

PREVALÊNCIA DOS ALELOS DE RISCO DO COMPLEXO HLA-DQ2 E ASSOCIAÇÃO AO GRAU DE LESÃO INTESTINAL E RESULTADOS SOROLÓGICOS EM CELÍACOS DA REGIÃO SUL DO BRASIL

MÔNICA SCHIAVON DA COSTA¹; GIOVANA RIBEIRO PEGORARO², INÊS SHADOCK³, FABIANA TORMA BOTELHO⁴; CARLOS CASTILHO BARROS⁵

¹ Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Nutrição. Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos- monica_schiavon@yahoo.com.br

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

³ Universidade Federal de Rio Grande. Faculdade de Medicina- i.schadock@ymail.com

⁴ 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 imunomediada, desencadeada através da ingestão de prolaminas presentes no glúten, onde uma das suas principais manifestações estariam relacionada à lesão da mucosa intestinal (LUDVIGSSON et al., 2012; ROSTAMI-NEJAD et al. 2014). O processo de desenvolvimento da doença está associado a fatores ambientais e genéticos. Dentre os fatores genéticos, os mais citados na literatura são aqueles relacionados ao antígeno leucocitário humano (HLA), região cromossômica 6p21.31, classe II, mais especificamente os haplótipos de risco contendo os alelos DQA1*05 e DQB1*02 (HLA-DQ2) e DRB1*04 (HLA-DQ8), que estão envolvidos na codificação das proteínas DQ2 e DQ8 presentes nas células apresentadoras de抗ígenos (ROUJON et al. 2011). Estima-se que 95% dos celíacos apresentem pelo menos um dos alelos para DQ2 e o restante presente em sua maioria alelos para DQ8 (HUSBY et al., 2012). Além disso, acredita-se que a DC tenha uma prevalência mundial entre 0,5 a 1% na população, e as mulheres são as mais acometidas por essa patologia (MASHAYEKHI, KOUSHKI, ROSTAMI-NEJAD, 2015).

Para se estabelecer o diagnóstico de DC é necessário, primeiramente, a realização de testes sorológicos para doença para os anticorpos anti-gliadina (anti-AGA), anti- endomísio (anti-EMA) e anti-transglutaminase (Anti-TG2) e 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. Uma nova alternativa para rastreio ou exclusão do diagnóstico de DC seria a genotipagem dos alelos associados ao HLA, principalmente em grupos de risco para DC, tais como parentes de primeiro grau, portadores de desordens auto-imunes, síndromes genéticas e pacientes assintomáticos (HUSBY et al., 2012).

Frente a essa nova possibilidade de rastreamento da DC, muitos estudos vêm buscando avaliar a prevalência dos alelos de risco HLA-DQ em celíacos em diversos locais do mundo com a finalidade de mostrar a sua aplicabilidade na prática clínica daquela população (CASTRO-ANTUNES M. M. et al., 2011). Porém, ainda não se tem muitos estudos que buscam relacionar o papel destes alelos com a forma de apresentação da doença, tais como gravidade da doença, e possíveis interações com fatores de diagnóstico para a DC. Desta forma o objetivo do presente trabalho foi avaliar a prevalência dos haplótipos de risco relacionados ao complexo HLA-DQ2 através da genotipagem dos alelos DQA1*05

e DQB1*02 e associar com o grau de lesão intestinal estabelecido por Marsh-Oberhuber e resultados de testes sorológicos específicos para doença celíaca em celíacos da região sul do Brasil.

2. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo descritivo, do tipo transversal objetivando o rastreamento de alelos HLA-DQ2 (alelos DQA1*05 e DQB1*02) em celíacos da região sul do Brasil. Os participantes foram selecionados por critério de conveniência, constituindo uma amostra de 140 celíacos, sendo incluídos indivíduos de qualquer idade, desde que apresentassem diagnóstico confirmado de DC através de biópsia intestinal. O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina (parecer: 1.840.918) e todos os participantes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

A fim de avaliar o perfil dos celíacos do estudo foi adaptado um questionário já validado e testado, constituído de questões abertas e fechadas para caracterização da amostra e investigação de método de diagnóstico (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).

