gomes Carneiro, nº 1. Centro. Pelotas – RS Telefone: (53) 8105.0759.

Concordo que meu (minha) filho (a) OU _____ participe do estudo **“Análise da Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em celíacos e seus parentes de primeiro grau”**. Que tem por objetivo determinar a prevalência dos genótipos HLA-DQ2 (DQA1*0504 e DQB1*0201) e HLA-DQ8 (DRB1*04) e associar a presença dos alelos com o grau de lesão intestinal em celíacos.

O rastreamento dos alelos será realizado pela coleta de saliva para posterior identificação em laboratório. Para isso, no primeiro encontro meu filho(a) OU _____ precisará coletar saliva que irá consistir em enxágue da boca com água tratada e posterior coleta de saliva com cotonete de cabo alongado, esfregando várias vezes nas bochechas e responderei a um questionário sobre meus dados clínicos.

Fui informado que a justificativa para realização desse estudo se baseia na necessidade da identificação de fatores genéticos prevalentes na DC com o propósito de evidenciar fatores desencadeadores envolvidos. Fui ainda, informado que receberei retorno sobre as análises dos alelos realizadas, bem como orientações nutricionais que possibilitem melhoria na qualidade de vida, por meio de palestra. Recebi a informação de que não existem riscos no estudo e o benefício de participar na pesquisa é o fato que os resultados serão incorporados ao conhecimento científico e posteriormente a situações de ensino-aprendizagem, além de contribuir para uma maior divulgação da DC. Como já me foi dito, a participação de meu (minha) filho(a) ou _____ neste estudo será voluntária, não havendo nenhuma forma de recompensa lucrativa em participar da pesquisa e poderei interrompê-la a qualquer momento e que os resultados serão usados somente para fins de pesquisa, sendo que as nossas identidades permanecerão confidenciais 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) 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: __/__/__

Testemunha nome e assinatura: _____

Data: __/__/__

Além de autorizar que meu (minha) filho (a) ou _____ participe da pesquisa, com coleta de saliva e preenchimento de questionário, autorizo também os pesquisadores a armazenar o questionário e saliva concedidos por mim para análises posteriores.

Assinatura do responsável _____

Testemunha: _____ Data: __ / __ / __

.....

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

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: João Luis Ricalde Gervasio, contatos: (53) 99705-6988 ou por e-mail jlgervasio@yahoo.com.br, Carlos Castilho de Barros e Fabiana Torma Botelho (Faculdade de Nutrição. Campus Porto. Rua Gomes Carneiro, nº 1), contatos: (53) 8105.0759/8405.5627 fabibotelho@hotmail.com.

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL: _____

DATA: __ / __ / __

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisadores responsáveis: João Luis Ricalde Gervasio, Carlos Castilho de Barros e Fabiana Torma Botelho. **Instituição:** Universidade Federal de Pelotas. **Endereço:** Rua Gomes Carneiro, nº 1. Centro. Pelotas – RS Telefone: (53) 8105.0759.

Eu _____ concordo em participar da pesquisa “Estudo prevalência dos alelos de risco do complexo HLA DQ2 (DQA1*0504 e DQB1*0201) e DQ8 (DRB1*04) em pacientes celíacos do sul do país”. Que tem por objetivo determinar a prevalência dos genótipos HLA-DQ2 (DQA1*0504 e DQB1*0201) e HLA-DQ8 (DRB1*04) e associar a presença dos alelos com o grau de lesão intestinal em celíacos.

O rastreamento dos alelos será realizado através da saliva para posterior análise em laboratório. No primeiro encontro, será preciso coletar minha saliva, após um enxágue da boca com água tratada e posterior coleta de saliva com cotonete de cabo alongado, esfregando várias vezes nas bochechas e responderei a um questionário sobre meus dados clínicos. Terei um segundo encontro, onde irei obter os resultados e orientações educativas.

APÊNDICE C
QUESTIONÁRIO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS
PESQUISA: "Análise da Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em celíacos e seus parentes de primeiro grau

Pesquisadores responsáveis: Prof Dr. Carlos Castilho de Barros e Profª Dra. Fabiana Torma Botelho
Pesquisadores Principais: João Luis Ricalde Gervasio

1- Nome do associado: _____

2- Data de nascimento: ___/___/___

3- Sexo: () masculino () feminino

4- Cor: () branca () mulata () negra () amarela

5- Você considera sua origem:

() italiana () brasileira () alemã () portuguesa

() espanhola () asiática () outras: _____ () não sei

6- Você tem algum familiar com doença celíaca? () sim () não () não sei

Se sim, qual o grau de parentesco? _____

7- Qual era sua idade na época em que foi diagnosticada a doença celíaca: _____

8- Quanto tempo você levou para obter o diagnóstico da doença celíaca (da investigação ao diagnóstico) _____

9- Assinale se você apresentou esses sintomas antes do diagnóstico:

() aftas

() anemia

() diarreia

() emagrecimento

() dor abdominal

() barriga inchada

() constipação (“prisão de ventre”)

() lesões de pele

() dificuldade em ganhar peso

() não apresentava nenhum sintoma

() dificuldade em ganhar altura

() outros – Quais? _____

10- Já realizou biópsia do intestino delgado? () sim () não () não sei

11- Se sim, quantas vezes? _____

* Dessas, quantas foram com dieta contendo glúten? _____

* E quantas foram em dieta sem glúten? _____

12- Caso tenha realizado biópsia intestinal, qual foi o resultado da biópsia no qual obteve diagnóstico (grau de lesão intestinal/Marsh em dieta com glúten)? _____

13- Você já realizou testes genéticos para doença celíaca? () sim () não () não sei

Se sim: () positivo DQ2 () positivo DQ2 e DQ8

() positivo DQ8 () negativo () outros. Quais? _____

14- Assinale se você realizou algum dos exames abaixo na época do diagnóstico e qual o resultado:

() dosagem de anticorpos anti-gliadina IgA: () normal () alterado () não lembro

() dosagem de anticorpos anti-gliadina IgG: () normal () alterado () não lembro

() dosagem de anticorpos anti-endomísio: () normal () alterado () não lembro

() dosagem de anticorpos anti-transglutaminase: () normal () alterado () não lembro

() não sei

15- Assinale se você possui ou possuía alguma das doenças abaixo:

() Hipotireoidismo

() Infertilidade

() Diabetes *Mellitus* tipo 1

() Abortos de repetição

() Síndrome de Turner

() Dermatite herpetiforme

() Síndrome de Williams

() Deficiência de IgA

() Síndrome de Down

() Osteoporose

() Osteopenia

() Intolerância à proteína do leite de vaca

() Doença auto-imune de tireóide

() Outras – Qual/Quais? _____

() Doença auto-imune de fígado

() Não possui ou possuía nenhuma dessas doenças

() Intolerância à lactose

10. Relatório de campo

O presente estudo apresentou algumas dificuldades, pois iniciou-se a coleta de dados antes da pandemia COVID-19, e com a pandemia o tempo em recesso das atividades acadêmicas prejudicou entre outros fatores a conclusão dentro do cronograma pré estabelecido.

11. Capítulo II – Artigo científico

Título: Perfil genético-clínico de celíacos, parentes de celíacos e pessoas em investigação de Doença Celíaca que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro – RJ.

Trabalho de dissertação apresentado em formato de artigo científico para a
Revista de Nutrição.

11.1 Resumo

Introdução: A doença celíaca (DC) é caracterizada por ser uma desordem autoimune desencadeada pela ingestão de glúten, tendo como principal manifestação desordens a nível intestinal. Essa desordem estaria ligada a fatores genéticos, principalmente aqueles encontrados no Sistema Leucocitário Humano (HLA), classe II (HLADQ), sendo eles os alelos HLA- DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e HLA- DQ8 (DRB1*04), responsáveis por codificar as proteínas DQ2 e DQ8. Sabe-se que esses alelos estão presentes entre 25 a 30% da população. chega até 95%, e os outros 5% dos celíacos teriam desencadeado a doença devido a outros fatores genéticos, sendo assim, foi incluído o rastreamento do HLA-DQ dentre as etapas do diagnóstico da DC, utilizando-se principalmente para pacientes assintomáticos e também para rastreio de grupos de risco para DC. **Objetivo:** Analisar Perfil genético-clínico de celíacos, parentes de celíacos e pessoas em investigação de Doença Celíaca que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro – RJ. **Métodos:** Aplicou-se um questionário relacionado aos sintomas e doenças associados a DC. O DNA genômico foi extraído por meio da coleta das células da mucosa bucal. Os alelos (DQA1*0501 e DQB1*0201) e (DRB1*04) foram identificados por meio da reação em cadeia da polimerase. **Resultados:** Participaram 78 indivíduos, obtendo-se 67 análises e questionários analisados, conferindo um total de 85,9% do total, sendo que deste total 37 amostras (55,2%) com diagnóstico de DC, 13 amostras de parentes de celíacos (19,4 %) e 17 amostras em investigação de DC (25,4%), e 9 amostras perdidas que não conseguimos retorno dos participantes (14,1%). Quanto aos genótipos DQ2 A, DQ2 B, DQ A+B, DQ8 e DQ2 A + B + DQ8 A dos celíacos avaliados (n=37) 23 (62%) tinham pelo menos 1 alelo, sendo DQ2 A (n=3) 13,1%, DQ2 B (n=8) 34,8%, DQ2 AB (n=12) 52,1%, já para o alelo DQ8 (n=7) 30,4% apresentavam-se positivos, e (n=11) 37,8% não apresentaram alelo nenhum. Em relação ao teste genético, a maioria das pessoas em todos os três grupos tinham pelo menos um dos alelos, entretanto, o grupo das pessoas em investigação apresentaram maior porcentagem dos alelos, com menor porcentagem de não ter os alelos estudados entre os grupos. O genótipo DQ2 AB foi o mais encontrado em todos os grupos. **Conclusão:** Os celíacos apresentaram maior número de sintomas, patologias e realização de biópsia e testes sorológicos para busca de diagnóstico correto entre os grupos, entretanto, a DC deve ser investigada nos grupos de parentes de celíacos e pessoas em investigação da doença, visto que a maioria tinha parentes celíacos e relataram sintomas e doenças relacionadas à DC, sendo classificados como grupo de risco. Mesmo que esses indivíduos não tenham sintomas clássicos de DC, a realização de biópsia é necessária pois pode-se tratar de indivíduos assintomáticos, evitando assim no futuro maiores complicações relacionados a essa patologia.

