

FERNANDA COUTINHO DE ALMEIDA

**Prevalência dos genes HLA-DQ2 e DQ8, predisponentes para doença
celíaca, em recém-nascidos do Distrito Federal**

Brasília

2014

Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas

**Prevalência dos genes HLA-DQ2 e DQ8, predisponentes para doença
celíaca, em recém-nascidos do Distrito Federal**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas pelo
Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da
Universidade de Brasília

Orientadora: Prof. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

Co-Orientadora: Profa. Dra. Marilúcia Rocha de Almeida Picanço

Brasília

2014

FERNANDA COUTINHO DE ALMEIDA

**Prevalência dos genes HLA-DQ2 e DQ8, predisponentes para doença
celíaca, em recém-nascidos do Distrito Federal**

Aprovada em 03 de fevereiro de 2014

Banca Examinadora:

Presidente: Profa. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

Membro: Profa. Dra. Angélica Amorim Amato

Membro: Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello

Suplente: Profa. Dra. Inês Cristina dos Santos Modelli

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Pesquisa em Doença Celíaca (CPDC) e no Centro de Pesquisas em Doenças Imunogenéticas e Crônicas degenerativas (CPDICC), do Departamento de Pediatria, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília (UnB), financiado Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF).

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me amparar nos momentos de dificuldade, por me iluminar nos momentos de incerteza e por ter me dado forças para nunca desistir.

Aos meus pais Terezinha Coutinho de Almeida e José Cícero Rocha de Almeida por serem meus exemplos de vida, por acreditarem em mim e por todo amor que sempre me deram.

Ao meu querido professor Dr. Riccardo Pratesi por sempre me apoiar nos momentos difíceis, pelo seu incentivo, pelos seus ensinamentos, pela sua paciência e compreensão e por ser um grande exemplo de pessoa e profissional.

A minha orientadora professora Dra. Yanna Karla de Medeiros Nobrega por sua dedicação, pelas sugestões que contribuíram positivamente para realização deste trabalho e pelos constantes incentivos.

A professora Dra. Marilúcia Picanço, minha tia querida e co-orientadora, pelo apoio, dedicação, exemplo e compreensão, por ter contribuído grandemente para que eu iniciasse a vida acadêmica.

A querida professora Dra. Lenora Gandolfi por seu imenso carinho, por sempre acreditar no meu potencial e por sempre me dizer palavras de alívio nos momentos em que eu precisava de força.

Aos meus irmão amados, Juliana, Rodrigo, Gabriela e Bernardo, por todo amor, carinho e compreensão, por sempre me apoiarem e sempre estarem ao meu lado nos momentos bons e ruins.

Agradeço especialmente a meu irmão Rodrigo Coutinho de Almeida, por ser um grande exemplo de irmão, amigo e pesquisador, por sempre acreditar em mim, pelo carinho e por todo incentivo que sempre me deu.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Patrícia Fritsch, Eduardo Lourenço, Rosa Uenishi e Nicole Selleski, por todo carinho e apoio, por sempre estarem presentes quando precisei. Agradeço especialmente ao Lucas Malta que me ajudou na realização dos experimentos, por sempre me apoiar e pelas sugestões fundamentais para a realização desse trabalho.

À Dra. Karina Nascimento pelo apoio nas coletas das amostras e por sempre acreditar no nosso trabalho.

Aos meus tios Ângela Maria Lima e Emanuel Lima por todo carinho, pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim.

A minha tia Maria Aparecida Coutinho pelo apoio, carinho e pelas palavras positivas que sempre deram força para continuar.

Ao meu tio Ubirajara Picanço pelo apoio, atenção e carinho.

A todos meus amigos, incluindo meus queridos primos e primas, que sempre me incentivaram, pela compreensão, paciência e carinho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) pelo apoio financeiro.

A todos os profissionais da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas pela dedicação e competência.

“Não há saber mais ou saber menos: Há saberes diferentes.”
Paulo Freire

Resumo

A doença celíaca (DC) é uma enteropatia imuno-mediada caracterizada por inflamação crônica do intestino delgado, que resulta em atrofia das vilosidades intestinais, hiperplasia de criptas e infiltração linfocitária. A doença ocorre em indivíduos geneticamente predispostos pela presença dos genes do sistema HLA DQ2 e/ou DQ8. Esses genes codificam as moléculas MHC de classe II presentes nas células apresentadoras de antígenos, que fazem apresentação antigênica aos linfócitos T, iniciando a resposta imunitária inflamatória presente na DC. Os genes HLA DQ2 e DQ8 são responsáveis por 40% da suscetibilidade genética da doença celíaca (DC), sua prevalência tem mostrado variações em diferentes regiões do mundo, e até o momento não foi determinada na população brasileira. Com base nestes dados, o presente estudo pretende estimar a frequência dos alelos HLA predisponentes para DC em um grupo populacional de recém-nascidos brasileiros. Os genes HLA-DQ2 e DQ8 foram tipados em 329 recém-nascidos pela técnica qPCR e os resultados foram confirmados por um kit comercial que utiliza a metodologia PCR-SSP. Os resultados revelaram uma prevalência de 33,44% para os heterodímeros DQ2 e DQ8, semelhante aos obtidos em estudos realizados nos países europeus. Em uma segunda análise dos dados, quando a presença de pelo menos um dos alelos predisponentes para DC foi considerado, observamos uma porcentagem aumentada dos alelos de alto risco para desenvolvimento de DC nos recém-nascidos brasileiros. Diante destes achados é possível concluir que os dados encontrados na população brasileira são semelhantes aos encontrados nos países europeus, embora as características populacionais sejam distintas, e que a metodologia empregada, e que foi validada e confirmada é confiável e poderá ser reproduzida facilmente em novos estudos.

Abstract

Celiac disease (DC) is an immune-mediated enteropathy characterized by chronic inflammation of the small bowel which results in intestinal villi atrophy, crypt hyperplasia and lymphocyte infiltration. This disease only affects genetic susceptible individuals who carry the genes that integrate the HLA DQ2 and/or DQ8 system. These genes code for MHC class II molecules present in antigen-presenting cells, which will interact with T-lymphocytes leading to the characteristic inflammatory response of DC. Forty percent of the genetic susceptibility to DC is associated with class II HLA-DQ2 and -DQ8 genotypes. The prevalence of these genes has shown significant variations among different world regions and has not been previously determined among the Brazilian population. The aim of this study was to estimate the prevalence of celiac disease HLA-predisposing alleles in Brazilian newborns. DQ2 and DQ8 genes were typed in 329 newborns using qPCR and the results were confirmed by a PCR-SSP commercial kit. The prevalence of DQ2 and/or DQ8 heterodimers was 33.44%, which is similar to the results obtained in European screening studies. However, if only considering the presence of at least one of the CD predisposing alleles, an increased percentage of high-risk alleles could be observed among the Brazilian newborns. Analyzing our results, we could conclude that, the prevalence of DQ2 and/or DQ8 heterodimers in our population is similar to that observed in European population screening studies although the characteristics of both populations highly differ and that the applied technic proved to be reliable and can be easily reproduced in further studies.