O método de amplificação do gDNA foi adaptado de SACCHETTI, (1997), onde os alelos foram amplificados pelo método de reação em cadeia de polimerase (PCR) utilizando os primers hDQA1*05f- 5'-AGC AGT TCT ACG TGG ACC TGG GG-3' e hDQA1*05r- 5'- GGT AGAG TTG GAG CGT TTA ATC AGA-3', os quais geram um produto de 144pb identificando o alelo DQA1*05 codificante para a subunidade alfa da proteína DQ2 (DQ2-A), e hDQB1*02f- 5'- CGC GTG CGT CTT GTG AGC AGA AG-3' e hDQB1*02r- 5'-GGC GGC AGG CAG CCC CAG CA-3', os quais geram um produto de 110pb identificando o alelo DQB1*02 codificante para a subunidade beta da proteína DQ2 (DQ2-B). Os produtos das PCRs foram analisados em gel de agarose a 2% por eletroforese e visualizados em transluminador com luz ultravioleta e fotodocumentados.

Os dados foram analisados utilizando o software STATA® versão 12.0. Foram realizadas médias e desvios padrões das variáveis contínuas. Para avaliar associação entre perfil genético e demais variáveis foi utilizado o teste do qui-quadrado de Pearson. O nível de significância considerado no presente estudo foi de $p<0.05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo contou com uma amostra de 140 celíacos que residiam nos estados de Santa Catarina ($n=72$) e Rio Grande do Sul ($n=68$). A média de idade foi de 35 anos (± 16) e 87% da população estudada era do sexo feminino.

A prevalência de pelo menos um dos alelos estudados no presente estudo foi de 90% nos celíacos, sendo que 75% desses apresentaram as duas subunidades para a proteína DQ2, ou seja, todos os alelos analisados. Já para a subunidade DQ2-A apenas 4.6% dos celíacos foram positivos exclusivamente para essa subunidade do DQ2 e 10.7% foram positivos exclusivamente para a subunidade do DQ2-B (Tabela 1). Em um estudo brasileiro realizado por CASTRO-ANTUNES et al.(2011), em Recife/PE, com 73 celíacos, encontrou uma

prevalência de 75.3%. Desta forma pode-se observar que os celíacos da região sul apresentam maior prevalência dos alelos analisados(Tabela 1).

Em relação ao grau de lesão intestinal, pode-se observar que 79% dos celíacos estudados possuíam grau de lesão intestinal Marsh-3 (3a, 3b e 3c), sendo que 25% destes possuíam perfil genético DQ2-AB e lesão intestinal 3b e essa associação foi significativa ($p=0.004$, Tabela 1). O grau de lesão intestinal 3b se caracteriza por hiperplasia parcial de criptas e atrofia parcial das vilosidades intestinais e configura um estágio avançado da DC (HUSBY et al., 2012). Outros estudos realizados com celíacos buscaram encontrar associação entre perfil genético e gravidade de lesão intestinal, porém diferente do presente estudo nenhum deles encontraram resultados significativos (MURRAY et al.,2007; ROSTAMI- NEJAD et al., 2014).

Já levando em consideração os testes sorológicos para DC (anti-AGA, Anti-EMA e Anti-TG2) os celíacos no presente estudo, apresentaram 25% de sorologia negativa para anti-AGA, 21% para anti-EMA e 15% para anti-TG2. Já em relação à associação dos resultados dos testes sorológicos e perfil genético, foi possível observar que ocorreu associação significativa entre perfil genético e positividade para os testes sorológicos. De modo geral, observou-se que os pacientes que possuíam apenas uma subunidade do haplótipo DQ2 (DQ2-A ou DQ2-B) apresentaram menor positividade para os testes sorológicos. Por outro lado, quando o paciente possuía as duas subunidades (DQ2-AB) 83% deles foram positivos para Anti- AGA ($p=0.004$), 87.5% para anti-EMA ($p= 0.001$) e 90.9% para Anti-TG2 ($p=0.001$), ou seja, apresentaram maior positividade para os testes sorológicos (Tabela 1). Na literatura o único estudo encontrado que buscou investigar associação do perfil genético com a sorologia foi o realizado por Murray et al. (2007), com 84 pacientes celíacos, avaliou os alelos de risco HLA para DQ2 e para DQ8 e não encontrou associação entre anti- EMA e o alelo DQB1*02 (DQ2-A). Frente aos achados no presente estudo, referente à relação do perfil genético com testes sorológicos, e de outros estudos que estão bem descritos na literatura sugere-se uma associação dos resultados sorológicos com o grau de lesão intestinal (MILLS, A, J. R. e MURRAY B. J., 2016). Ou seja, quanto maior o grau de lesão intestinal maior serão os valores para anti-EMA e anti-TG2.

