

FREQUÊNCIA DOS ALELOS DE RISCO RELACIONADOS AOS COMPLEXOS HLA-DQ2 E HLA-DQ8 EM PARENTES DE PRIMEIRO GRAU DE CELÍACOS

GIOVANA RIBEIRO PEGORARO¹; MÔNICA SCHIAVON DA COSTA²; FABIANA TORMA BOTELHO³; INES SCHADOCK⁴; AUGUSTO SCHNEIDER⁵; CARLOS CASTILHO BARROS⁶

¹Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos - UFPel - giovana.pegoraro@hotmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos - UFPel - monica_schiavon@yahoo.com.br

³Faculdade de Nutrição - UFPel - fabibotelho@hotmail.com

⁴Faculdade de Medicina - FURG - i.schadock@ymail.com

⁵Laboratório de Nutrigenômica - UFPel - augustoschneider@gmail.com

⁶Laboratório de Nutrigenômica - UFPel - barroscpcel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Doença Celíaca (DC) é uma doença crônica inflamatória que acomete o intestino delgado e é ocasionada pela associação de três fatores: suscetibilidade genética, resposta autoimune e exposição ao glúten (ARAYA et al., 2015). A DC, quando não tratada, resulta em inflamação do epitélio intestinal, aumento da deposição de linfócitos, atrofia das vilosidades e produção de resposta autoimune, originando um quadro de mal absorção e o surgimento de diversas manifestações clínicas tanto a nível intestinal como a nível sistêmico (ROSTON et al., 2006).

O diagnóstico da DC é feito com base nas manifestações clínicas, realização de testes sorológicos, testes genéticos e biópsia intestinal, a qual é considerada o padrão-ouro no fechamento do diagnóstico (HUSBY et al., 2012; CASSOL et al., 2007). No que diz respeito aos testes genéticos, a genotipagem dos alelos de risco relacionados aos heterodímeros HLA-DQ2 e HLA-DQ8 pode ser realizada. A identificação desses alelos funciona como diagnóstico de análise de risco, onde indivíduos negativos apresentam probabilidade reduzida de acometimento da doença. Por isso, esse procedimento pode ser utilizado como primeira opção de rastreamento em parentes de primeiro grau de celíacos, contribuindo para avaliação da necessidade de realização de outros exames (HUSBY et al., 2012). Existe um grande número de celíacos sem diagnóstico. Estima-se que para cada caso diagnosticado exista uma média de 5 a 10 não diagnosticados (CATASSI et al., 2015). O fato de um indivíduo ser parente de primeiro grau de celíaco faz com que este possua um risco aumentado para desenvolver a doença, pois compartilha fatores de risco ambientais e genéticos (TAYLOR et al., 2015; WESSELS et al., 2015). Diante disso, o objetivo desse estudo foi verificar a frequência dos alelos de risco dos complexos HLA-DQ2 (DQA1*05 e DQB1*02) e HLA-DQ8 (DRB1*04) em parentes de primeiro grau de celíacos.

2. METODOLOGIA

A 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. Para inclusão no estudo, o indivíduo deveria ser livre do diagnóstico da DC e parente de primeiro grau (pais, irmãos ou filhos) de celíacos comprovadamente diagnosticados por biópsia do intestino delgado. Todos os participantes assinaram um 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 células da mucosa bucal com o auxílio de *swab* estéril para posteriores análises dos alelos no DNA. Os *swabs* foram mantidos refrigerados até o momento da extração do DNA. As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrifisiogenômica da Faculdade de Nutrição da UFPel.

A extração do DNA foi uma adaptação do método descrito por MILLER, DYKES e POLESKY (1988), realizada com uso de EAR Buffer e proteinase K. Realizou-se a precipitação do gDNA com isopropanol e os sais foram lavados com etanol 70%. O pellet foi hidratado com TE Buffer. Os alelos amplificados neste estudo foram DQA1*05, DQB1*02 (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 e por fotodocumentador.

A tabulação dos dados foi feita no Microsoft Office Excel 2010. A análise estatística foi realizada no programa estatístico STATA versão 12.0. A frequência das variáveis sociodemográficas e dos alelos de risco relacionados aos complexos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 foram expressas em percentuais.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra obtida no presente estudo foi de 224 indivíduos, com média de idade de $34,8 \pm 23,5$ anos, sendo mais prevalente a faixa etária de 21-59 anos (44,2%). A população do estudo constituiu-se em dois estados no sul do Brasil: Santa Catarina (47,8%) e Rio Grande do Sul (52,2%). A frequência de participantes oriundos do estado de Santa Catarina, deu-se em sua maioria na cidade de Florianópolis (37,1%), e no estado do Rio Grande do Sul, predominou a participação de indivíduos de Porto Alegre (36,2%). Da população estudada, a maioria foi de cor branca (95,1%), do sexo feminino (57,6%), e em relação ao parentesco, pais de celíacos (45,0%).

Em relação às análises de genotipagem dos alelos de risco do HLA-DQ2 e HLA-DQ8 observou-se um percentual total de 79,9% de alelos de risco para HLA-DQ2 e 29,9% para HLA-DQ8, observando uma frequência total de 87,0% para ao menos um dos alelos de risco HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8. Apenas 13,0% dos indivíduos foram negativos para todos os alelos estudados (Tabela 1).