Lista de figuras

Figura 1: Prevalência de DC e consumo de trigo em diferentes regiões do mundo.....	19
Figura 2: Iceberg celíaco, representando as diferentes formas da DC.....	22
Figura 3: Classificação histológica de Corazza-Villanucci.....	25
Figura 4: Genes HLA associados a DC e os respectivos heterodímeros.....	27
Figura 5: Esquema representativo da patogênese da DC.....	31
Figura 6: Representação gráfica das curvas de <i>melting</i> do alelo DQA1*05 e do controle da reação (HGH).....	37
Figura 7: Presença das bandas equivalentes ao controle interno e aos alelos alvos.....	39
Figura 8: Exemplo de um resultado negativo (A) e de um resultado positivo (B).....	39
Figura 9: Resultado de uma amostra que apresenta simultaneamente os heterodímeros DQ2 e DQ8.....	40
Figura 10: Exemplos de amostras que apresentam a combinação CIS e TRANS dos alelos DQA1*05 e DQB1*02.....	40
Figura 11: Haplótipo DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02.....	41

Lista de tabelas

Tabela 1: Gradiente de risco.....	28
Tabela 2: Sequência dos <i>primers</i> utilizados para q-PCR.....	35
Tabela 3: Resumo das condições das reações de qPCR.....	35
Tabela 4: Condições da qPCR para os alelos DQA1*05, DQB1*02 e DQA1*03.....	36
Tabela 5: Condições da qPCR para o alelo DQB1*03:02 descritos por Profaizer et al, 2011.....	36
Tabela 6: Representação dos alelos alvos e seus respectivos pesos moleculares.....	38
Tabela 7: Prevalência dos alelos HLA predisponentes para DC encontrados em 187 (56,84%) recém-nascidos, utilizando a técnica qPCR.....	43
Tabela 8: Prevalência dos alelos HLA predisponentes para DC em recém-nascidos usando o kit <i>DQ-CD Typing Plus - PCR-SSP</i>	44
Tabela 9: Distribuição da frequência das diferentes conformações do heterodímero DQ2.....	45
Tabela 10: Comparação entre a prevalência (%) dos alelos HLA predisponentes para DC em 329 recém-nascidos brasileiros e 292 indivíduos saudáveis italianos.....	46

Lista de abreviaturas e siglas

APC: *Antigen Presenting Cells*

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

DC: Doença celíaca

DGP: Gliadina desaminada

EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: *Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*

EMA: Anticorpo anti-endomísio

ESPGHAN: *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition*

GWAS: *Genome-wide Association Studies*

HGH: *Human Growth Hormone*

HLA: *Human Leukocyte Antigen*

HUB: Hospital Universitário de Brasília

IEL: *Intraepithelial lymphocytes*

IFN- γ : Interferon gama

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IL-15: Interleucina 15

MHC:	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
NK:	<i>Natural Killer</i>
pb:	Pares de base
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-SSP:	<i>Polymerase Chain Reaction - Sequence-Specific Primers</i>
q-PCR:	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RN:	Recém-nascido
SCU:	Sangue de Cordão Umbilical
SNP:	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TG2:	Transglutaminase 2
Th1:	<i>T helper 1</i>
Th2:	<i>T helper 2</i>
TJ:	<i>Tight Junctions</i>
tTG:	transglutaminase tecidual

Sumário

1. Introdução	15
1.1 Definição e histórico.....	15
1.2 Epidemiologia.....	17
1.3 Quadro Clínico.....	19
1.4 Diagnóstico.....	22
1.4.1 Testes sorológicos.....	23
1.4.2 Tipagem do HLA.....	24
1.4.3 Histopatologia.....	24
1.5 Aspectos genéticos da doença celíaca.....	26
1.5.1 Genes HLA-DQ2 e DQ8.....	26
1.5.2 Genes não-HLA.....	28
1.6 Patogênese.....	29
2. Objetivo	32
3. Materiais e métodos	33
3.1 População estudada.....	33
3.2 Delineamento do estudo e cálculo amostral.....	33
3.3 Coleta das amostras.....	33
3.4 Extração de DNA.....	34
3.5 Análise do DNA extraído.....	34
3.6 Tipagem dos genes HLA DQ2 e DQ8.....	34
3.7 Análise dos dados processados pela técnica de PCR em tempo real.....	37
3.8 Validação das metodologias aplicadas no estudo (PCR em tempo real <i>versus</i> PCR SSP comercial)	37
3.9 Análise estatística.....	41
4. Resultados	42
4.1 Análise descritiva da população estudada.....	42
4.2 Distribuição da frequência dos alelos HLA predisponentes para DC.....	42
4.3 Confirmação dos resultados utilizando kit <i>DQ-CD Typing Plus</i> - PCR-SSP.....	43
5. Discussão	46
6. Conclusão	49

8. Referências.....	50
9. Anexos.....	56
9.1 Anexo I.....	56
9.2. Anexo II.....	57
9.3 Anexo III.....	58
9.4 Anexo IV.....	59

1. Introdução

1.1 Definição e histórico

A doença celíaca (DC) é uma enteropatia imuno-mediada caracterizada por inflamação crônica do intestino delgado, que resulta em atrofia das vilosidades intestinais, hiperplasia de criptas e infiltração linfocitária. A doença ocorre em indivíduos geneticamente predispostos e a susceptibilidade à doença está principalmente ligada à presença dos genes do sistema HLA de classe II, HLA DQ2 e/ou DQ8. O fator desencadeante da doença é a ingestão de glúten, que é um complexo proteico encontrado no trigo e em cereais afins. O desenvolvimento da DC é consequente à combinação desses fatores genéticos e ambientais e seu tratamento consiste na dieta livre de glúten (ABADIE et al, 2011; BAO, GREEN & BHAGAT, 2012; HUSBY et al, 2012; PRESUTTI et al, 2007).

A primeira descrição da “afecção celíaca” (com base na palavra grega “koelia”, por abdome) foi feita no século II d.C. por Arateus da Capadócia, que a descreveu como sendo uma afecção intestinal associada à diarreia prolongada, atrofia do corpo e comprometimento do estado geral (PRAVELEY, 1988). Somente 17 séculos depois, em 1888 o médico inglês Samuel Gee chamou a atenção novamente para essa doença, reconhecendo a importância da dieta no manejo dos pacientes celíacos, apesar de não ter identificado o fator desencadeante (AURICCHIO, 1996).

A importância da dieta foi posteriormente confirmada por Willem Karel Dicke, pediatra holandês que associou o consumo de cereais ao desenvolvimento de DC. Dicke observou que durante a Segunda Guerra Mundial, em período de grande escassez de alimentos na Holanda, a quase total ausência de derivados de trigo e outros cereais paradoxalmente resultou em nítida melhora das crianças celíacas sob seus cuidados. Sua suspeita foi confirmada pela constatação de que a reintrodução dos farináceos na dieta das mesmas crianças celíacas resultou no reaparecimento paulatino das manifestações clínicas típicas da DC, tornando evidente a relação entre o consumo de cereais e o desencadeamento da doença. No entanto, ainda não eram conhecidos quais cereais continham o fator desencadeante da DC. Somente após a Segunda Guerra Mundial, em colaboração com van Kamer e Weyers, Dicke identificou que a gliadina, componente do glúten, era responsável pela síndrome malabsortiva característica dos pacientes celíacos. Depois desse achado foi definitivamente preconizada a dieta livre de glúten como único tratamento de DC (VAN BERGE-HENEGOUWEN & MULDER, 1993).

Até meados da década de 1950, o diagnóstico da DC era baseado unicamente no quadro clínico do paciente. Em 1954, o médico inglês J. W. Paulley observou que a mucosa intestinal de um paciente celíaco não era compatível com uma mucosa normal. Essa descoberta levou ao desenvolvimento de técnicas para análise da mucosa intestinal de pacientes suspeitos de serem portadores de DC, a principal delas, denominada Cápsula de Crosby, foi desenvolvida pelo engenheiro Heinz H. Kugler e pelo tenente coronel americano W. H. Crosby (PRAVELEY, 1988). Os padrões histológicos das lesões da mucosa intestinal foram caracterizados pela primeira vez na década de 1990 por Marsh. Ele identificou cinco estágios de lesões: pré-infiltrativa, infiltrativa, hiperplásica, destrutiva e hipoplásica (MARSH, 1990).