Palavras-chave: Doença celíaca; Glúten; Fatores genéticos; Alelos; Diagnóstico.

1.2 Abstract

Introduction: Celiac disease (CD) is characterized as an autoimmune disorder triggered by the ingestion of gluten, whose main manifestation is intestinal disorders. This disorder would be linked to genetic factors, mainly those found in the Human Leukocyte System (HLA), class II (HLADQ), namely the HLA-DQ2 (DQA1*0501 and DQB1*0201) and HLA-DQ8 (DRB1*04) alleles. , responsible for encoding the DQ2 and DQ8 proteins. It is known that these alleles are present between 25 to 30% of the population, reaching up to 95%, and the other 5% of celiacs would have triggered the disease due to other genetic factors, therefore, HLA-DQ screening was included among the stages of CD diagnosis, being used mainly for asymptomatic patients and also for screening risk groups for CD.

Objective: To analyze the genetic-clinical profile of celiac patients, relatives of celiac patients and people undergoing investigation of Celiac Disease who attended ACELBRA in Rio de Janeiro - RJ.

Methods: A questionnaire related to symptoms and diseases associated with CD was applied. Genomic DNA was extracted by collecting cells from the oral mucosa. The alleles (DQA1*0501 and DQB1*0201) and (DRB1*04) were identified by polymerase chain reaction.

Results: 78 individuals participated, obtaining 67 analyzes and analyzed questionnaires, giving a total of 85.9% of the total, of which 37 samples (55.2%) were diagnosed with CD, 13 samples from relatives of celiac patients (19.4%) and 17 samples under investigation for CD (25.4%), and 9 lost samples that we could not return from the participants (14.1%). As for the genotypes DQ2 A, DQ2 B, DQ A+B, DQ8 and DQ2 A + B + DQ8 A of the celiac patients evaluated (n=37), 23 (62%) had at least 1 allele, being DQ2 A (n=3) 13.1%, DQ2 B (n=8) 34.8%, DQ2 AB (n=12) 52.1%, while for the DQ8 allele (n=7) 30.4% were positive, and (n=11) 37.8% did not present any allele. Regarding genetic testing, most people in all three groups had at least one of the alleles, however, the group of people under investigation had a higher percentage of alleles, with a lower percentage of not having the alleles studied between the groups. The DQ2 AB genotype was the most found in all groups.

Conclusion: Celiac patients had a greater number of symptoms, pathologies and biopsy and serological tests to search for a correct diagnosis between the groups, however, CD should be investigated in the groups of celiac relatives and people under investigation of the disease, since the most had celiac relatives and reported symptoms and diseases related to CD, being classified as a risk group. Even if these individuals do not have classic symptoms of CD, a biopsy is necessary because it can treat asymptomatic individuals, thus avoiding further complications related to this pathology in the future.

Keywords: Celiac disease; Gluten; Genetic factors; alleles; diagnoses.

11.3 Introdução

A Doença Celíaca (DC), durante muito tempo foi vista como uma patologia geralmente pediátrica, no entanto, atualmente é definida como uma doença imunológica com manifestações sistêmicas que afetam todas as idades, afetando cerca de 1% da população mundial, sendo mais comum em indivíduos do sexo feminino. O consumo de alimentos contendo glúten, juntamente com a suscetibilidade genética através do Sistema Leucocitário Humano (HLA), são os fatores desencadeantes do desenvolvimento da doença.

Durante o desenvolvimento da doença, a mucosa perde suas vilosidades absorventes e ocorre hiperplasia das criptas entéricas, levando a uma reduzida capacidade de absorver nutrientes.

As manifestações da DC variam, podendo ocorrer desde diarreia, retardo do crescimento, anemia ferropriva, osteoporose, dermatite, até algumas neoplasias. O diagnóstico depende da suspeita clínica, levando a exames laboratoriais com testes de sorologia positiva de imunoglobulina A-transglutaminase tecidual (IgA-tTG), que se positivo deve ser confirmado por biópsia duodenal e histologia, revelando a atrofia vilositária da mucosa intestinal, método considerado o padrão ouro. A DC, no entanto, pode ser assintomática, principalmente em parentes de primeiro grau dos indivíduos portadores, o que pode ser confirmado por genotipagem do antígeno leucocitário humano (HLA) para HLA-DQ2 e HLA-DQ8, alelos que estão relacionados com a patogenicidade da doença, técnica menos invasiva que vem crescendo nos últimos anos. A DC, vai além dos sintomas gastrintestinais, podendo ocorrer um aumento do risco de malignidade e maior mortalidade.

Existe um consenso que ainda há um grande número de celíacos sem diagnóstico, provavelmente pelo amplitude das suas manifestações e também pelo conhecido ICEBERG celíaco. O desafio atualmente é conseguir estabelecer diagnósticos mais precoces, reduzindo o número e o grau de complicações da DC, estabelecendo assim uma melhor qualidade de vida dos pacientes.

A DC com sua susceptibilidade genética, constituídas pelos alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8, os parentes de primeiro grau dos celíacos poderiam apresentar um maior risco para desenvolverem essa patologia. (WALKER & TALLEY, 2011; CATASSI et al. 2015). (MEGIORNI & PIZZUTI, 2012).

Com base no que foi descrito, este estudo avaliou o perfil genético-clínico de celíacos, parentes de celíacos e pessoas em investigação de Doença Celíaca que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro – RJ

11.4 Metodologia

População alvo e aspectos éticos

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

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

Coleta do material genético e aplicação do questionário

Foram coletados dados dos prontuários dos indivíduos que frequentavam os ambulatórios escolhidos para o estudo e, durante um período de três meses, foi feita a abordagem convidando os pacientes para participarem do estudo e assim, se obteve 110 pacientes. Posteriormente, foram realizadas as coletas das células da mucosa bucal em todos os indivíduos que aceitaram participar do estudo e assinaram o TCLE. Para tal, o indivíduo deveria enxaguar a boca com água potável e esfregar o *swab* várias vezes entre as bochechas. Em seguida, o *swab* foi guardado em sua embalagem estéril e devidamente identificado com

o número do indivíduo, ficando armazenado diretamente no gelo, mantido em caixa térmica para o transporte até o laboratório, onde foi armazenado em *freezer* até o momento da realização das análises. O procedimento de coleta de células da mucosa bucal foi executado em duplicata para que em caso circunstancial pudessem ser repetidas as análises. Após a extração do material genético foi aplicado um questionário adaptado do questionário de Cassol *et al.* (23) composto por questões sociodemográficas e sobre sintomas gastrointestinais, extraintestinais e doenças relacionadas com a DC aos participantes do estudo.

Extração do DNA genômico e amplificação do DNA

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

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

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

bp = pares de base; DQA1*0501 e DQB1*0201 para HLA-DQ2; DRB1*04 para HLA-DQ8; hECAf e hECAr = controles de amplificação.

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

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

Análise estatística

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

11.5. Resultados e Discussão

A doença celíaca (DC), também conhecida como espru celíaco, enteropatia por glúten ou espru não tropical é um distúrbio autoimune, caracterizado pela intolerância à ingestão de glúten, presente, por exemplo, no trigo, cevada, centeio e alimentos derivados destes. Para que a doença se expresse é necessário que haja susceptibilidade genética, presença de fatores imunológicos e ambientais, além do consumo de glúten e derivados.

Os fatores genéticos, dado pelos marcadores de superfície HLA DQ2 e HLA DQ8 são encontrados em alto índice na população geral. (BONATTO, 2015). No total das amostras coletadas, $n = 78$, obteve-se $n=67$ análises e questionários analisados, conferindo um total de 85,9% do total, sendo que deste total 37 amostras (55,2%) com diagnóstico de DC, 13 amostras de parentes de celíacos (19,4 %) e 17 amostras em investigação de DC (25,4%), e 9 amostras perdidas que não conseguimos retorno dos participantes (14,1%).

