

## PREVALÊNCIA DE ALELOS HLA-DQ2 E HLA-DQ8 EM CELÍACOS E ASSOCIAÇÃO COM GRAU DE LESÃO INTESTINAL

MÔNICA SCHIAVON DA COSTA<sup>1</sup>; GIOVANA RIBEIRO PEGORARO<sup>2</sup>;  
AUGUSTO SCHNEIDER<sup>3</sup>; FABIANA TORMA BOTELHO<sup>4</sup>; CARLOS CASTILHO  
BARROS<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em  
Nutrição e Alimentos – monica\_schiavon@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em  
Nutrição e Alimentos – giovana.pegoraro@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em  
Nutrição e Alimentos – augustoschneider@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em  
Nutrição e Alimentos – fabibotelho@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em  
Nutrição e Alimentos – barroscpel@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A doença celíaca (DC) é caracterizada por ser uma patologia sistêmica imuno-mediada, desencadeada através da ingestão de prolaminas presentes no glúten, onde uma das suas principais manifestações estaria relacionada a lesão da mucosa intestinal. O processo de desenvolvimento da doença está associado com anticorpos da DC e fatores genéticos tais como Antígeno Leucocitário Humano (HLA), HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) e HLA-DQ8 (DRB1\*04; LUDVIGSSON et al., 2012).

Para se estabelecer o diagnóstico de DC é necessário, primeiramente, a realização de testes sorológicos para doença. Em caso de sorologia positiva, o paciente passa para segunda fase de avaliação que consiste na realização da biópsia intestinal, considerado o “padrão ouro” para concluir o diagnóstico. Outra alternativa para rastreio ou exclusão de diagnóstico, seria a genotipagem do antígeno leucocitário humano (HLA) para HLA-DQ2 e HLADQ8, alelos que estão relacionados com a patogenicidade da doença (HUSBY et al., 2012).

O uso da genotipagem é aconselhado em grupos de risco para DC, tais como parentes de primeiro grau, portadores de desordens auto-imunes e síndromes genéticas (HUSBY et al., 2012). Outra contribuição de grande relevância da identificação do HLA-DQ8 e HLA-DQ2 seriam em pacientes assintomáticos. Nestes pacientes não há evidências clínicas de lesão intestinal e os demais sintomas recorrentes da má absorção também não fazem parte da sintomatologia da doença (HUSBY et al., 2012).

O HLA está localizado no braço curto do cromossomo 6, sendo dividido em três classes (I, II e III). A classe II do HLA é responsável em codificar DQ8 e DQ2, principais fatores genéticos relacionados com a resposta imunológica inadequada. O gene DQ2 poderá ser codificado pelo haplótipo DR3- DQ2 ou pelo DQ2.5 para formar a cadeia HLA-DR3-DQA1\*0501- DQB1\*0201 (cis) e na forma trans poderá ser codificado pelo haplótipo DR7-DQ2 ou pelo DQ2.2 para cadeia HLA-DR3- DQA1\*0505- DQB1\*0301 ou DR7-DQA1\*0201- DQB1\*0202. Já para DQ8 poderá ser codificado pelo haplótipo DR4 formando a cadeia HLA-DQA1\*0301- DQB1\*0302 ou DRB1\*04 (ROUJON et al. 2011). Estima-se que a prevalência de DQ2 e DQ8 na população em geral seja de 30% enquanto nos celíacos pode chegar a 95% (HUSBY ET al., 2012; MURRAY ET al., 2007).

O rastreamento do HLA, DQ2 e DQ8, tanto para exclusão como para auxiliar na continuidade da investigação do diagnóstico de DC, pode ser uma

ferramenta útil para identificar pacientes, principalmente com a forma não-clássica da doença (OLLIKKA et al., 2009). Para tanto, se torna necessário investigar a prevalência desses alelos em diferentes grupos de celíacos, com o intuito de estabelecer um padrão de distribuição desses genes e comparar com outras pesquisas em diferentes regiões geográficas. Assim, o objetivo deste estudo é rastrear a prevalência dos genótipos HLA-DQ2 (DQA1\*0504 e DQB1\*0201) e HLA-DQ8 (DRB1\*04) e associar ao grau de lesão intestinal em celíacos.