Em 1969, a Sociedade Europeia de Gastroenterologia Hepatologia e Nutrição Pediátrica (*ESPGHAN – European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*) estabeleceu os critérios de diagnóstico para DC (MEUWISSE et al, 1970). Esses critérios recomendavam a realização de três biópsias intestinais: uma realizada quando da suspeita de doença celíaca, devendo evidenciar anormalidades características da afecção; a segunda biópsia seria realizada depois do paciente ter permanecido em dieta livre de glúten por um período prolongado, o que deveria resultar em normalização da histologia da mucosa intestinal; e a terceira biópsia deveria ser feita depois de o paciente voltar à dieta com glúten, o que deveria resultar no reaparecimento das alterações da mucosa, firmando definitivamente o diagnóstico. Esses critérios sofreram posteriores modificações, em face ao refinamento dos métodos de diagnóstico, principalmente devido ao aparecimento de testes sorológicos sensíveis e específicos o que, em muito diminuiu a importância da biópsia intestinal como único método diagnóstico (WALKER-SMITH et al, 1990; HUSBY et al, 2012).

Os métodos de diagnóstico sorológico desenvolvidos a partir das décadas de 70 e 80 tornaram-se rapidamente de uso corrente no diagnóstico precoce de DC e que muito contribuíram na diminuição progressiva de biópsias desnecessárias, previamente selecionando quais os pacientes que seriam submetidos ao procedimento (BITTOLO et al, 1990). Esses métodos baseiam-se predominantemente em ensaios imunoenzimáticos, radioimunoensaios e em técnicas de imunofluorescência. Após a introdução dos testes de anti-gliadina e anti-reticulina, atualmente praticamente em desuso, o primeiro teste confiável, devido à sua alta sensibilidade e especificidade foi o método de detecção de anticorpos antiendomísio por imunofluorescência indireta, desenvolvido por Chorzelski et al em 1983. Mais recentemente, em 1997, Dieterich et al identificaram a enzima transglutaminase tecidual (tTG) como sendo o principal auto-antígeno desencadeador da DC. Atualmente a detecção de anticorpos anti-

transglutaminase pelo método ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) é um dos principais testes utilizados no auxílio do diagnóstico de DC, tendo em vista a sua grande sensibilidade e por tratar-se de teste de fácil execução e quantitativo (BAO, GREEN & BHAGAT, 2012).

Um passo importante para determinar a influência de fatores genéticos, principalmente de genes do sistema HLA (*human leukocyte antigen*) foi dado por Stokes et al (1972) que, em estudo pioneiro, evidenciaram a relação da DC com antígenos leucocitários humanos. Estudos posteriores demonstraram forte associação entre a DC e os genes HLA-DQ2 e DQ8, revelando que a presença desses marcadores é essencial para o desenvolvimento da DC (SOLLID et al, 1989; SPURKLAND et al, 1990). Sabe-se atualmente que a presença desses genes do sistema HLA é responsável somente por 40% do risco genético para a doença, sendo que os restantes 60% estão distribuídos entre vários genes somáticos, alguns já identificados, outros em estudo, cada um contribuindo com uma pequena parcela para o risco (TRYNCA et al, 2011). A descoberta da existência de suscetibilidade genética determinada por genes do sistema HLA aumentou a confiabilidade no diagnóstico de DC tendo em vista seu alto valor preditivo negativo, pois a ausência desses genes praticamente elimina a possibilidade de desenvolvimento da doença em algum período de sua vida. Além disso, grande parte dos indivíduos portadores desses genes nunca irão desenvolver a doença, (VIVES-Pi et al, 2013).

1.2 Epidemiologia

Inicialmente a DC era considerada uma doença rara que afetava predominantemente populações europeias ou de origem europeia (LIONETTI & CATASSI, 2011). Acreditava-se também que a doença acometia principalmente crianças, pois os estudos epidemiológicos iniciais eram direcionados para a população pediátrica. Como as pesquisas baseavam-se apenas nas manifestações clínicas típicas da doença, os indivíduos assintomáticos eram excluídos do *screening* (PRAVELEY, 1988).

O advento de testes sorológicos mais confiáveis e a realização de estudos de prevalência em diversos países foram fundamentais para comprovar que a DC é uma desordem comum, que pode ocorrer em indivíduos de qualquer faixa-etária e de diferentes etnias (LIONETTI & CATASSI, 2011; MAHADOV & GREEN, 2011). Não obstante, ainda há indivíduos assintomáticos ou com sintomatologia atípica que não são devidamente diagnosticados (CATASSI et al, 1995; GUANDALINI & GUPTA, 2002; LIONETTI & CATASSI, 2011).

Estudos epidemiológicos realizados na Europa mostram que a DC afeta aproximadamente 1% da população (CATASSI et al, 2007; MUSTALAHTI et al, 2010). Em países onde há elevada proporção de indivíduos com ascendência europeia, como Estados Unidos e Nova Zelândia, a prevalência de DC é semelhante a países da Europa, variando entre 1% a 1,2% (FASANO et al, 2003; COOK, 2000). Na Austrália a DC afeta cerca de 0,4% da população (HOVELL, 2001), embora o país também seja formado por caucasianos.

No norte da África a prevalência de DC pode variar entre 0,28% e 5,6% na população geral. A prevalência de DC mais elevada foi encontrada no Saara, onde a doença afeta cerca de 5,6% da população infantil (CATASSI et al, 1999; FASANO et al, 2004). Não há estudos sobre a prevalência de DC na África Subsaariana, entretanto, um recente estudo no Brasil sobre a prevalência de DC em comunidades quilombolas, descendentes de africanos subsaarianos, sugere que a doença não seja muito comum nessa região (ALMEIDA et al, 2012). Em países da Ásia oriental, como Indonésia, Coreia do Sul e Filipinas, a DC é considerada rara (GUJRAL et al, 2012). Contudo, no norte da Índia a DC é mais comum, visto que a prevalência da doença é de aproximadamente 0,32% (SOOD et al, 2006). A prevalência de DC em adultos doadores de sangue na Turquia é de 1:87 (TATAR et al, 2004).

Na América do Sul a DC era considerada rara, entretanto, estudos realizados no Brasil e na Argentina mostram que a doença é comum também nesses países (GUJRAL et al, 2012). Estudos de rastreamento no Brasil mostram que a prevalência de DC varia de 1:119 a 1:417 na população geral (CROVELLA et al, 2007; PRATESI et al, 2003) e de 1:214 a 1:681 em doadores de sangue (OLIVEIRA et al, 2007; GANDOLFI et al, 2007). Na Argentina, a prevalência encontrada foi de 1:167 em 2000 adultos (GOMEZ et al, 2001).