Em relação às características sócio demográficas dos celíacos estudados, observou-se que a maioria eram do sexo feminino (94,6 %) e maioria da raça branca (78,4 %) (Tabela 1)

Tabela 1. Características sócio demográficas dos celíacos que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro /RJ, 2019 (n=37).

Características	N	%
Estado de origem		
Rio de Janeiro	19	51,4
Paraná	8	21,6
Minas Gerais	3	8,1
São Paulo	2	5,4
Rio Grande do Sul	2	5,4
Bahia	1	2,7
Espírito Santo	1	2,7
Distrito Federal	1	2,7
Sexo		
Masculino	2	5,7
Feminino	35	94,3
Familiar com DC		
Sim	9	24,4
Não	28	75,6
Cor		
Branca	29	78,4
Negra	4	10,8
Parda	4	10,8
Idade do diagnóstico		
Até 40 anos	22	59,4
Acima de 40 anos	15	40,6

Em relação aos sintomas intra e extra intestinais nos celíacos estudados observou-se que dor abdominal (n=30) 81,7 % para intra intestinal e aftas (n=10) 27% para extra intestinal foram os mais expressivos.

Tabela 2. Presença de sintomas intra e extra intestinais dos celíacos que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ

	N	%
Sintomas		
Intra intestinais	37	100,0
Extra intestinais	31	83,7
Intra intestinais		
Diarreia	25	67,5
Dor Abdominal	30	81,0
Constipação	3	8,1
Distensão abdominal	26	70,2
Extra intestinais		
Aftas	10	27,0
Dificuldade em ganhar peso	8	21,6
Dificuldade em ganhar altura	4	10,8
Emagrecimento	7	18,9
Lesão de pele	9	24,3

Em relação aos exames para o diagnóstico da DC, observou-se a sorologia (n=27) 73% como importante ferramenta para iniciar a investigação da DC.

Tabela 3. Exames para Diagnóstico de Doença Celíaca celíacos que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ;

	N	%
Exames		
Biopsia	37	100,0
Genético	7	18,9
Sorologia	27	73%

A presença de patologias associadas a DC, nos celíacos estudados mostrou intolerância a lactose (n=25) 67,5% e hipotireoidismo (n=17) 45,9% como as mais frequentes neste grupo.

Tabela 4. Presença de outras patologias dos celíacos que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ;

	N	%
Presença de patologia		
sim	34	91,9
Não	3	8,1
Patologia		
Hipotireoidismo	17	45,9
Osteopenia	15	40,5
Intolerância lactose	25	67,5
Doenças no fígado	5	13,5
Dermatite	3	8,1
Aborto	2	5,4
Willian	1	2,7

Quanto aos genótipos DQ2 A, DQ2 B, DQ A+B, DQ8 e DQ2 A + B + DQ8 A dos celíacos avaliados (n=37) 23 (62%) tinham pelo menos 1 alelo , sendo DQ2 A (n=3) 13,1%, DQ2 B (n=8) 34,8%, DQ2 AB (n=12) 52,1%, já para o alelo DQ8 (n=7) 30,4% apresentavam-se positivos, e (n=11) 37,8% não apresentaram alelo nenhum.

Em relação às características sócio-demográficas dos parentes de celíacos pesquisados (n=13) que frequentavam a ACELBRA, observou-se que a maioria eram do sexo feminino (n=9) 69,2% e maioria da raça branca (n=8) 61,5%

Tabela 5. Características sócio-demográficas dos parentes de celíacos que frequentavam a acelbra do Rio de Janeiro /RJ, 2019 (n=13)

Características	N	%
Estado de origem		
Rio de Janeiro	10	76,9
São Paulo	2	15,4
Piauí	1	7,7
Sexo		
Masculino	4	30,8
Feminino	9	69,2
Parentesco		
1 grau (mãe, pai, irmão (â))	11	84,6
2 graus (tio (a), sobrinho (a))	2	15,4
Cor		
Branca	8	61,5
Negra	2	15,4
Parda	3	23,1

Em relação aos sintomas intra e extra intestinais nos parentes de celíacos estudados observou-se que distensão abdominal (n=5) 38,4 % para intra intestinal e anemia (n=1) 30,8 % para extra intestinal foram os mais expressivos.

Tabela 6. Presença de sintomas intra e extra intestinais dos parentes de celíacos que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ.

	N	%
Sintomas		
Intra intestinais	4	30,7
Extra intestinais	3	23,0
Não apresentaram sintomas	6	46,3
Intra intestinais		
Diarreia	3	23,0
Constipação	2	15,4
Distensão abdominal	5	38,4
Extra intestinais		
Artrite	2	15,4
Anemia	4	30,8
Enxaqueca	2	15,4
Lesão de pele	1	7,7

Em relação aos exames para o diagnóstico da DC, observou-se o teste genético (n=10) 76,9% como importante ferramenta para iniciar a investigação da DC.

Tabela 7. Exames para Diagnóstico de Doença Celíaca nos parentes de celíacos que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ.

	N	%
Exames		
Biopsia	1	7,7
Genético	10	76,9
Sorologia	3	23,0

A presença de patologias associadas a DC n, nos celíacos estudados mostrou intolerância a lactose (n=4) 30,7% e doenças relacionadas ao glúten (n=7) 53,8% como as mais frequentes neste grupo.

Tabela 8. Presença de outras patologias dos parentes de celíacos que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ.

	N	%
Presença de patologia		
sim	7	53,8
Não	6	46,2
Patologia		
Hipotireoidismo	1	7,7
Osteopenia	3	23,0
Intolerância lactose	4	30,7
Doenças relacionadas ao glúten	7	53,8

Quanto aos genótipos DQ2 A, DQ2 B, DQ A+B, DQ8 e DQ2 A + B + DQ8 A dos parentes de celíacos avaliados (n=13) 8 (61,5%) tinham pelo menos 1 alelo, sendo DQ2 A (n=1) 7,7%, DQ2 B (n=4) 30,7%, DQ2 AB (n=3) 23%, já para o alelo DQ8 (n=4) 30,7% apresentavam-se positivos, e (n=5) 38,4% não apresentaram alelo nenhum.

Em relação às características sócio demográficas das pessoas em investigação pesquisados (n=17) que frequentavam a ACELBRA, observou-se que a maioria eram do sexo feminino (n=14) 82,3% e maioria da raça branca (n=9) 53%.

Tabela 9. Características sócio demográficas das pessoas em investigação que frequentavam a acelbra do Rio de Janeiro /RJ, 2019 (n=17)

Características	N	%
Estado de origem		
Rio de Janeiro	13	76,48
São Paulo	1	5,88
Piauí	1	5,88
Bahia	1	5,88
Paraná	1	5,88
Sexo		
Masculino	3	17,7
Feminino	14	82,3
Cor		
Branca	9	53,0
Negra	4	23,5
Parda	4	23,5

Em relação aos sintomas intra e extra intestinais das pessoas em investigação estudadas observou-se que distensão abdominal (n=9) 52,9 % para intra intestinal e enxaqueca (n=3) 17,65 % para extra intestinal foram os mais expressivos.

Tabela 10. Presença de sintomas intra e extra intestinais das pessoas em investigação que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ.

	N	%
Sintomas		
Intra intestinais	7	41,20
Extra intestinais	8	47,00
Não apresentaram sintomas	2	11,80
Intra intestinais		
Diarreia	4	23,55
Constipação	4	23,55
Distensão abdominal	9	52,90
Extra intestinais		
Artrite	2	15,40
Anemia	9	23,50
Enxaqueca	3	17,65
Lesão de pele	3	17,65

Em relação aos exames para o diagnóstico da DC, observou-se o teste genético (n=12) 70,6% como importante ferramenta para iniciar a investigação da DC.

Tabela 11. Exames para Diagnóstico de Doença Celíaca das pessoas em investigação que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ.

	N	%
Exames		
Biopsia	3	17,65
Genético	12	70,60
Sorologia	4	23,52

A presença de patologias associadas a DC n, das pessoas em investigação mostrou intolerância a lactose (n=6) 35,3% e doenças relacionadas ao glúten (n=7) 53,8% como as mais frequentes neste grupo.

Tabela 12. Presença de outras patologias das pessoas em investigação que frequentavam a ACELBRA do Rio de Janeiro-RJ

	N	%
Presença de patologia		
sim	13	76,5
Não	4	23,5
Patologia		
Hipotireoidismo	4	23,5
Osteopenia	1	5,8
Intolerância lactose	6	35,3
Abortos	1	5,8
Diabetes I	1	5,8
Doenças relacionadas ao glúten	7	53,8
Tireoidite de Hashimoto	1	5,8

Quanto aos genótipos DQ2 A, DQ2 B, DQ A+B, DQ8 e DQ2 A + B + DQ8 A das pessoas em investigação avaliados (n=17) 12 (70,5%) tinham pelo menos 1 alelo , sendo DQ2 A (n=1) 5,88%, DQ2 B (n=3) 17,6%, DQ2 AB (n=7) 41,1%, já para o alelo DQ8 (n=5) 29,4% apresentavam-se positivos, e (n=5) 29,4 % não apresentaram alelo nenhum. Os fatores genéticos, dado pelos marcadores de superfície HLA DQ2 e HLA DQ8 são encontrados em alto índice na população geral. (BONATTO, 2015)

No presente estudo o total das amostras coletadas , n = 78, obteve-se n=67 análises e questionários analisados, conferindo um total de 85,9% do total, sendo que deste total 37 amostras (55,2%) com diagnóstico de DC, 13 amostras de parentes de celíacos (19,4 %) e 17 amostras em investigação de DC (25,4%), e 9 amostras perdidas que não conseguimos retorno dos participantes (14,1%).