## 2. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo descritivo, do tipo transversal objetivando o rastreamento de alelos HLA-DQ2 (alelos DQA1\*0504 e DQB1\*0201) e HLA-DQ8 (alelo DRB1\*04) entre os celíacos. Os participantes foram selecionados por critério de conveniência, constituindo uma amostra de 118 celíacos, sendo incluídos indivíduos de qualquer idade, desde que apresente diagnóstico confirmado de DC. O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Medicina (parecer: 1.840.918) e segue as normas estabelecidas pela Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012.

A fim de avaliar o perfil dos celíacos do estudo foi adaptado um questionário já validado e testado, constituído de questões abertas e fechadas sobre manifestações clínicas, método de diagnóstico e presença de comorbidades (CASSOL et al., 2007).

Para a extração de DNA de saliva foi feito o protocolo de EAR Buffer e proteinase K. A precipitação do gDNA foi feita com isopropanol e este foi lavado com etanol 70%. O gDNA foi hidratado com 50 µL de TE Buffer. Método de extração de DNA adaptado de MILLER, DYKES e POLESKY (1988).

Os alelos foram amplificados pelo método de reação em cadeia de polimerase (PCR) e os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose a 2% por eletroforese e visualizados em transluminador com luz ultravioleta. Método de amplificação de DNA baseado no descrito por SACCHETTI, 1997. Os *primers* que foram utilizados estão representados na Tabela 1.

**Tabela 1:** Características dos *primers* utilizados para PCR.

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>	<b>Comprimento dos produtos da PCR</b>
DQA1*0501	5'-AGCAGTTCTACGTGGACCTGGGG-3' 5'-GGTAGAGTTGGAGCGTTAACAGA-3'	144
DQB1*0201	5'-CGCGTGCCTTGTGAGCAGAAG-3' 5'-GGCGGCAGGCAGCCCCAGCA-3'	110
DRB1*04	- GGTTAACATGAGTGTCAATTCTTAAAC- 5'-GTTGTGTCTGCAGTAGGTGTC-3'	177

\* pb: pares de base; \* DQA1\*0501 e DQB1\*0201 para DQ2; \* DRB1\*04 para DQ8. Adaptado de Sacchetti, 1997.

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

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo obteve uma amostra de 118 celíacos com média de idade de 33 anos (DP 2,59), a maior parte dos participantes do sexo feminino (84%) e apresentaram sintomas no momento diagnóstico da DC (97,4%, DP 15,8).

Em relação a manifestações da doença os sintomas que levaram os pacientes a busca do diagnóstico foram principalmente a distensão abdominal (73,7%; DP 44,2), dor abdominal (71,2%; DP 45,5), seguida de diarréia (57,6%; DP 49,6) e anemia (46,6%; DP 50,0), tais sintomas são caracterizados pela forma clássica doença. Já a prevalência de doenças correlacionadas com a DC a intolerância a lactose foi a mais prevalente, afetando 48,3% (DP 50,2) dos indivíduos estudados, a segunda doença de maior recorrência foi o hipotiroïdismo com 20,3% (DP 40,4) e em seguida a osteopenia 18,6% (DP 39,1).

A prevalência dos alelos DQ2 e DQ8 nessa população foi de 94%, o que se relacionou com o encontrado por CASTRO-ANTUNES et al.(2011) e MASHAYEKCH et al. (2015), que obtiveram uma prevalência de 93,4% e 96%, respectivamente. Já em relação à prevalência de um dos fatores genéticos, neste estudo foi encontrado 78,4% do genótipo DQ2, achado semelhante ao estudo de CASTRO-ANTUNES et al.(2011), que obteve 75,6% de prevalência. Já para o genótipo DQ8 o estudo atual obteve 6,3% dos celíacos, dado inferior ao encontrado na literatura que seria de 17,6% (CASTRO-ANTUNES et al., 2011).