A prevalência de DC está relacionada ao consumo de cereais que contem glúten (principalmente o trigo) e à distribuição dos alelos HLA predisponentes para DC na população (ABADIE et al, 2011; GUJRAL et al, 2012). Populações em que a frequência dos alelos HLA predisponentes e a ingestão de trigo são elevadas estão sujeitas a apresentarem uma prevalência de DC aumentada (GUJRAL et al, 2012). Na Europa, por exemplo, onde a prevalência de DC é considerada alta, cerca de 30% da população apresenta os alelos HLA-DQ2 e/ou DQ8 (MEGIORNI et al, 2009) e o consumo de trigo é de aproximadamente 144,2 kg/ano *per capita* (FAOSTAT, 2009). Contudo, existem populações que fogem a essa regra como a Rússia, onde o consumo de trigo e a frequência dos alelos HLA predisponentes são semelhantes a outros países da Europa, porém a prevalência de DC é bem menor (0,2%) (ABADIE et al, 2011). A

figura 1 mostra a prevalência de DC (a) e os níveis de consumo de trigo (b) em diversas regiões do mundo.

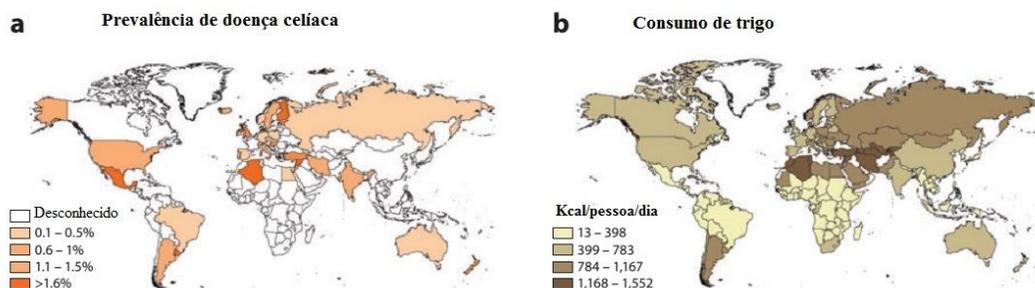


Figura 1 – Prevalência de DC e consumo de trigo em diferentes regiões do mundo. Adaptado de Abadie et al, 2011.

Existem outros fatores genéticos e ambientais que podem influenciar a taxa de prevalência de DC em uma determinada região (ABADIE et al, 2011). A variabilidade da microbiota, infecções intestinais e condições socioeconômicas são os principais fatores que podem influenciar o desenvolvimento de DC e, conseqüentemente, a distribuição da doença em uma determinada população (LIONETTI & CATASSI, 2011; TACK et al, 2010).

1.3 Quadro Clínico

O quadro clínico da DC é heterogêneo e pode ser dividido em manifestações gastrointestinais e manifestações extra-gastrointestinais. Diarreia, dor e distensão abdominal, vômito, flatulência, constipação e má absorção são as manifestações gastrointestinais mais recorrentes. As manifestações extra-gastrointestinais são mais diversas, podendo se caracterizar por anemia resistente ao tratamento, perda de peso progressiva, osteoporose, infertilidade, baixa estatura, irritabilidade, dermatite herpetiforme, e pela presença de quadros neurológicos, principalmente por epilepsia eventualmente associada a calcificações parieto-occipitais, ataxia cerebelar idiopática, neuropatia periférica e cefaleia de tipo enxaquecoso (BRIANI, SAMAROO & ALAEDINI, 2008; LIONETTI & CATASSI, 2011; HUSBY, 2012).

As manifestações clínicas da DC podem surgir na infância, adolescência ou na fase adulta tendo sido descritas mesmo em idade avançada (VILPPULA et al, 2009) e variam de acordo com a faixa etária dos afetados. Em crianças, as manifestações mais comuns são as gastrointestinais como diarreia crônica e dor e distensão abdominal, flatulência, anemia e baixa estatura. Já nos adultos a sintomatologia predominante é extra-gastrointestinal podendo também

ser caracterizada pela presença de anemia resistente ao tratamento, além de osteoporose e manifestações neurológicas (TJON, van BERGEN & KONING, 2010; HUSBY, 2012).

Os pacientes podem apresentar diversos níveis de inflamação intestinal podendo variar desde a simples presença de número aumentado de linfócitos intraepiteliais (IELs – *intraepithelial lymphocytes*) a grave infiltração subepitelial de células mononucleares, resultando em atrofia das vilosidades e acompanhada por hiperplasia de criptas (SCHUPPAN, JUNKER & BARISANI, 2009; TJON, van BERGEN & KONING, 2010).

A DC pode ser classificada em quatro formas clínicas: clássica ou típica, atípica ou não-clássica, silenciosa ou assintomática e potencial (FASANO e CATASSI, 2001; LIONETTI e CATASSI, 2011; HUSBY, 2012). A DC clássica ou típica é caracterizada por manifestações gastrointestinais, principalmente diarreia e malabsorção. Essa forma é mais frequente em crianças. As manifestações podem surgir após semanas, meses ou mesmo anos após a introdução de alimentos que contenham glúten. As lesões histológicas são de variável gravidade mas frequentemente são caracterizadas por hipotrofia ou atrofia das vilosidades e variável grau de hiperplasia das criptas (FASANO e CATASSI, 2001; LIONETTI e CATASSI, 2011; LUDVIGSSON et al., 2012).

A DC atípica ou não clássica pode surgir em qualquer idade, contudo, é mais frequente em adolescente e adultos (LIONETTI e CATASSI, 2011). Manifestações gastrointestinais são mínimos ou ausentes (BAO, GREEN e BHAGAT, 2012). Já as manifestações extra-intestinais são mais recorrentes, tais como: anemia ferropriva, dermatite herpetiforme, osteoporose, complicações neurológicas, abortos de repetição, infertilidade além de anormalidades na menarca e na menopausa (LIONETTI e CATASSI, 2011; ADMOU et al, 2012; LUDVIGSSON et al, 2012).

Na forma silenciosa ou assintomática ocorre caracterização por sorologia positiva e biopsia compatível com DC, entretanto sinais e manifestações comumente associados a DC são inexistentes. Os pacientes são comumente diagnosticados ocasionalmente em programas de rastreamento ou por estarem em grupos de risco para DC (portadores de doenças autoimunes ou parentes de celíacos). As principais características encontradas são: distúrbios de comportamento (irritabilidade, tendências a depressão e prejuízo no desempenho escolar), sensação de cansaço, aptidão física comprometida, fadiga crônica e redução da densidade mineral óssea. Muitos desses pacientes, apesar de não terem apresentado sintomatologia significativa antes do diagnóstico relatam melhor disposição tanto física como emocional após

o início de dieta isenta de glúten. Essa forma também pode ser reclassificada como subclínica. (FASANO e CATASSI, 2001 e 2005; LIONETTI e CATASSI, 2011; LUDVIGSSON et al, 2012; HUSBY, 2012).

E finalmente, a Forma potencial, que é caracterizada por sorologia positiva para DC, tipagem do HLA compatível com DC, mucosa intestinal normal ou com anormalidades sutis (aumento de linfócitos intraepiteliais) e ausência de enteropatia significativa. O paciente pode ou não apresentar manifestações, assim como pode ou não desenvolver lesões na mucosa futuramente. (LIONETTI e CATASSI, 2011; LUDVIGSSON et al, 2012; HUSBY, 2012; KANEEPKENS e von BLOMBERG, 2012; SAPONE et al, 2012).

Alguns pesquisadores e profissionais da saúde, inclusive os pertencentes à ESPGHAN, acrescentam mais uma forma clínica para a DC, a forma latente. Esta é caracterizada pela presença ou ausência de anticorpos, mucosa intestinal normal, e tipagem de HLA compatível com DC, sendo que o paciente, para ser definido como sendo portador desta forma precisa, em algum período de sua vida prévia, ter sido diagnosticado como portador de enteropatia consequente ao consumo de glúten (HUSBY, 2012; KANEEPKENS e von BLOMBERG, 2012; SAPONE et al, 2012).