Foram analisadas algumas características da população descrita, como a etnia, os indivíduos analisados apresentaram a etnia branca a maior porcentagem (78,4%), indo de acordo com dados da literatura mundial, que a DC acomete predominantemente indivíduos brancos de origem caucasiana.(BONATTO, 2015) .

Quanto aos genótipos DQ2 A, DQ2 B, DQ A+B, DQ8 e DQ2 A + B + DQ8 A dos celíacos avaliados (n=37) 23 (62%) tinham pelo menos 1 alelo , sendo DQ2 A (n=3) 13,1%, DQ2 B (n=8) 34,8%, DQ2 AB (n=12) 52,1%, já para o alelo

DQ8 (n=7) 30,4% apresentavam-se positivos, e (n=11) 37,8% não apresentaram alelo nenhum. Os estudos mostram que aproximadamente 90-95% dos pacientes celíacos são positivos para pelo menos um alelo HLA-DQ2 e ou DQ8. (Selleski N, 2015), no entanto neste presente estudo verificou-se que a presença de pelo menos 1 alelo em celíacos já diagnosticados ficou em 62%, abaixo do que a literatura relata, entretanto esse valor pode ser devido a pouca amostragem que foi analisada.

Em relação à prevalência dos sintomas que estão associados à DC, observou-se uma grande variedade de queixas dos celíacos, neste estudo os sintomas intra e extra intestinais nos celíacos, observou-se que dor abdominal (n=30) 81,7 % para intra intestinal ,característica essa da forma típica da DC e lesões de pele (n=9) 24,3 % para extra intestinal, característica de forma atípica da DC. Cassol *et al.*

A presença de patologias associadas a DC, nos celíacos estudados mostrou intolerância a lactose (n=25) 67,5% e hipotireoidismo (n=17) 45,9% como as mais frequentes neste grupo, As principais manifestações extraintestinais da DC, muitas vezes sem associação com sintomas gastrintestinais presente neste estudo está de acordo juntamente com outras doenças autoimunes como hipotireoidismo descrito nos resultados, mostrados pelos estudos de referencia. (Santos, 2014)

O estudo avaliou também os genótipos DQ2 A, DQ2 B, DQ A+B, DQ8 e DQ2 A + B + DQ8 A dos parentes dos celíacos avaliados (n=13) 8 (61,5%) tinham pelo menos 1 alelo , sendo DQ2 A (n=1) 7,7%, DQ2 B (n=4) 30,7%, DQ2 AB (n=3) 23%, já para o alelo DQ8 (n=4) 30,7% apresentavam-se positivos, e (n=5) 38,5% não apresentaram alelo nenhum, comparando com a literatura revisada ficou um pouco abaixo da média , porém também pode ser devido ao tamanho da amostra, no entanto comparando os percentuais do alelo DQ2 apresentados ficaram de acordo, como o alelo mais presente como mostrou BONATTO, 2015, onde dentre os pacientes não celíacos, mas com familiares de primeiro grau celíacos, 26 pacientes (89,7%) apresentaram os marcadores HLA, sendo 22 pacientes (76%) com apenas o HLA DQ2.

Quanto aos genótipos DQ2 A, DQ2 B, DQ A+B, DQ8 e DQ2 A + B + DQ8 A das pessoas em investigação avaliados (n=17) 12 (70,5%) tinham pelo menos 1 alelo , sendo DQ2 A (n=1) 5,88%, DQ2 B (n=3) 17,6%, DQ2 AB (n=7) 41,1%,

já para o alelo DQ8 (n=5) 29,4% apresentavam-se positivos, e (n=5) 29,4 % não apresentaram alelo nenhum, ficando evidente que as pessoas em investigação ou possuem a DC, necessitando assim maior investigação ou possuem parentes de primeiro grau com DC. Ao compararmos os grupos de celíacos, parentes de celíacos e pessoas em investigação que frequentavam a ACELBRA-RJ, houve diferença significativa entre os grupos em relação aos sintomas intra e extra intestinais ($p \leq 0,000$), onde o grupo de celíacos era o grupo com maior presença de sintomas, seguido do grupo das pessoas em investigação. Analisando os sintomas separadamente, pode-se observar que também houve diferença significativa para os sintomas diarreia ($p \leq 0,002$), dor abdominal ($p \leq 0,002$) e questões relacionadas ao peso ($p \leq 0,083$), onde os celíacos tinham a maior prevalência desses sintomas.

Alelos	Perfil	n	Percentual
DQA1*0501	A	3	3,8%
DQB1*0201	B	20	25%
DQA1*0501 e DQB1*0201	AB	27	34,1%
DRB1*04	DR	20	25%
DQA1*0501 + DRB1*04	A + DR	0	0%
DQB1*0201 + DRB1*04	B + DR	7	8,8%
DQA1*0501 e DQB1*0201 + DRB1*04	AB + DR	7	8,8%
Nenhum dos alelos	—	24	30,3%
Total alelos HLA-DQ2	—	50	63,3%
Total alelos HLA-DQ8	—	67	84,8%

Figura 1 - toda amostra analisada (os 3 grupos)

Tais resultados eram esperados para os grupos analisados, como mostraram diferentes estudos sobre celíacos e a presença de sintomas que caracterizam a DC como forma clássica de manifestação (LYU et al, 2014; KRZYWICKA et al., 2014), entretanto, existem outras formas de manifestação da DC, principalmente a forma assintomática, então, pacientes que não

apresentam sintomas clássicos de DC, não poderiam ser descartados, caso estejam em grupos de risco e precisam ser investigados (LUDVIGSSON et al., 2012; LIONETTI et al., 2011). Houve também diferença significativa entre a realização de biópsia intestinal, onde todos os celíacos analisados no presente estudo tinham realizado biópsia para ter o diagnóstico ($p \leq 0,000$), sendo que 91,67% dos celíacos tinham grau 1 na classificação de Marsh. Importante ressaltar que 82,35% das pessoas em investigação e 92,31% dos parentes de celíacos não tinham realizado ainda a biópsia, o que pode ser preocupante, visto que essas pessoas podem estar consumindo glúten e comprometendo sua saúde, assim como, as mesmas podem estar sem consumir glúten para evitar sintomas, o que pode prejudicar a realização de uma biópsia correta, pois é preciso estar consumindo glúten no momento da realização da biópsia, para evitar resultados falsos negativos (HUSBY et al., 2012). Ademais, parentes de celíacos são considerados grupos de risco para DC e os mesmos devem buscar investigar a presença da DC, mesmo sem sintomas, pois podem ter a forma assintomática da DC (TAYLOR et al., 2015).

Em relação à sorologia, também houve diferença significativa entre os grupos, onde os celíacos tinham maior frequência na realização de sorologia ($p \leq 0,010$) e resultados positivos para os exames de anti endomísio ($p \leq 0,002$) e transglutaminase ($p \leq 0,075$). Os exames sorológicos também são importantes para o rastreio da DC, portanto, indivíduos assintomáticos e grupos de risco para DC também devem realizar esses exames (KELLY et al. 2015).

Quando foi analisada a presença de patologias relacionadas à DC, houve diferença significativa entre os grupos, onde os celíacos tinham maior presença de patologias do que as pessoas em investigação e parentes de celíacos, embora 41,18% das pessoas em investigação e 38,46% dos parentes relataram ter patologias relacionadas à DC ($p \leq 0,000$). A presença de patologias relacionadas à DC na presença de sintomas, pode ser um indício para a realização de exames para investigar DC (MISHRA et al., 2016).

Analisando as patologias relacionadas à DC separadamente, foi encontrada diferença significativa também entre hipo ($p \leq 0,026$) e intolerância à lactose ($p \leq 0,020$), sendo essas patologias mais presentes em celíacos, no entanto, 23,08% dos parentes de celíacos apresentavam osteoporose ($p \leq 0,010$)

e 100% dos celíacos não relataram a presença de osteoporose e/ou osteopenia. Essas alterações estão relacionadas à DC. Dentre as patologias que determinam a osteoporose secundária, enfatiza-se a doença celíaca, enteropatia inflamatória crônica do intestino delgado, imunomediada, que predispõe à redução da massa óssea e a alterações no metabolismo do cálcio, resultando assim no seu desenvolvimento (Machado et al., 2010)

Quando analisamos apenas 2 grupos, unindo as pessoas em investigação com os parentes de celíacos em um grupo e comparamos com o grupo de celíacos, foi observado que o sexo ($p \leq 0,08$), a cor ($p \leq 0,09$) e ter familiar celíaco ($p \leq 0,095$) apresentaram diferença significativa periférica entre os grupos. O sexo feminino e as pessoas que se consideravam de cor branca estavam mais presentes nos indivíduos celíacos e o sexo masculino e pessoas que se consideravam de cor negra e pardos estavam mais presentes no grupo que representava os parentes e os indivíduos em investigação. Em relação a ter familiar com DC, 62,79% dos celíacos relataram não ter familiares com DC, enquanto 58,33% dos parentes e pessoas em investigação tinham parentes com DC.