Tabela 1: Prevalência dos alelos DQA1*05 e DQB1*02 e associação com grau de lesão intestinal e sorologia em celíacos da região sul.

Perfil genético DQ2	Perfil Genético	Prevalência % (n)	Lesão intestinal- Classificação de Marsh-Oberhuber (n)						Teste sorológico positivos % (n)		
			M.1	M.2	M.3a	M.3b	M. 3c	M. 4	Anti-AGA	Anti-EMA	Anti-TG2
Negativos	Negativos	10.0 (14)	0	0	0	0	0	2	83.3 (5)	50.0 (2)	40.0 (2)
DQA1* 05	DQ2 A	4.3 (6)	0	0	0	2	0	0	0.00 (0)	0.0 (0)	33.3 (1)
DQB1*02	DQ2-B	10.7 (15)	1	0	2	3	0	0	50.0 (5)	50.0 (4)	85.7 (6)
DQA1* 05 e DQB1*02	DQ2-AB	75.0 (105)	3	2	7	13	7	1	83.0 (39)	87.5 (49)	90.9 (60)
Total Positivos		90.0 (126)							75.4 (49)	78.6 (55)	85.2 (69)
Valor p						0.004			0.01	0.001	0.001

DDQ2*05=DQ2-A; DQ2*02=DQ2-B; DQ2*05 e DQ2*02= DQ2-AB; Lesão intestinal-classificação intestinal de Marsh- Oberhuber (n=43); Anti-AGA= Teste sorológico para o anticorpo gliadina (n=65); Anti-EMA= Teste sorológico para o anticorpo endomísio (n=70); Anti-TG2= Teste sorológico para o anticorpo transglutaminase (n=81)

4. CONCLUSÕES

Podemos concluir que celíacos da região sul do Brasil apresentaram uma alta prevalência dos alelos de risco para DC relacionado ao complexo HLA-DQ2 (DQA1*05 e DQB1*02), sendo que apenas 10% dos celíacos estudados não apresentaram nenhum destes alelos. Frente a este dado evidenciamos a alta efetividade da realização do teste genético para o HLA-DQ2 no rastreamento de possíveis candidatos à DC em celíacos da região sul do Brasil. Além disso, foi possível observar que o perfil genético DQ2-AB está associado com gravidade do dano intestinal, frente às outras possibilidades genéticas, evidenciando o papel genético não só na suscetibilidade da DC, mas também na severidade da doença. Somando a isso, ainda foi possível que o perfil DQ2-AB está associado à maior ocorrência de resultados sorológicos positivos para DC.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- CASTRO-ANTUNES, M. M.; CROVELLA, S.; BRANDÃO, L. A. C.; GUIMARAÃES, R. L.; MOTTA M. E. F. A.; SILVA, G. A. P.; Frequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 in celiac patients and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil. **CLINICS**. v.66(2), p.227-231. 2011. DOI:10.1590/S1807-5932201100020000.
- 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.
- MILLS, A. J. R. e MURRAYB J. A. Contemporary celiac disease diagnosis: is a biopsy avoidable? **Current Opinion in Gastroenterology**. V. 32(2). 2016.
- 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.2007.08.2013.
- ROSTAMI-NEJAD, M.; ROMANOS, J.; ROSTAMI, K.; GANJI, A.; EHSANI-ARDAKANI, M. J.; BAKHSHIPOUR, A. R. et al. Allele and haplotype frequencies for HLA-DQ in Iranian celiac disease patients. **World Journal of Gastroenterology**. v. 20 (20), p.6302-6308. 2014. Doi: 10.3748/wjg.v20.i20.6302.
- ROUJON, P.; GUIDICELLI, G.; MOREAU, J.F.; TAUPIN, J.L. Immunogénétique de la maladiecoeliaque. **PathologieBiologie**. v.61. p. 5–11. 2013.
- SACCHETTI, L.; TINTO, N.; CALCAGNO, G.; IMPROTA, P.; SALVATORE. Multiplex PCR typing of the three most frequent HLA alleles in celiac disease. **Clinica Chimica Acta**. p.205-207. 2001.