Em consequência da grande variabilidade nas manifestações clínicas da DC é comum representar a DC utilizando a imagem de um iceberg (Figura 2), em que a ponta do iceberg acima da superfície representa os casos típicos, mais aparentes e mais facilmente diagnosticados sendo a parte submersa e invisível constituída pelas formas clínicas menos aparentes e de mais difícil diagnóstico (ABADIE et al, 2011).

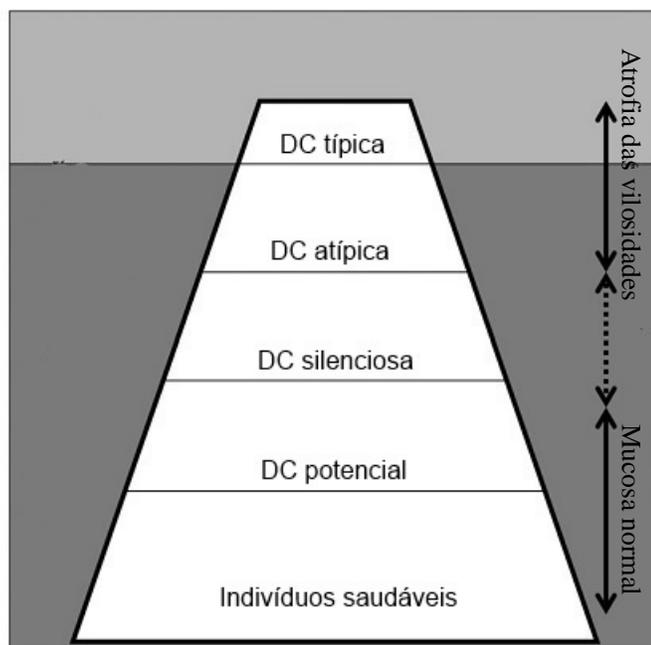


Figura 2 – Iceberg celíaco, representando as diferentes formas da DC
Adaptado de Leeds, Hopper e Sanders, 2008.

1.4 Diagnóstico

As manifestações clínicas da DC são muito heterogêneas e frequentemente sutis o que pode confundir o clínico e resultar em demora para se alcançar seu diagnóstico definitivo. Segundo a ESPGHAN o diagnóstico da DC depende das manifestações clínicas, da presença de níveis significativos de anticorpos específicos (sorologia positiva), da presença de genes HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8 predisponentes e de características anormalidades histopatológicas da mucosa intestinal evidenciadas à biópsia (HUSBY et al, 2012).

A ESPGHAN orienta que o diagnóstico para DC deve ser considerado em crianças e adolescentes que apresentam manifestações clínicas gastrointestinais (diarreia, dor abdominal, náuseas ou vômitos) e extra-intestinais (anemia, dermatite herpetiforme, fadiga crônica). Além disso, é também recomendado que o diagnóstico de DC seja avaliado em crianças e adolescentes assintomáticos, mas que pertençam a um grupo de risco para desenvolvimento de DC. Os grupos de riscos para desenvolvimento de DC são: diabetes tipo 1, Síndrome de Down, Síndrome de Turner, Síndrome de Willians, doença autoimune da tireoide, doença autoimune do fígado, deficiência seletiva de IgA e familiares de primeiro grau de celíacos (HUSBY et al, 2012). A Associação Americana de Gastroenterologia recomenda que o diagnóstico de DC seja considerado em qualquer indivíduo com quadro clínico indicativo de DC ou pertencente a grupos de risco (KAGNOFF, 2006).

1.4.1 Testes sorológicos

A produção de anticorpos anti-endomísio (EMA), anti-gliadina, anti-tTG e contra complexos gliadina-tTG faz parte do processo de patogênese da DC. Os testes sorológicos tem a finalidade de detectar os níveis desses anticorpos no soro de indivíduos com suspeita de DC. Os testes usados para diagnóstico de DC incluem detecção de anticorpos IgA e IgG anti-gliadina, IgA-EMA e IgA anti-tTG (ROSTOM, MURRAY & KAGNOFF, 2006; SCHUPPAN & ZIMMER, 2013).

Os anticorpos anti-gliadina não são atualmente considerados suficientemente sensíveis ou específicos para serem usados no diagnóstico da DC (BAO, GREEN & BHAGAT, 2012), tendo sido substituídos pelos anticorpos anti-gliadina deamidada (anti-DGP) tanto da classe IgG como IgA por estes possuírem maior sensibilidade e especificidade. O teste IgG anti-DGP é utilizado nos casos de deficiência de IgA, em que são detectados anticorpos IgG anti-DGP (SCHUPPAN & ZIMMER, 2013). Tanto o teste IgA como o IgG anti-DGP são comumente usados como testes adicionais em pacientes que são negativos para outros testes sorológicos, mas que apresentam manifestações clínicas características de DC, principalmente aqueles com idade inferior a dois anos (HUSBY et al, 2012; SCHUPPAN & ZIMMER, 2013).

Anticorpos anti-tTG são comumente detectados pelo método de ELISA usualmente utilizando tTG recombinante humana como antígeno. (HUSBY et al, 2012). O teste sorológico IgA anti-tTG é considerado o método mais sensível para o diagnóstico de DC, com sensibilidade próxima a 97% (BAO, GREEN & BHAGAT, 2012). Além disso, esse teste possui elevada especificidade, próxima a 99% (ROSTOM et al, 2006). Embora o teste IgA anti-tTG possua sensibilidade e especificidade elevadas, é possível encontrar resultados falsos positivos em pacientes com doença hepática, insuficiência cardíaca congestiva, artrite e doença inflamatória intestinal (ROSTOM et al, 2006). O teste IgA anti-tTG é geralmente utilizado como primeiro teste na abordagem inicial do diagnóstico de DC desde que é um teste quantitativo e que pode ser automatizado e não depende da interpretação do observador como é o caso do teste de antiendomísio (HUSBY et al, 2012; SCHUPPAN & ZIMMER, 2013).

Os anticorpos IgA-EMA são detectados por imunofluorescência indireta, que requer avaliação microscópica. Esse método é, portanto, de avaliação subjetiva, estando sujeito a variações dependentes da interpretação de diferentes observadores. Contudo, quando bem interpretado por observador experiente a especificidade do teste sorológico IgA-EMA é próxima de 100% (ROSTOM et al, 2006), sendo considerado um teste de referência para detecção de anticorpos específicos para DC (HUSBY et al, 2012).

1.4.2 Tipagem do HLA

A DC é um exemplo de desordem multifatorial na qual o teste genético é de grande relevância clínica, pois a doença raramente se desenvolve na ausência dos genes HLA específicos (HLA-DQ2 e HLA-DQ8) (ABADIE et al, 2011; CHANG & GREEN, 2009). Os genes HLA-DQ2 e HLA-DQ8 são necessários para o desenvolvimento da DC mas não são suficientes (KUPFER & JABRI, 2012), ou seja, se um indivíduo carrega esses marcadores genéticos, não necessariamente significa que irá desenvolver DC, mas sim que possui um risco de desenvolver a doença. Além disso, cerca de 30% da população geral apresenta esses genes, porém, apenas 3 a 4% desse grupo irá desenvolver a DC (WOLTERS & WIJMENGA, 2008). Portanto, a ausência dos genes HLA-DQ2 e HLA-DQ8 tem um alto valor preditivo negativo para o diagnóstico de DC, isto é, a chance de um indivíduo que não apresenta esses genes desenvolver DC é extremamente baixa, enquanto que a presença desses marcadores tem um valor preditivo positivo irrelevante (VIVES-PI et al, 2013).