Ao analisarmos os dois grupos com a presença de sintomas, também foi encontrada diferença significativa entre ter sintomas intra e extra intestinais nos grupos de celíacos e parentes e pessoas em investigação ($p \leq 0,004$). A presença de aftas ($p \leq 0,080$), diarreia ($p \leq 0,000$), dor abdominal ($p \leq 0,001$), problemas relacionados com o peso ($p \leq 0,029$) e distensão abdominal ($p \leq 0,050$) também mostraram diferença significativa entre os grupos. Todos os celíacos relataram sintomas intra ou extra intestinais, entretanto, 80% dos parentes e pessoas em investigação também relataram algum sintoma. Os celíacos também tinham mais aftas do que o grupo de parentes e pessoas em investigação, embora 72,97% dos celíacos também não apresentavam esse sintoma. Dor abdominal e distensão abdominal, embora mais frequentes nos celíacos, estavam presentes também em 40% e 46,67%, respectivamente, no grupo de parentes e pessoas em investigação.

Em relação à realização de exames para diagnóstico, houve diferença significativamente entre os grupos para a realização de biópsia ($p \leq 0,000$), sorologia ($p \leq 0,003$), para os exames de anti endomísio ($p \leq 0,001$) e anti

transaminase ($p \leq 0,025$), sendo que a realização de tais exames são mais frequentes nos celíacos do que nos grupos de parentes e pessoas em investigação, pois apenas 13,33% e 33,33% do grupo de parentes e pessoas em investigação tinham realizado exames de biópsia e sorologia, respectivamente.

Ao analisar o exame de anti transglutaminase com a presença de patologias entre todos os indivíduos analisados, houve diferença significativa ($p \leq 0,000$), onde 84,38% das pessoas que tinham patologias, tinham anti transglutaminase positiva, enquanto que 15,62% das pessoas que não tinham patologias, eram negativas para anti transglutaminase. Já em relação à presença de hipotireoidismo, 100% dos indivíduos ($n=14$) que tinham a doença também tinham anti transglutaminase positiva, com uma significância periférica ($p \leq 0,091$).

Em relação à intolerância à lactose com os 2 grupos analisados, houve diferença significativa ($p \leq 0,005$), pois embora os celíacos tinham frequência maior de intolerância à lactose, 33,33% do grupo dos parentes de celíacos e pessoas em investigação também apresentavam tal intolerância, sendo necessária investigação de DC. Em relação à presença de osteoporose nos 2 grupos analisados, houve também diferença significativa ($p \leq 0,022$), onde 100% dos celíacos não relataram a doença, enquanto que 13,33% do grupo de parentes e pessoas em investigação relataram ter osteoporose, sendo necessária também a investigação de DC, ainda mais na presença de sintomas e relação de parentesco com celíacos. Além disso, o grupo de parentes de celíacos e pessoas em investigação relataram ter outras patologias não relacionadas à DC (26,67%) diferindo estatisticamente do grupo de celíacos ($p \leq 0,041$).

Não houve diferença significativa entre o perfil genético dos três grupos analisados com o perfil clínico, ou seja, a presença dos alelos não mostrou associação com sintomas, doenças, além de características de sexo e raça entre os grupos de celíacos, parentes de celíacos e pessoas em investigação de DC. Importante salientar que o número de amostra pequena também pode ter influenciado na análise dos dados.

Tabela 13. Relação dos sintomas presentes em celíacos, parentes de celíacos e pessoas em investigação na Acelbra/RJ. Pelotas, 2022.

Grupos/Sintomas	Celiacos	Parentes	Investigação	Valor de p
Aftas	27% (10)	0 % (0)	17,6 % (3)	0,103
Diarreia	67,5% (25)	23% (3)	23,5% (4)	0,002
Distensão abdominal	70,2% (26)	38,4% (5)	52,9% (9)	0,107
Dor Abdominal	81% (30)	30,7% (4)	47% (8)	0,002
Constipação	8,1% (3)	15,4% (2)	23,5% (4)	0,296
Dificuldade em ganhar peso	21,6% (8)	0% (0)	5,8% (1)	0,083
Dificuldade em ganhar altura	10,8% (4)	0% (0)	11,7%(2)	0,449
Emagrecimento	18,9% (7)	0% (0)	17,6% (3)	0,241
Lesão de pele	24,3% (9)	7,69% (1)	17,6% (3)	0,418
Anemia	59,4% (22)	30,7% (4)	52,9% (9)	0,204

Analisando estatisticamente a tabela 13, os 3 grupos em relação às patologias relacionados à DC, podemos observar que diarreia e dor abdominal tiveram uma relevância significativa.

Tabela 14. Relação das patologias presentes em celiacos, parentes de celiacos e pessoas em investigação na Acelbra/RJ. Pelotas, 2022.

Grupos/Patologias	Celiacos	Parentes	Investigação	Valor de p
Intolerância à lactose	67,5% (25)	30,7% (4)	35,2% (6)	0,020
Osteoporose/osteopenia	40,5% (15)	23% (3)	5,8% (1)	0,010
Hipotireoidismo	45,9% (17)	7,6% (1)	23,5% (4)	0,026
Dermatite	8,1% (3)	0% (0)	0% (0)	0,280
Aborto	5,4% (2)	0% (0)	5,8% (1)	0,683
DM1	0 % (0)	0 % (0)	5,8 (1)	0,225
Outras patologias	8,1% (3)	23,8% (3)	29,4% (5)	0,112

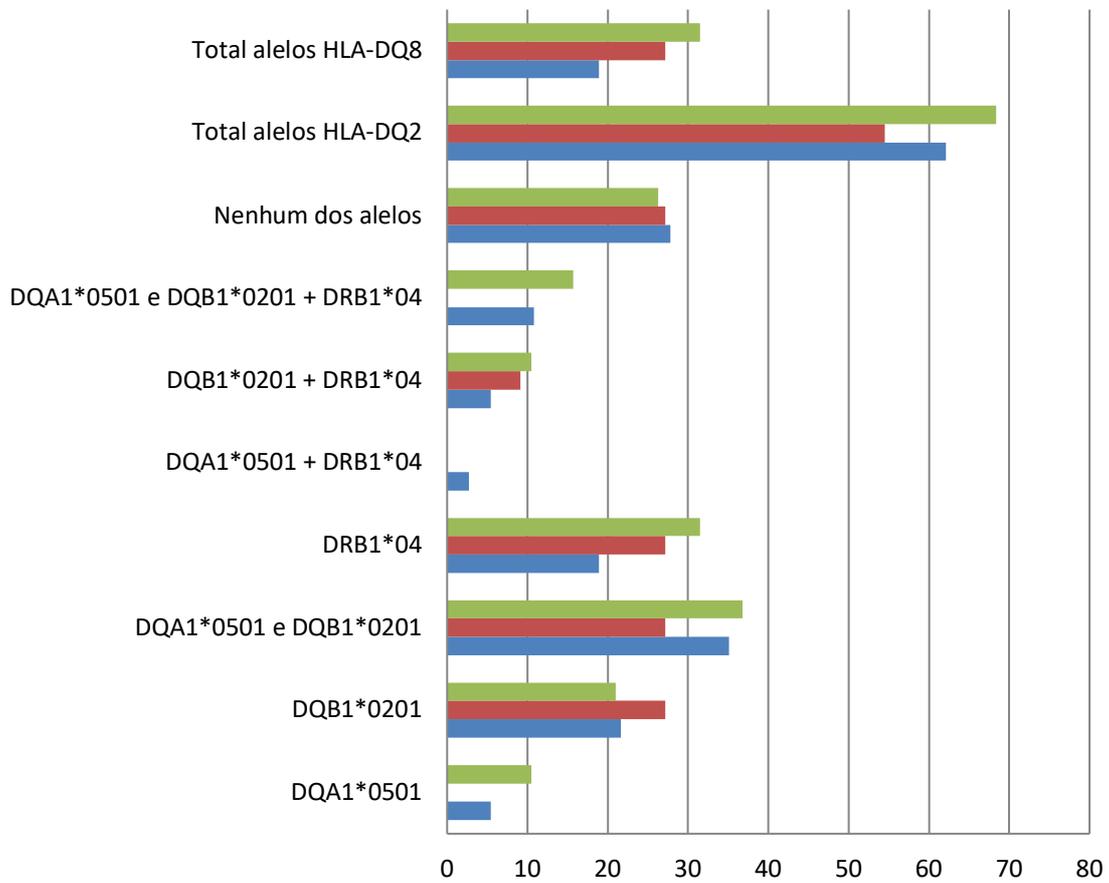
Analisando estatisticamente a tabela 14 os 3 grupos em relação à presença dos alelos relacionados à DC, podemos observar que intolerância a lactose, osteoporose/osteopenia e hipotireoidismo mostraram relevância significativa.

