

FREQUÊNCIA DE ALELOS HLA-DQ2 E HLA-DQ8 E RELAÇÃO COM O RISCO DE DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA CELÍACA EM PARENTES DE PRIMEIRO GRAU DE CELÍACOS: DADOS PRELIMINARES

**GIOVANA RIBEIRO PEGORARO¹; MÔNICA SCHIAVON DA COSTA²;
AUGUSTO SCHNEIDER³; FABIANA TORMA BOTELHO⁴; CARLOS CASTILHO
BARROS⁵**

¹Universidade Federal de Pelotas – giovana.pegoraro@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – monica_schiavon@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – augustoschneider@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – fabibotelho@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – barrosccpel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A doença celíaca (DC) é uma doença crônica inflamatória que acomete o intestino delgado, sendo ocasionada pela associação de três fatores: suscetibilidade genética, resposta autoimune e exposição ao glúten (LUND et al., 2015). Esta condição, quando não tratada, resulta em inflamação do epitélio intestinal, aumento na deposição de linfócitos, atrofia das vilosidades e produção de auto anticorpos, originando um quadro mal absorvivo. Em consequência disso, há o aparecimento de sintomas como dor e distensão abdominal, diarreia crônica ou até mesmo constipação (HUSBY, et al., 2012). Além destes, pode haver o surgimento de anormalidades extra intestinais como anemia ferropriva, emagrecimento, dificuldade em ganhar peso e estatura, infertilidade, dentre outras, ocasionadas por deficiências de vitaminas e minerais (TAYLOR, et al., 2015). Adicionalmente, acredita-se que a presença de algumas doenças esteja relacionada ao aumento da prevalência de DC, como por exemplo, intolerância à lactose, hipotireoidismo, osteoporose, algumas síndromes, como síndrome de Down, além de doenças autoimunes englobando diabetes mellitus tipo 1, artrite reumatoide e tireoidite autoimune (PELKOWSKI & VIEIRA, 2014).

O diagnóstico da DC é feito com base nas manifestações clínicas características da doença, realização de testes genéticos e sorológicos e biópsia intestinal (KELLY et al., 2015). No que diz respeito aos testes genéticos, a genotipagem de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 que estão intimamente relacionados à DC, pode ser realizada. A identificação genética é utilizada com o intuito de tornar o diagnóstico mais preciso, uma vez que indivíduos que são negativos para estes alelos, apresentarão uma probabilidade reduzida do acometimento da doença (HUSBY et al., 2012). Salienta-se que a probabilidade de herdabilidade da DC em indivíduos que possuem alelos não-HLA fica em torno de 5%, enquanto a presença dos alelos HLA chega a 35% (GUTIERREZ-ACHURY et al., 2011). Além disso, existem relatos de que parentes de primeiro grau de pacientes celíacos que são HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8 positivos têm um risco aumentado de aproximadamente 10% de desenvolver a DC, pois compartilham fatores de risco ambientais e genéticos (WESSELS et al., 2015). Diante disso, objetivou-se verificar a frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e relacioná-los com o risco de desenvolvimento da doença celíaca em parentes de primeiro grau de celíacos.

2. METODOLOGIA

A presente pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UFPel, sob número de CAAE:

62209416.4.0000.5317. A população alvo do estudo foi constituída por indivíduos parentes de primeiro grau (pais, irmãos e filhos) de celíacos diagnosticados por biópsia do intestino delgado. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), diante da concordância como voluntários à pesquisa. Posteriormente, todos responderam a um questionário com questões sociodemográficas e sobre saúde. Além disso, foi realizada coleta de saliva, a qual foi feita em duplicata com auxílio de swab estéril para posteriores análises dos alelos no DNA. As amostras de saliva foram mantidas refrigeradas até o momento da extração do DNA. As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Nutrifisiogenômica da Faculdade de Nutrição da UFPel.

A extração de DNA foi uma adaptação do método descrito por MILLER, DYKES e POLESKY (1988), realizada com uso de EAR Buffer e proteinase K. A precipitação do gDNA foi feita com isopropanol e os sais lavados com etanol 70%, O pellet foi hidratado com TE Buffer.

Os alelos amplificados neste estudo foram DQA1*0501, DQB1*0201 (HLA-DQ2) e DRB1*04 (HLA-DQ8). A amplificação do DNA foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), com adaptações do método proposto por SACCHETTI et al., (1997). Para isso, foram utilizados primers específicos e o máster mix para PCR GoTaq da PROMEGA (USA). Após eletroforese em gel de agarose, os produtos das PCRs foram visualizados em transiluminador com luz ultravioleta.

A análise dos dados foi realizada por meio do software STATA® usando análise de qui-quadrado e significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra obtida até o momento foi de 184 indivíduos, destes, 56% foram do sexo feminino e 44% do sexo masculino. A grande maioria dos participantes foram brancos (95,1%). Em relação ao parentesco, 48,9% da amostra eram pais, 28,3% filhos, 20,6% irmãos e 2,2% irmãos e filhos de celíacos.