A tipagem do HLA pode ser usada para descartar a hipótese diagnóstica de DC em pacientes com diagnóstico duvidoso, excluindo a possibilidade de doença naqueles que não possuem esses genes. Recentemente, Chang e Green (2009) sugeriram que a tipagem do HLA fosse realizada antes dos testes sorológicos para reduzir a quantidade de resultados falsos positivos e, assim, diminuir o número de biopsias requeridas. Contudo, a ESPGHAN recomenda que o teste HLA seja realizado previamente aos testes sorológicos somente nos casos de pacientes assintomáticos pertencentes a grupos de risco (parentes de 1º grau de celíacos, portadores de diabetes tipo 1 e síndrome de Down, por exemplo) (HUSBY et al, 2012).

1.4.3 Histopatologia

A avaliação histopatológica de biopsias duodenais em DC revela anormalidades na porção proximal do intestino delgado, com diferentes graus de alteração podendo chegar à atrofia completa do epitélio jejunal (SCHUPPAN & ZIMMER, 2013). Além das características histopatológicas do intestino delgado possuírem níveis variáveis de severidade, sua localização pode ser variável, alternando áreas de epitélio normal com áreas afetadas em maior ou menor grau (HUSBY et al, 2012). As principais alterações encontradas na mucosa intestinal na DC incluem atrofia das vilosidades, hiperplasia das criptas e infiltração dos linfócitos intra-epiteliais (SCHUPPAN, JUNKER & BARISANI, 2009).

A biopsia duodenal já foi considerada o padrão-ouro para confirmar o diagnóstico de DC. A biopsia era recomendada quando o paciente apresentava manifestações clínicas características da DC e sorologia positiva (anticorpos anti-tTG e/ou EMA) (HARRIS et al, 2012; FASANO & CATASSI, 2012). No entanto, as últimas diretrizes da ESPGHAN recomendam que a biopsia seja dispensada em pacientes com resultado de IgA anti-tTG 10 vezes superior ao valor de corte. Além disso, esses pacientes também devem apresentar os genes HLA predisponentes (HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8) e sorologia positiva para o EMA. A endoscopia é indicada nos casos em que os níveis de IgA anti-tTG sejam menores que 10 vezes o valor de corte ou quando o teste HLA não esteja disponível (HUSBY et al, 2012).

Durante a endoscopia duodenal é recomendado realizar pelo menos uma biopsia no bulbo duodenal e pelo menos quatro biopsias na segunda ou terceira porção do duodeno (HUSBY et al, 2012). O diagnóstico é confirmado pela avaliação histológica de acordo com a classificação de Corazza-Villanucci. Essa classificação histológica apresenta as lesões da mucosa intestinal em duas categorias diferentes: grau A (lesões não-atróficas) e grau B (lesões atróficas) (BAO, GREEN & BHAGAT, 2012). As lesões grau A são caracterizadas por lesões histológicas leves, sem atrofia das vilosidades mas com infiltração de linfócitos (Figura 3 A). As lesões grau B são subdivididas em grau B1 (aumento dos linfócitos intraepiteliais, e hiperplasia de cripta, representadas na figura 3 B) e grau B2 (lesões destrutivas, atrofia total das vilosidades e hiperplasia de cripta, representadas na figura 3 C) (BAO, GREEN & BHAGAT, 2012)

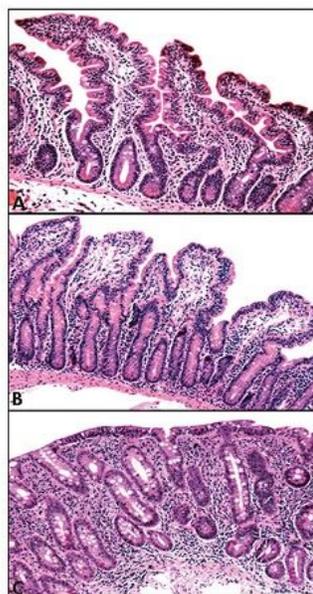


Figura 3 - Classificação histológica de Corazza-Villanucci. A = Grau A; B = Grau B1; C = Grau B2

1.5 Aspectos genéticos da doença celíaca

1.5.1 Genes HLA-DQ2 e DQ8

Antígenos Leucocitários Humanos (*Human Leukocyte Antigen* - HLA) é o nome dado ao conjunto de genes que codificam as proteínas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (*Major Histocompatibility Complex* - MHC) em humanos (WALPORT et al, 2013). Os genes do sistema HLA estão presentes no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3) e são divididos em três classes: I, II e III (KUPFER & JABRI, 2012). Os genes HLA de classe I e II codificam proteínas MHC de classe I e II que apresentam antígenos peptídicos para reconhecimento pelos linfócitos T (WALPORT et al, 2013). Já os genes HLA de classe III codificam proteínas do sistema complemento (KUPFER & JABRI, 2012).

Os genes HLA que originam as moléculas MHC de classe II que estão associados a DC, codificam heterodímeros formados por duas cadeias α e β que formam a molécula de MHC presente na membrana de células apresentadoras de antígenos ou (*Antigen Presenting Cells* - APCs) (MACKAY & ROSEN, 2000). Esses genes HLA compreendem três conjuntos de genes polimórficos denominados HLA-DR (HLA-DRA e HLA-DRB1), HLA-DP (HLA-DPA1 e HLA-DPB1) e HLA-DQ (HLA-DQA1 e HLA-DQB1) (WALPORT et al, 2013; MEGIORNI & PIZZUTI, 2012). A designação do *loci* dos genes HLA de classe II no cromossomo 6 consiste de três letras: a primeira (D) indica a classe (II), a segunda (Q, P ou R) a família, e a terceira (A ou B) indica a cadeia do heterodímero (α ou β , respectivamente) (MACKAY & ROSEN, 2000).

A suscetibilidade genética para DC está associada aos heterodímeros HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (Figura 4) (ABADIE et al, 2011). O heterodímero DQ2 é codificado pelos alelos DQA1*05 (cadeia α) e DQB1*02 (cadeia β); já o DQ8 é codificado pelos alelos DQA1*03:01 (cadeia α) e DQB1*03:02 (cadeia β) (KUPFER & JABRI, 2012; MEDRANO et al, 2012).

Os alelos que codificam o heterodímero DQ2 (DQA1*05 e DQB1*02) podem ser herdados no mesmo cromossomo ou em cromossomos diferentes. Quando são herdados no mesmo cromossomo apresentam a configuração *cis* e são transmitidos juntos no haplótipo DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02 (Figura 4). Contudo, quando são transmitidos em cromossomos diferentes possuem a configuração *trans* e são herdados separadamente nos haplótipos DRB1*11/12-DQA1*05-DQB1*03:01 e DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02 (Figura x). O heterodímero DQ8 geralmente é herdado em *cis* no haplótipo DRB1*04-DQA1*03-DQB1*03:02 (Figura 4) (KUPFER & JABRI, 2012; MEDRANO et al, 2012).