Alelos	Perfil	Celíacos%(n=37)	Parentes%(n=11)	Investigação%(n=19)
DQA1*0501	A	5,4%(2)	0%(0)	10,5%(2)
DQB1*0201	B	21,6%(8)	27,2%(3)	21%(4)
DQA1*0501 e DQB1*0201	AB	35,1%(13)	27,2%(3)	36,8%(7)
DRB1*04	DR	18,9%(7)	27,2%(3)	31,5%(6)
DQA1*0501 + DRB1*04	A + DR	2,7%(1)	0%(0)	0%(0)
DQB1*0201 + DRB1*04	B + DR	5,4%(2)	9,1%(1)	10,5%(2)
DQA1*0501 e DQB1*0201 + DRB1*04	AB + DR	10,8%(4)	0%(0)	15,7%(3)
Nenhum dos alelos	–	27,8%(14)	27,2%(3)	26,3%(5)
Total alelos HLA-DQ2	–	62,1%(23)	54,5%(6)	68,4%(13)
Total alelos HLA-DQ8	–	18,9%(7)	27,2%(3)	31,5%(6)

Figura 1 toda amostra analisada separada pelos grupos

Comparando a frequência dos alelos analisados em cada grupo abaixo (Figura 2), podemos observar que o alelo DQ2 está presente nos indivíduos em investigação, o que mostra grande associação com a DC.

Comparação da Frequência de Alelos entre os Grupos analisados



	DQA1*0501	DQB1*0201	DQA1*0501 e DQB1*0201	DRB1*04	DQA1*0501 + DRB1*04	DQB1*0201 + DRB1*04	DQA1*0501 e DQB1*0201 + DRB1*04	Nenhum dos alelos	Total alelos HLA-DQ2	Total alelos HLA-DQ8
■ investigação	10.5	21	36.8	31.5	0	10.5	15.7	26.3	68.4	31.5
■ parentes	0	27.2	27.2	27.2	0	9.1	0	27.2	54.5	27.2
■ celiacos	5.4	21.6	35.1	18.9	2.7	5.4	10.8	27.8	62.1	18.9

Figura 2 . frequência dos alelos analisados em cada grupo

11.6 Conclusão

O perfil dos participantes do evento da ACELBRA estava dividido em celíacos, parentes de celíacos e pessoas em investigação de DC, sendo a maioria mulheres, raça branca, em idade adulta média, sendo que as mulheres tinham mais sintomas relacionados à DC do que os homens. Em relação aos sintomas intra-intestinais, dor abdominal foi a mais relatada pelos celíacos, enquanto que a distensão abdominal foi o sintoma mais relatado pelos parentes de celíacos e pessoas em investigação. Entre os sintomas extra-intestinais, as aftas foram as mais citadas pelos celíacos, enquanto que a anemia e a enxaqueca foram as mais citadas pelos parentes de celíacos e as pessoas em investigação, respectivamente. A patologia mais citada nos três grupos foi a intolerância à lactose. Em relação aos exames realizados para a busca do diagnóstico, a maioria dos parentes de celíacos e das pessoas em investigação realizaram apenas o teste genético e não fizeram biópsia nem testes sorológicos, enquanto que todos os celíacos relataram ter feito a biópsia intestinal, considerada padrão ouro para diagnóstico. Em relação ao teste genético, a maioria das pessoas em todos os três grupos tinham pelo menos um dos alelos, entretanto, o grupo das pessoas em investigação apresentaram maior porcentagem dos alelos, com menor porcentagem de não ter os alelos estudados entre os grupos. O genótipo DQ2 AB foi o mais encontrado em todos os grupos.

Os celíacos apresentaram maior número de sintomas, patologias e realização de biópsia e testes sorológicos para busca de diagnóstico correto entre os grupos, entretanto, a DC deve ser investigada nos grupos de parentes de celíacos e pessoas em investigação da doença, visto que a maioria tinha parentes celíacos e relataram sintomas e doenças relacionadas à DC, sendo classificados como grupo de risco. Mesmo que esses indivíduos não tenham sintomas clássicos de DC, a realização de biópsia é necessária pois pode-se tratar de indivíduos assintomáticos. Ademais, novos estudos são necessários para avaliar o motivo pelo qual pessoas que estão em grupo de risco preferem fazer o teste genético que não serve como diagnóstico de DC do que a biópsia, considerada o único diagnóstico final para DC. Apenas com a correta investigação e realização de biópsia intestinal é possível ter certeza se a pessoa é portadora de DC, sendo que o diagnóstico é fundamental para realização do tratamento correto, melhorando a qualidade de vida e o prognóstico do paciente celíaco.

11.7 Referências do artigo:

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

LUDVIGSSON, Jonas F et al. "The Oslo definitions for coeliac disease and related terms." *Gut* vol. 62,1 (2013): 43-52. doi:10.1136/gutjnl-2011-301346

SHARMA, Natasha et al. "Pathogenesis of Celiac Disease and Other Gluten Related Disorders in Wheat and Strategies for Mitigating Them." *Frontiers in nutrition* vol. 7 6. 7 Feb. 2020, doi:10.3389/fnut.2020.00006

ABREU, Rejane W. de et al. Detection of gluten in foods by means of ELISA *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)* [online]. 2006, vol.65, n.3, pp. 176-180. ISSN 0073-9855.

LUDVIGSSON JF, Rubio-Tapia A, van Dyke CT, Melton LJ, Zinsmeister AR, Lahr BD, et al. Increasing incidence of celiac disease in a North American population. *The American journal of gastroenterology*. 2013 May 19;108(5):818–24.

FERREIRA, Fátima & Inácio, Filipe. Pathology associated with wheat: IgE and non-IgE mediated allergy, celiac disease, non-celiac hypersensitivity, FODMAP (Fermentable, Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides and Polyols). (2018). *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*. 26. 171-187

SILVA, Tatiana Sudbrack da Gama e; FURLANETTO, Tania Weber. Diagnóstico de doença celíaca em adultos. *Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo*, v.56, n.1, p.122-126, 2010.

RASHTAK S, Murray JA. Review article: coeliac disease, new approaches to therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(7):768-781.

CIESUNSKI, J. Z; Kotze, Lorete Maria da Silva; Utiyama, Shirley Ramos da Rosa. Celiac disease treatment; state of the art. ***GED gastroenterol. endosc. dig*** ; 35(3): 114-121, jul.-set. 2016. *Ilustrado*. Artigo em Português | LILACS | ID: biblio-2446

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

YUAN, J., GAO J.; LI, X.; LIU, F.; WIJMENGA, C.; CHEN, H., et.al. The Tip of the "Celiac Iceberg" in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. (2013)

MALAMUT G, Cording S, Cerf-Bensussan N. Recent advances in celiac disease and refractory celiac disease. *F1000Res*. 2019; 8:F1000 Faculty Rev-969. Published 2019 Jun 26. doi:10.12688/f1000research.18701.1

ZHU, Julie et al. "Celiac Disease: Against the Grain in Gastroenterology." *Journal of the Canadian Association of Gastroenterology* vol. 2,4 (2019): 161-169. doi:10.1093/jcag/gwy042

SOLLID LM, Lie BA. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3(9):843-851.

BROWN NK, Guandalini S, Semrad C, Kupfer SS. A Clinician's Guide to Celiac Disease HLA Genetics. *Am J Gastroenterol*. 2019;114(10):1587-1592.

SCIURTI M, Fornaroli F, Gaiani F, et al. Genetic susceptibility and celiac disease: what role do HLA haplotypes play?. *Acta Biomed*. 2018;89(9-S):17-21. Published 2018 Dec 17

ALMEIDA LM, Castro LC, Uenishi RH, et al. Diminuição da prevalência de doença celíaca em idosos brasileiros. *World J Gastroenterol*. 2013; 19 (12): 1930-1935. doi: 10.3748 / wjg.v19.i12.1930

NOBRE, S. Rito; SILVA, T. e CABRAL, J.E. Pina. Doença celíaca revisitada. *J Port Gastreterol*. [online]. 2007, vol.14, n.4 [citado 2020-06-14], pp.184-193.

QUEIROZ, MS et al. Prevalência de doença celíaca em crianças brasileiras de baixa estatura. *Braz J Med Biol Res* [online]. 2004, vol.37, n.1

POPP A, Kivelä L, Fuchs V, Kurppa K. Diagnosing Celiac Disease: Towards Wide-Scale Screening and Serology-Based Criteria?. *Gastroenterol Res Pract*. 2019;2019:2916024. Published 2019 Aug 6.

KELLY CP, Bai JC, Liu E, Leffler DA. Advances in diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*. 2015 May;148(6):1175–86.

KASWALA DH, Veeraraghavan G, Kelly CP, Leffler DA. Celiac Disease: Diagnostic Standards and Dilemmas. *Diseases*. 2015;3(2):86-101. Published 2015 Jun 16.