No que diz respeito ao questionamento dos sintomas, 66 indivíduos (35,9%) garantiram não apresentar nenhum tipo de sintoma, já 118 participantes (64,1%) referiram apresentar algum dos sintomas característicos da doença celíaca. Dentre as manifestações gastrointestinais mais frequentemente relatadas encontram-se: distensão (31,52%) e dor (25,00%) abdominais, diarreia (13,59%) e constipação intestinal (10,87%). Já em relação às ocorrências extra intestinais destacam-se: dor de cabeça (14,13%), lesões de pele (13,59%), anemia (9,24%), dificuldade em ganhar peso (8,70%), emagrecimento (5,43%) e dificuldade em ganhar altura (3,26%).

No que se refere às doenças que aumentam a prevalência de doença celíaca, 107 indivíduos (58,20%) referiram não possuir nenhuma destas, porém 77 pessoas (41,80%) relataram apresentar alguma. Dentre as mais comumente encontradas salienta-se intolerância à lactose (19,57%), hipotireoidismo (10,87%), artrite reumatoide (7,61%) e osteoporose (3,26%).

A distribuição da frequência de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 nos parentes de primeiro grau de celíacos se deu da seguinte forma: 40,22% apresentaram os dois alelos DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201), 17,39% apenas o alelo A (DQA1*0501) e 17,93% somente o alelo B (DQB1*0201), já o alelo DQ8 (DRB1*04) esteve presente em 22,83% dos indivíduos, e o aparecimento de ambos os alelos DQ2 e DQ8 esteve em 7,07% dos participantes. Ainda, salienta-se que apenas 31 indivíduos (16,85%) não possuíram nenhum dos alelos em questão. Em um estudo realizado por CASTRO-ANTUNES et al. (2011), que

avaliou 126 familiares de primeiro grau de celíacos, encontrou-se que 52,4% destes apresentaram DQ2, 15,9% demonstraram DQ8 enquanto 10,3% expressaram DQ2 e DQ8. Em outro estudo, desenvolvido por CECILIO & BONATTO (2015), onde foram avaliados somente 29 familiares, encontrou-se que 76% destes, apresentaram apenas o HLA-DQ2, 10,3% apenas o HLA-DQ8 e que 3,4% demonstraram ambos.

Ao relacionar a presença de alelos com a ocorrência de sintomas (tabela 1), foi possível constatar que a associação entre os alelos DQA1*0501 e DQB1*0201 com DRB1*04, ou apenas DQB1*0201 com DRB1*04, aumentou o risco da ocorrência de sintomas relacionados à doença celíaca ($p = 0,041$). Este dado sustenta a ideia de que a presença destes alelos pode estar realmente relacionada à ocorrência da doença celíaca, uma vez que traz consigo manifestações clínicas bem marcantes da doença em questão.

TABELA 1. Relação entre frequência alélica e sintomas em parentes de primeiro grau de celíacos (n=184).

Perfil	Sintomas (%)
AB	64,13
AB + DR	84,62*
A	62,96
A + DR	0,00
B	47,83
B + DR	80,00*
DR	64,29

* Teste de Pearson $\chi^2 = 16.1019$ Pr = 0.041

AB = DQA1*0501 e DQB1*0201; A = DQA1*0501; B = DQB1*0201; DR = DRB1*04

4. CONCLUSÕES

O método utilizado neste estudo é capaz de predizer o risco para que parentes de celíacos venham a desenvolver sintomatologia. Estes dados podem ser usados para que estas pessoas procurem auxílio médico, e que sigam em acompanhamento, pois já que apresentam condições favoráveis ao aparecimento da doença, seria possível realizar o diagnóstico precoce evitando complicações futuras.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTRO-ANTUNES, M.M.; CROVELLA, S.; BRANDÃO, L.A.C.; GUIMARÃES, R.L.; MOTTA, M.E.F.A.; SILVA, G.A.P. Frequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 in celiac patients and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil. **Clinical Science**, v.66, p.227-231, 2011

CECILIO, L.A.; BONATTO, M.W. Prevalência do HLA DQ2 e D8 em pacientes portadores da doença celíaca, nos seus familiares e na população geral. **ABCD – Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**. v.28, p.183-185, 2015.

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

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

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

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

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

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

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

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

WESSELS, M.M.S.; VRIEZINGA, S.L.; KOLETZKO, S.; WERKSTETTER, K.; VILLASANTE, G.C.; SHAMIR, R.; et al. Impacto n parentes of HLA-DQ2/DQ8 genotyping in healthy children from coeliac families. **European Journal of Human Genetics**, v.23, p.405-408, 2015.