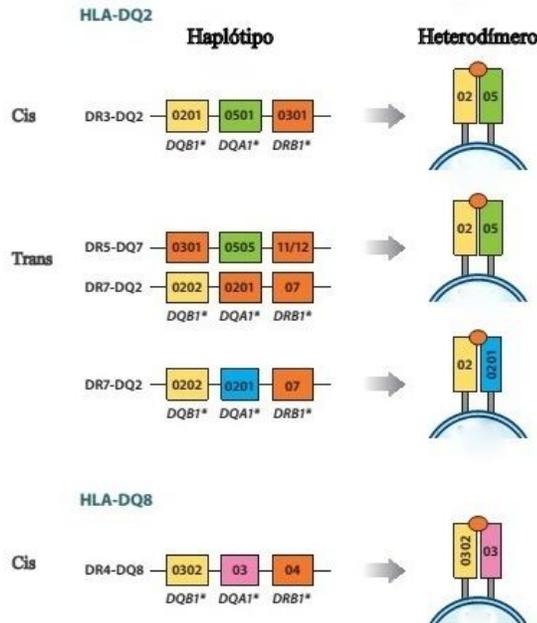
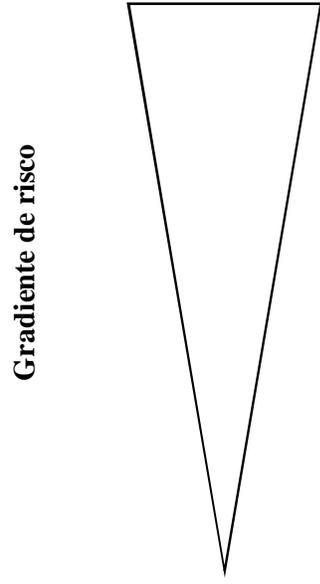


Figura 4- Genes HLA associados a DC e os respectivos heterodímeros. Adaptado de Abadie et al, 2011.

Cada alelo HLA predisponente para DC confere um risco diferente para o desenvolvimento da doença, esse risco depende da combinação desses alelos (MEDRANO et al, 2012; KUPFER & JABRI, 2012). Megiorni et al (2009) realizaram um estudo com população italiana em que foi analisado um gradiente de risco para DC associado aos genes HLA-DQ2 e DQ8. Esse estudo mostra que a presença de ambos os genes HLA-DQ2 (DQA1*05 e DQB1*02) e HLA-DQ8 (DQA1*03 e DQB1*03:02) conferem o maior risco para desenvolvimento de DC (1:7), ao passo que a presença apenas do alelo DQA1*05 confere o menor risco (1:1842). Esse estudo também mostra que o estado de homozigose do alelo DQB1*02 contribui para o risco de DC. A tabela 1 mostra em detalhes o gradiente de risco do estudo de Megiorni et al (2009).

Tabela 1 - Gradiente de risco.



Genótipo	Risco
$\alpha\beta$ DQ2/ $\alpha\beta$ DQ8	1:7
$\alpha\beta$ DQ2/ β homozigose	1:10
$\alpha\beta$ D8/ β DQ2	1:24
β DQ2 homozigose	1:26
$\alpha\beta$ DQ2/ β heterozigose	1:35
$\alpha\beta$ DQ8	1:89
β DQ2 heterozigose	1:210
α DQ2	1:1842
Outros	1:2518

Adaptado de Megiorni et al, 2009.

$\alpha\beta$ DQ2 = DQA1*05 e DQB1*02; $\alpha\beta$ DQ8 = DQA1*03 e DQB1*03:02; β homozigose = DQB1*02 em homozigose; β heterozigose = DQB1*02 em heterozigose; β DQ2 = DQB1*02; α DQ2 = DQA1*05

Os heterodímeros HLA DQ2 e DQ8 são os fatores genéticos envolvidos na patogênese da DC mais bem caracterizados estando presentes nas células apresentadoras de antígeno, macrófagos e células dendríticas (ABADIE et al, 2011; KUPFER & JABRI, 2012). Aproximadamente 95% dos pacientes celíacos carregam o gene HLA-DQ2, e entre 2 e 4% carregam o HLA-DQ8 (KARREL et al, 2003). A frequência dos genótipos HLA de risco para DC na população geral é de aproximadamente 25-30%, entretanto, apenas 1-3% desses indivíduos desenvolve a doença (TRYNCA, WIJMENGA & van HEEL, 2010; WOLTERS & WIJMENGA, 2008).

1.5.2 Genes não-HLA

Embora os genes HLA-DQ2 e DQ8 sejam necessários, sozinhos não são suficientes para o desenvolvimento da DC, o que implica necessariamente na presença de outros fatores genéticos envolvidos na doença (KUPFER & JABRI, 2012). Estudos genéticos recentes, conhecidos como estudos de associação genômica ampla (*Genome-wide Association Studies - GWAS*), identificaram diversos genes não-HLA que também predisõem a DC (KUPFER & JABRI, 2012; TRYNCA, WIJMENGA & van HEEL, 2010). Os genes HLA predisponentes para DC são responsáveis por aproximadamente 40% do risco genético para desenvolvimento

da doença, os outros 60% são compartilhados entre os genes não-HLA, os quais aparentemente contribuem somente com um pequeno efeito no risco (TRYNCA et al, 2011).

A descoberta de genes fora do sistema HLA associados a DC obteve maior êxito com o advento dos GWAS (TRYNCA, WIJMENGA & van HEEL, 2010). Esse tipo de estudo utiliza métodos de genotipagem por microarranjos para identificar diversos *loci* em doenças complexas, como DC e outras doenças autoimunes (ABADIE et al, 2011). GWAS pesquisa determinados nucleotídeos de polimorfismo único (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNPs) no genoma humano que possam ter associação com uma doença específica, comparando as variações encontradas em portadores da doença e em controles sadios (MANOLIO, 2010).

Os genes não-HLA, associados ao desenvolvimento da DC, estão envolvidos tanto na resposta imune adaptativa como na inata. Muitos desses genes estão relacionados a atividade dos receptores de quimiocinas, ligação de citocinas, ativação de células T, diferenciação dos linfócitos, produção de IFN- γ e ativação de células NK (ABADIE et al, 2011; TRYNCA, WIJMENGA & van HEEL, 2010). Esses estudos genéticos sobre genes fora do sistema HLA associados a DC contribuem para o melhor entendimento da patogênese da doença, embora muitas pesquisas ainda precisem ser realizadas neste campo.

1.6 Patogênese

A DC é uma enteropatia inflamatória com características autoimunes, que é desencadeada pela ingestão de glúten (LIONETTI & CATASSI, 2011). Glúten é o nome dado a proteínas de armazenamento presentes no trigo, cevada e centeio, que são ricas em resíduos de prolinas e glutaminas (SOLLID & JABRI, 2013). Peptídeos ricos em prolinas são resistentes a digestão gastrointestinal. No trigo, as proteínas do glúten são divididas em gliadinas e gluteninas, enquanto na cevada e centeio são denominadas hordeínas e secalinas, respectivamente (SOLLID & JABRI, 2013).

O epitélio intestinal, em condições normais, é impermeável a macromoléculas como as proteínas do glúten, pois possui junções celulares que funcionam como uma barreira a essas moléculas. Na DC, a permeabilidade paracelular é aumentada e a integridade dessas estreitas junções celulares (*tight junctions* - TJ) fica comprometida (LIONETTI & CATASSI, 2011). A regulação das TJ é realizada por uma proteína denominada zonulina, que é liberada após estimulação pela gliadina. A supra regulação da zonulina é responsável, em parte, pelo aumento da permeabilidade intestinal, característica da DC (FASANO, 2011). Estudos recentes sugerem que peptídeos do glúten podem atravessar o epitélio intestinal também via transcitose

(SCHUMANN et al, 2008) ou retrotranscrite mediada por imunoglobulina A (MATYSIAK-BUDNIK et al, 2008).