FORD AC, Ching E, Moayyedi P. Meta-analysis: yield of diagnostic tests for coeliac disease in dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther.* 2009 Jul;30(1):28-36.

VOLTA U, Villanacci V. Celiac disease: diagnostic criteria in progress. *Cell Mol Immunol.* 2011;8(2):96-102.

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

LUDVIGSSON, F. J.; LEFFLER, A. D.; BAI, J. C.; BIAGI, F.; FASANO, A. et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Original Article.* 2012.

LIONETTI, E.; Catassi, C. New Clues in Celiac Disease Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. *International Reviews of Immunology.* v.30. p.219–231. 2011.

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

ITZLINGER A, Branchi F, Elli L, Schumann M. Gluten-Free Diet in Celiac Disease-Forever and for All?. *Nutrients.* 2018;10(11):1796. Published 2018 Nov 18.

TYE-DIN JA, Galipeau HJ, Agardh D. Celiac Disease: A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel Therapies. *Front Pediatr.* 2018;6:350. Published 2018 Nov 21.

CAIO G, Volta U, Sapone A, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med.* 2019;17(1):142. Published 2019 Jul 23

*Guia do Clínico para a Doença Celíaca HLA Genetics/American Journal of Gastroenterology*114 (10): 1587-1592, outubro de 2019.

AL-TOMA, A, VOLTA, U, AURICCHIO, R, et al. *European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders.* *United European Gastroenterol J* 2019; 7: 583–613

11.8 APÊNDICE A

Carta de autorização da ACELBRA



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

OFÍCIO PARA AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA PARA REALIZAÇÃO DE DISSERTAÇÃO NA ASSOCIAÇÃO DE CELÍACOS DO BRASIL

Prezado (a) Senhor (a):

Venho por meio deste solicitar sua autorização para a realização do estudo intitulado: “Análise da Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em celíacos e seus parentes de primeiro grau” nessa instituição.

.Esse estudo será desenvolvido por alunos e professores do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos da UFPel, sob orientação da Professora Dra. Fabiana Torma Botelho e Professor Dr. Carlos Castilho de Barros. O objetivo desse estudo é rastrear a presença de alelos HLA DQ2 e DQ8 da Doença Celíaca (DC) entre os celíacos e seus parentes de primeiro grau. A análise dos alelos será realizada pela coleta de saliva dos celíacos vinculados a ACELBRA, que serão encaminhadas para o Laboratório de Nutriflogênica da Faculdade de Nutrição/UFPel, para posterior análises dos alelos no DNA. Realizando as análises dos alelos, teremos a prevalência dos genes envolvidos na DC dentre os participantes. Esses resultados irão contribuir para determinar a prevalência dos genes entre os celíacos estudados, além de possibilitar comparação com achados de outros estudos, bem como, elucidar o papel da genotipagem como uma ferramenta nas etapas da investigação da DC. 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 dados/resultados do estudo serão retornados para os seus participantes.

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

Atenciosamente,

João Luis Ricalde Gervasio - Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, UFPel. Telefone: (53) 99705-6988, e-mail: jlgervasio@yahoo.com.br, Fabiana Torma Botelho – Prof. da Faculdade de Nutrição da UFPel. Telefone: (53) 8105.0759, e-mail: fabibotelho@hotmail.com e Carlos Castilho de Barros – Prof. da Faculdade de Nutrição da UFPel, e-mail: barrosccpel@gmail.com.

Considerando as informações acima, confirmo ter sido informado (a) por escrito e verbalmente dos objetivos desta pesquisa. Desta forma, Eu _____, responsável pela Associação Brasileira de Celíacos do Brasil, Rio de Janeiro (ACELBRA-RJ), autorizo a realização desta pesquisa nessa instituição.

Assinatura e carimbo

APÊNDICE B

Termo de consentimento livre e esclarecido para celíacos ou responsáveis

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisadores responsáveis: João Luis Ricalde Gervasio, Fabiana Torma Botelho e Carlos Castilho de Barros. **Instituição:** Universidade Federal de Pelotas. **Endereço:** Rua Gomes Carneiro, nº 1. Centro. Pelotas – RS Telefone: (53) 8105.0759.

Concordo que meu (minha) filho (a) OU _____ participe do estudo “**Análise da Frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em celíacos e seus parentes de primeiro grau**”. Que tem por objetivo determinar a prevalência dos genótipos HLA-DQ2 (DQA1*0504 e DQB1*0201) e HLA-DQ8 (DRB1*04) e associar a presença dos alelos com o grau de lesão intestinal em celíacos.

O rastreamento dos alelos será realizado pela coleta de saliva para posterior identificação em laboratório. Para isso, no primeiro encontro meu filho(a) OU _____ precisará coletar saliva que irá consistir em enxágue da boca com água tratada e posterior coleta de saliva com cotonete de cabo alongado, esfregando várias vezes nas bochechas e responderei a um questionário sobre meus dados clínicos.

Fui informado que a justificativa para realização desse estudo se baseia na necessidade da identificação de fatores genéticos prevalentes na DC com o propósito de evidenciar fatores desencadeadores envolvidos. Fui ainda, informado que receberei retorno sobre as análises dos alelos realizadas, bem como orientações nutricionais que possibilitem melhoria na qualidade de vida, por meio de palestra. Recebi a informação de que não existem riscos no estudo e o benefício de participar na pesquisa é o fato que os resultados serão incorporados ao conhecimento científico e posteriormente a situações de ensino-aprendizagem, além de contribuir para uma maior divulgação da DC. Como já me foi dito, a participação de meu (minha) filho(a) ou _____ neste estudo será voluntária, não havendo nenhuma forma de recompensa lucrativa em participar da pesquisa e poderei interrompê-la a qualquer momento e que os resultados serão usados somente para fins de pesquisa, sendo que as nossas identidades permanecerão confidenciais 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) 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: __/__/__

Testemunha nome e assinatura: _____

Data: __/__/__

Além de autorizar que meu (minha) filho (a) ou _____ participe da pesquisa, com coleta de saliva e preenchimento de questionário, autorizo também os pesquisadores a armazenar o questionário e saliva concedidos por mim para análises posteriores.

Assinatura do responsável _____

Testemunha: _____ Data: __/__/__

.....

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

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: João Luis Ricalde Gervasio, contatos: (53) 99705-6988 ou por e-mail jlgervasio@yahoo.com.br, Carlos Castilho de Barros e Fabiana Torma Botelho (Faculdade de Nutrição. Campus Porto. Rua Gomes Carneiro, nº 1), contatos: (53) 8105.0759/8405.5627 fabibotelho@hotmail.com.

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL: _____

DATA: __/__/__

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisadores responsáveis: João Luis Ricalde Gervasio, Carlos Castilho de Barros e Fabiana Torma Botelho. **Instituição:** Universidade Federal de Pelotas. **Endereço:** Rua Gomes Carneiro, nº 1. Centro. Pelotas – RS Telefone: (53) 8105.0759.

Eu _____ concordo em participar da pesquisa “Estudo prevalência dos alelos de risco do complexo HLA DQ2 (DQA1*0504 e DQB1*0201) e DQ8 (DRB1*04) em pacientes celíacos do sul do país”. Que tem por objetivo determinar a prevalência dos genótipos HLA-DQ2 (DQA1*0504 e DQB1*0201) e HLA-DQ8 (DRB1*04) e associar a presença dos alelos com o grau de lesão intestinal em celíacos.

O rastreamento dos alelos será realizado através da saliva para posterior análise em laboratório. No primeiro encontro, será preciso coletar minha saliva, após um enxágue da boca com água tratada e posterior coleta de saliva com cotonete de cabo alongado, esfregando várias vezes nas bochechas e responderei a um questionário sobre meus dados clínicos. Terei um segundo encontro, onde irei obter os resultados e orientações educativas.

Fui informado que a justificativa para realização desse estudo se baseia na necessidade da identificação de fatores genéticos prevalentes na DC com o propósito de evidenciar fatores desencadeadores envolvidos. Fui ainda, informado que receberei retorno sobre as análises dos alelos realizadas, bem como orientações nutricionais que possibilitem melhoria na qualidade de vida, por meio de palestra. Recebi a informação de que não existem riscos no estudo e o benefício de participar na pesquisa é o fato que os resultados serão incorporados ao conhecimento científico e posteriormente a situações de ensino-aprendizagem, além de contribuir para uma maior divulgação da DC. Como já me foi dito, a minha participação será voluntária, não havendo nenhuma forma de recompensa lucrativa em participar da pesquisa e poderei interrompê-la a qualquer momento e que os resultados serão usados somente para fins de pesquisa, sendo que as nossas identidades permanecerão confidenciais 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.

ASSINATURA: _____ DATA: __/__/__

Testemunha: _____ Data: __/__/__

Além de me disponibilizar para coleta de saliva e responder o questionário, autorizo também os pesquisadores a armazenar o questionário e saliva concedidos por mim para análises posteriores.