Em relação ao grau de lesão intestinal, foi mais relatada no genótipo DQ2 (74,4%), o que se correlaciona ao número de indivíduos com tal genótipo. De acordo com a classificação de Marsh-Oberhuber, que classifica de 1 a 4 o grau de lesão intestinal de forma progressiva, os participantes apresentaram 41 % de lesão intestinal grau 3b, fase caracterizada pela parcial hiperplasia de criptas e atrofia de vilosidades. Porém, não se obteve relação estatisticamente significativa entre perfil genético e grau de lesão intestinal ( $p= 0,2$ ), que pode ser relacionado à baixa prevalência de celíacos com lesão intestinal definidas segundo Marsh. Neste mesmo sentido MURRAY et al., (2007) também não obteve associação entre perfil genético e grau de lesão intestinal. O percentual de prevalência do perfil genético e grau de lesão intestinal podem ser visualizados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Prevalência do perfil genético e grau de lesão intestinal em celíacos

Perfil	Prevalência (%)	Lesão intestinal* (%)
<b>DQA1* 0501</b>	4,5 (5)	7,7 (3)
<b>DQA1* 0501 e DQB1*0201</b>	78,4 (82)	74,4 (29)
<b>DQA1* 0501, DQB1*0201 e DRB1*04</b>	6,3 (7)	7,7 (3)
<b>DQA1* 0501e DRB1*04</b>	0,9 (1)	0,0 (0)
<b>DQB1*0201</b>	5,4 (6)	5,1 (2)
<b>DQB1*0201 e DRB1*04</b>	2,7 (3)	2,6 (1)
<b>DRB1*04</b>	6,3 (7)	2,6 (1)

\*não houve associação entre perfil genético e grau de lesão intestinal  $p= 0,2$ .

#### 4. CONCLUSÕES

No presente estudo os alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0504 e DQB1\*O201) e HLA-DQ8 (DRB1\*04) estiveram presentes em 94% dos participantes , sendo assim, apenas uma pequena parcela dos celíacos teriam causas genéticas não relacionadas ao sistema HLA. Não houve associação do perfil genético e grau de

lesão intestinal, que pode estar relacionado com a baixa utilização da classificação de Marsh-Oberhuber para diagnosticar a DC.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, H.; ABREU, I.; NOGUEIRAS, A.; SÁ, C.; GONÇALVES, C; CLETO, P. et al. Primeira Determinação de Prevalência de Doença Celíaca numa População Portuguesa. **Acta Medica Portuguesa**. v.19. p.115-120. 2006.
- CASSOL C. A., De PELLEGRIN C P, WAHYS M.L C., PIRES M. M. S., e NASSAR S. M. Perfil clínico dos membros da Associação dos celíacos do Brasil – regional de Santa Catarina (ACELBRA-SC). **Arquivos de Gastroenterologia**.v. 44 (3). 2007.
- HUSBY, S; KOLETZKO, 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(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. Doi:10.1136/gutjnl-2011-301346.
- MASHAYEKHI, K.; KOUSHKI, K.; ROSTAMI-NEJAD, M. The Correlation Between Hla-DQ2 and DQ8 Haplotypes and Abnormal Histology in Patients with Celiac Disease. **International Journal of Analytical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences**. v. 4 (2). 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 Journals**. v.16(13). 1988.
- MURRAY, J. A.; MOORE, S. B.; DYKE, C. T. V.; LAHR, B. D.; DIERKHISING, R. A.; ZINSMEISTER, A. et al. HLA DQ Gene Dosage and Risk and Severity of Celiac Disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**. v.;5. P.1406–1412. 2007. Doi:10.1016/j.cgh.2007.08.013.
- OLLIKKA, P.; RAUSSI, H. M.; JAAKKOLA, V. L.; HOVINEN, J., HEMMILÄ, I.; Genotyping of celiac disease-related-risk haplotypes using a closed-tube polymerase chain reaction analysis of dried blood and saliva disk samples. **Analytical Biochemistry**. v.386, p. 20–29. 2009.
- 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(1). 2012.
- ROUJON, P.; GUIDICELLI, G.; MOREAU, J.F.; TAUPIN, J.L. Immunogénétique de la maladie coeliaque. **Pathologie Biologie**. v.61. p. 5–11. 2013.
- 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. 43, 1997.