TABELA 1: Frequência dos alelos de risco relacionados ao HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em parentes de primeiro grau de celíacos (n=224).

Alelos	Perfil	n (%)
DQA1*0501	A	30 (13,4)
DQB1*0201	B	23 (10,3)
DQA1*0501 e DQB1*0201	AB	76 (33,9)
DRB1*04	DR	16 (7,1)
DQA1*0501 + DRB1*04	A + DR	9 (4,0)
DQB1*0201 + DRB1*04	B + DR	14 (6,3)
DQA1*0501 e DQB1*0201 + DRB1*04	AB + DR	27 (12,0)
Nenhum dos alelos	—	29 (13,0)
Total alelos HLA-DQ2	—	179 (79,9)
Total alelos HLA-DQ8	—	67 (29,9)

O perfil genético A, B ou AB representa a presença de um ou dois dos alelos de risco para HLA-DQ2, e o perfil DR a presença do alelo de risco para HLA-DQ8.

Os alelos de risco relacionados aos genes do sistema HLA-DQ2 e DQ8 estão presentes em 90-95% dos celíacos e por isso constituem o conjunto de genes mais importantes na avaliação do risco genético para o desenvolvimento da DC (MEGIORNI & PIZZUTI, 2012). Apesar da importância destes alelos, eles são insuficientes para o desencadeamento da DC, pois estima-se que estejam presentes em 30% da população em geral (TAYLOR et al., 2015). No presente estudo, a alta frequência total dos alelos de risco dos complexos HLA-DQ2/DQ8 (87%) e a baixa parcela de resultados negativos (13%), nos parentes de primeiro grau de celíacos estudados, ajuda a delinear o risco destes indivíduos a desenvolverem DC. Até o momento, não encontramos pesquisas semelhantes ao presente estudo avaliando os alelos de risco relacionados à DC em parentes de primeiro grau de celíacos nos estados do RS e SC, mas encontramos em outros estados do Brasil. Um estudo realizado com 126 familiares de primeiro grau de celíacos, na cidade de Recife (PE) identificou a presença dos alelos de risco DQA1*0501 e DQB1*0201 (DQ2) e DQB1*0302 (DQ8), sendo que os alelos do complexo HLA-DQ2 foram encontrados em 66 indivíduos (52,4%) e o alelo de risco do complexo HLA-DQ8 foi verificado em 20 indivíduos (15,9%), enquanto que 13 (10,3%) expressaram os três alelos de risco e 27 (21,4%) foram negativos para todos os alelos estudados, observando uma frequência total dos alelos dos complexos HLA-DQ2/DQ8 em 78,6% da amostra (CASTRO-ANTUNES et al., 2011). Dessa forma, ao comparar com o presente estudo, verifica-se que a ausência dos alelos de risco foi maior e que a frequência total dos alelos foi quase 10% menor nos parentes de Recife. Algumas diferenças podem ser visualizadas em decorrência de fatores relacionados à origem da população ou até mesmo a existência de outros fatores genéticos não relacionados ao sistema HLA. Além disso, a exposição a fatores ambientais variados também pode interferir, como o uso de medicamentos à base de interferon- α , presença de infecções intestinais e práticas de introdução alimentar na infância (SABATINO & CORAZZA, 2009). Outro estudo realizado em 193 parentes de primeiro grau de celíacos, na cidade de Brasília (DF) identificou a presença dos mesmos alelos estudados no presente estudo. Sendo assim, 131 indivíduos (67,8%) foram positivos para os alelos de risco do HLA-DQ2 e apenas 9 (4,6%) para o alelo do complexo HLA-DQ8 sozinho, mas ao associar com a presença dos alelos do complexo HLA-DQ2, encontrou-se 42 pessoas (21,9%). Ainda nesse mesmo estudo, apenas 11 indivíduos (5,7%) foram negativos para todos os alelos de risco estudados, dessa forma, encontrou-se uma prevalência total dos alelos dos complexos HLA-DQ2/DQ8 de 94,3% (MARTINS et al., 2010). Ao comparar com o presente estudo observa-se que a menor frequência de indivíduos negativos e a maior frequência total da presença dos alelos nos parentes de Brasília parecem ter semelhanças.

4. CONCLUSÕES

Esses achados salientam a importância da investigação de alelos de risco relacionados aos complexos HLA-DQ2/DQ8 em parentes de primeiro grau de celíacos. Além disso, esses dados podem ser úteis para que estas pessoas busquem auxílio médico e que sigam em acompanhamento, pois já que apresentam risco genético para o aparecimento da doença, seria possível realizar o diagnóstico precoce evitando complicações futuras.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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.

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

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

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

ROSTON, A.; MURRAY, J.A.; KAGNOFF, M.F. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. **Gastroenterology**, v. 131, n. 6, p. 1981 – 2002, 2006.

SABATINO, A. DI.; CORAZZA, G.R. Coeliac Disease. **Lancet**, v. 373, p. 1480-1493, 2009.

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. Impact on parents of HLA-DQ2/DQ8 genotyping in healthy children from coeliac families. **European Journal of Human Genetics**, v.23, p. 405-408, 2015.