Assinatura _____

Testemunha: _____ Data: __/__/__

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

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: João Luis Ricalde Gervasio, contatos: (53) 99705-6988 ou por e-mail jlgervasio@yahoo.com.br, Carlos Castilho de Barros e Fabiana Torma Botelho (Faculdade de Nutrição. Campus Porto. Rua Gomes Carneiro, nº 1), contatos: (53) 8105.0759/8405.5627 fabibotelho@hotmail.com.

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL: _____

DATA: __/__/__

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

APÊNDICE C
QUESTIONÁRIO 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO E ALIMENTOS
PESQUISA. Análise da frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em celíacos e seus parentes de primeiro grau

"

Pesquisadores responsáveis: Prof Dr. Carlos Castilho de Barros e Profª Dra. Fabiana Torma Botelho
Pesquisadores Principais: João Luis Ricalde Gervasio

1- Nome do associado: _____

2- Data de nascimento: ___/___/___

3- Sexo: () masculino () feminino

4- Cor: () branca () mulata () negra () amarela

5- Você considera sua origem:

() italiana () brasileira () alemã () portuguesa

() espanhola () asiática () outras: _____ () não sei

6- Você tem algum familiar com doença celíaca? () sim () não () não sei

Se sim, qual o grau de parentesco? _____

7- Qual era sua idade na época em que foi diagnosticada a doença celíaca: _____

8- Quanto tempo você levou para obter o diagnóstico da doença celíaca (da investigação ao diagnóstico): _____

9- Assinale se você apresentou esses sintomas antes do diagnóstico:

() aféscas

() anemia

() diarreia

() emagrecimento

() dor abdominal

() barriga inchada

() constipação ("prisão de ventre")

() lesões de pele

() dificuldade em ganhar peso

() não apresentava nenhum sintoma

() dificuldade em ganhar altura

() outros – Quais? _____

10- Já realizou biópsia do intestino delgado? () sim () não () não sei

11- Se sim, quantas vezes? _____

* Dessas, quantas foram com dieta contendo glúten? _____

* E quantas foram em dieta sem glúten? _____

12- Caso tenha realizado biópsia intestinal, qual foi o resultado da biópsia no qual obteve diagnóstico (grau de lesão intestinal/Marsh em dieta com glúten)? _____

13- Você já realizou testes genéticos para doença celíaca? () sim () não () não sei

Se sim: () positivo DQ2 () positivo DQ2 e DQ8

() positivo DQ8 () negativo () outros. Quais? _____

14- Assinale se você realizou algum dos exames abaixo na época do diagnóstico e qual o resultado:

() dosagem de anticorpos anti gliadina IgA: () normal () alterado () não lembro

() dosagem de anticorpos anti gliadina IgG: () normal () alterado () não lembro

() dosagem de anticorpos anti endomísio: () normal () alterado () não lembro

() dosagem de anticorpos anti transglutaminase: () normal () alterado () não lembro

() não sei

15- Assinale se você possui ou possuía alguma das doenças abaixo:

() Hipotireoidismo

() Infertilidade

() Diabetes Mellitus tipo 1

() Abortos de repetição

() Síndrome de Turner

() Dermatite herpetiforme

() Síndrome de Williams

() Deficiência de IgA

() Síndrome de Down

() Osteoporose

() Osteopenia

() Intolerância à proteína do leite de vaca

() Doença auto-imune de tireóide

() Outras – Qual/Quais? _____

() Doença auto-imune de fígado

() Não possui ou possuía nenhuma dessas doenças

() Intolerância à lactose

11. 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

LUDVIGSSON, Jonas F et al. "The Oslo definitions for coeliac disease and related terms." *Gut* vol. 62,1 (2013): 43-52. doi:10.1136/gutjnl-2011-301346

SHARMA, Natasha et al. "Pathogenesis of Celiac Disease and Other Gluten Related Disorders in Wheat and Strategies for Mitigating Them." *Frontiers in nutrition* vol. 7 6. 7 Feb. 2020, doi:10.3389/fnut.2020.00006

ABREU, Rejane W. de et al. Detection of gluten in foods by means of ELISA *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)* [online]. 2006, vol.65, n.3, pp. 176-180. ISSN 0073-9855.

LUDVIGSSON JF, Rubio-Tapia A, van Dyke CT, Melton LJ, Zinsmeister AR, Lahr BD, et al. Increasing incidence of celiac disease in a North American population. *The American journal of gastroenterology*. 2013 May 19;108(5):818–24.

FERREIRA, Fátima & Inácio, Filipe. Pathology associated with wheat: IgE and non-IgE mediated allergy, celiac disease, non-celiac hypersensitivity, FODMAP (Fermentable, Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides and Polyols). (2018). *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*. 26. 171-187

SILVA, Tatiana Sudbrack da Gama e; FURLANETTO, Tania Weber. Diagnóstico de doença celíaca em adultos. *Rev. Assoc. Med. Bras., São Paulo*, v.56, n.1, p.122-126, 2010.

RASHTAK S, Murray JA. Review article: coeliac disease, new approaches to therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012;35(7):768-781.

CIESUNSKI, J. Z; Kotze, Lorete Maria da Silva; Utiyama, Shirley Ramos da Rosa. Celiac disease treatment; state of the art. ***GED gastroenterol. endosc. dig*** ; 35(3): 114-121, *jul.-set. 2016. Ilustrado*. Artigo em Português | LILACS | ID: biblio-2446

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

YUAN, J., GAO J.; LI, X.; LIU, F.; WIJMENGA, C.; CHEN, H., et.al. The Tip of the "Celiac Iceberg" in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. (2013)

MALAMUT G, Cording S, Cerf-Bensussan N. Recent advances in celiac disease and refractory celiac disease. *F1000Res*. 2019; 8:F1000 Faculty Rev-969. Published 2019 Jun 26. doi:10.12688/f1000research.18701.1

ZHU, Julie et al. "Celiac Disease: Against the Grain in Gastroenterology." *Journal of the Canadian Association of Gastroenterology* vol. 2,4 (2019): 161-169. doi:10.1093/jcag/gwy042

SOLLID LM, Lie BA. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005;3(9):843-851.

BROWN NK, Guandalini S, Semrad C, Kupfer SS. A Clinician's Guide to Celiac Disease HLA Genetics. *Am J Gastroenterol*. 2019;114(10):1587-1592.

SCIURTI M, Fornaroli F, Gaiani F, et al. Genetic susceptibility and celiac disease: what role do HLA haplotypes play?. *Acta Biomed*. 2018;89(9-S):17-21. Published 2018 Dec 17

ALMEIDA LM, Castro LC, Uenishi RH, et al. Diminuição da prevalência de doença celíaca em idosos brasileiros. *World J Gastroenterol*. 2013; 19 (12): 1930-1935. doi: 10.3748 / wjg.v19.i12.1930

NOBRE, S. Rito; SILVA, T. e CABRAL, J.E. Pina. Doença celíaca revisitada. *J Port Gastreterol*. [online]. 2007, vol.14, n.4 [citado 2020-06-14], pp.184-193.

QUEIROZ, MS et al. Prevalência de doença celíaca em crianças brasileiras de baixa estatura. *Braz J Med Biol Res* [online]. 2004, vol.37, n.1

POPP A, Kivelä L, Fuchs V, Kurppa K. Diagnosing Celiac Disease: Towards Wide-Scale Screening and Serology-Based Criteria?. *Gastroenterol Res Pract*. 2019;2019:2916024. Published 2019 Aug 6.

KELLY CP, Bai JC, Liu E, Leffler DA. Advances in diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*. 2015 May;148(6):1175–86.

KASWALA DH, Veeraraghavan G, Kelly CP, Leffler DA. Celiac Disease: Diagnostic Standards and Dilemmas. *Diseases*. 2015;3(2):86-101. Published 2015 Jun 16.

FORD AC, Ching E, Moayyedi P. Meta-analysis: yield of diagnostic tests for coeliac disease in dyspepsia. *Aliment Pharmacol Ther*. 2009 Jul;30(1):28-36.

VOLTA U, Villanacci V. Celiac disease: diagnostic criteria in progress. *Cell Mol Immunol*. 2011;8(2):96-102.

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

LUDVIGSSON, F. J.; LEFFLER, A. D.; BAI, J. C.; BIAGI, F.; FASANO, A. et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Original Article*. 2012.

LIONETTI, E.; Catassi, C. New Clues in Celiac Disease Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. *International Reviews of Immunology*. v.30. p.219–231. 2011.

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

ITZLINGER A, Branchi F, Elli L, Schumann M. Gluten-Free Diet in Celiac Disease- Forever and for All?. *Nutrients*. 2018;10(11):1796. Published 2018 Nov 18.

TYE-DIN JA, Galipeau HJ, Agardh D. Celiac Disease: A Review of Current Concepts in Pathogenesis, Prevention, and Novel Therapies. *Front Pediatr*. 2018;6:350. Published 2018 Nov 21.

CAIO G, Volta U, Sapone A, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med*. 2019;17(1):142. Published 2019 Jul 23

*Guia do Clínico para a Doença Celíaca HLA Genetics/American Journal of Gastroenterology*114 (10): 1587-1592, outubro de 2019.