Os peptídeos resultantes da digestão incompleta do glúten atravessam a barreira epitelial do intestino e chegam à lâmina própria, onde são modificados pela enzima Transglutaminase tecidual (tTG) ou Transglutaminase 2 (TG 2). Esta enzima converte resíduos de glutamina em ácido glutâmico, por um processo denominado deamidação (LINDFORS et al, 2010). Os resíduos modificados, após a deamidação, passam a ter carga negativa e, assim, maior afinidade pelas moléculas MHC de classe II DQ2 e/ou DQ8 (MERESSE et al, 2012).

As moléculas DQ2 e DQ8 são expressas na membrana celular das APCs, principalmente macrófagos e células dendríticas. Os peptídeos do glúten, após sofrerem deamidação, são reconhecidos pelas APCs e apresentados, através das moléculas DQ2 e/ou DQ8, a células T CD4⁺ específicas do glúten, ativando-as. Após a ativação, essas células T CD4⁺ produzem altos níveis de citocinas do tipo Th1, que induzem secreção de metaloproteínas de matriz pelos fibroblastos intestinais, causando atrofia das vilosidades e hiperplasia de criptas, características da DC (ABADIE et al, 2011; Di SABATINO & CORAZZA, 2009).

As células T CD4⁺ específicas do glúten também produzem citocinas do tipo Th2, as quais promovem a ativação e expansão clonal de células B. Essas células, então, diferenciam-se em plasmócitos e produzem anticorpos contra tecidos conectivos (anti-endomísio ou EMA), anti-gliadina, anti-tTG e contra complexos gliadina-tTG. Os anticorpos anti-tTG interagem com moléculas de tTG ligadas a membrana celular, depositam-se na membrana basal e podem induzir mudanças no citoesqueleto de enterócitos e consequente lesão no epitélio intestinal (ABADIE et al, 2011; LIONETTI & CATASSI, 2011).

Além da imunidade adaptativa supracitada, a imunidade inata também está envolvida no processo de patogênese da DC (GIANFRANI et al, 2005). Células dendríticas, macrófagos e células intraepiteliais produzem IL-15 (interleucina 15), que atua como um potente fator de crescimento para IELs (EBERT, 1998). Os IELs representam uma abundante e heterogênea população de células T dentro do epitélio intestinal. Sob condições de estresse e inflamação, como na DC, os IELs são ativados e passam a adquirir funções efetoras citotóxicas. Na DC, a ativação desregulada dos IELs causa lesões no epitélio intestinal que levam a atrofia das vilosidades (ABADIE et al, 2012; GIANFRANI et al, 2005). A figura 5 mostra um esquema simplificado da patogênese da DC.

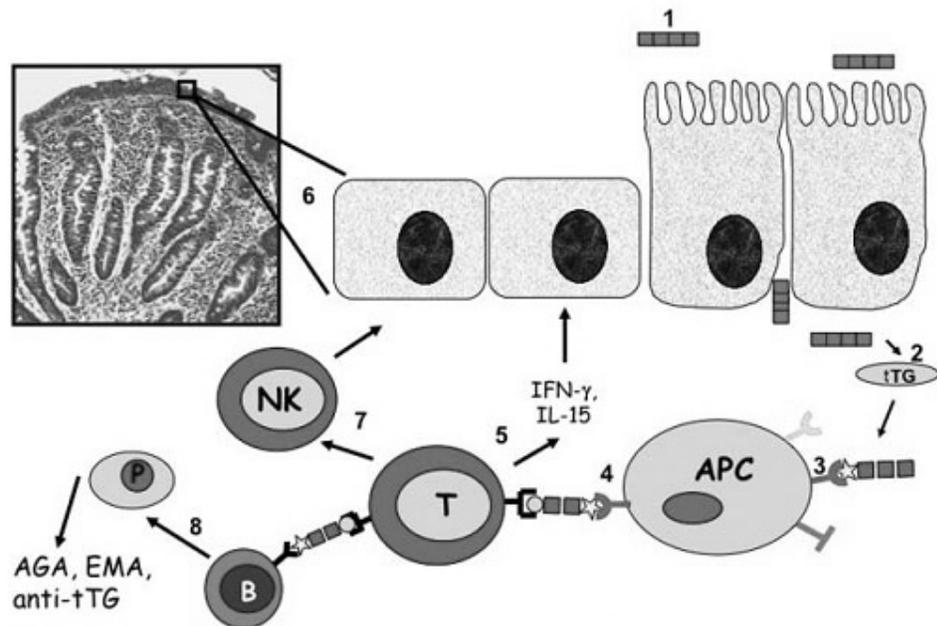


Figura 5 – Esquema representativo da patogênese da DC. Adaptado de Lionetti & Catassi, 2011. (1) peptídeos do glúten atravessam a barreira intestinal; (2) deamidação dos peptídeos do glúten pela tTG; (3) esses peptídeos passam a ter maior afinidade pelas moléculas de MHC DQ2 e/ou DQ8 presentes nas APCs; (4) os peptídeos são apresentados às células T, que são então ativadas; (5) células T ativadas passam a secretar citocinas Th1, que induzem a liberação e ativação de metaloproteases pelos fibroblastos; (6) causando a remodelagem da mucosa e atrofia das vilosidades; (7) células T CD4⁺ aumentam a citotoxicidade dos linfócitos intraepiteliais, levando a apoptose dos enterócitos; (8) células T CD4⁺ ativadas produzem citocinas Th2 e ativam a expansão clonal das células B, que se diferenciam em plasmócitos e produzem anticorpos contra o glúten e transglutaminase, contribuindo para a lesão da mucosa intestinal.

Existem diversos genes não-HLA que exercem funções na cascata imunológica da DC (ABADIE et al, 2011; TRYNCA, WIJMENGA & van HEEL, 2010). Alguns desses genes estão envolvidos na diferenciação de células T CD4⁺ e CD8. Outros genes atuam na regulação de células T e células B e na migração celular. Esses genes não-HLA estão envolvidos tanto na imunidade adaptativa quanto na inata (ABADIE et al, 2011).

2. Objetivos

2.1 Objetivo específico

Determinar a frequência de alelos HLA predisponentes para DC em grupo populacional de recém-nascidos do Distrito Federal.

2.2 Objetivo secundário

Validar a técnica de qPCR padronizada durante o presente trabalho para tipagem dos genótipos HLA-DQ2 e DQ8.

3. Materiais e métodos

3.1 População estudada

O estudo incluiu 329 recém-nascidos, de ambos os sexos (143 do sexo masculino e 186 feminino), nascidos na Unidade de Neonatologia (UN) do Hospital Universitário de Brasília (HUB), no período compreendido entre março de 2012 e setembro de 2013. Todas as mães dos recém-nascidos participantes da pesquisa receberam amplo esclarecimento verbal sobre os objetivos, riscos e benefícios do estudo. Após concordância em permitir a participação do recém-nato no trabalho, foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo I) em duas vias, uma das vias ficando em poder da mãe do recém-nascido participante da pesquisa. Foram excluídos do estudo recém-nascidos de baixo peso, prematuros ou com alguma anormalidade congênita.

Às mães de recém-nascidos que apresentaram alelos de risco para a eclosão de DC, foi oferecida a possibilidade de acompanhamento por médicos gastroenterologistas do Ambulatório de doença celíaca do Hospital Universitário de Brasília.

O presente trabalho foi previamente avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, onde está aprovado sob o nº 132/2008 (anexo II).

3.2 Delineamento do estudo e cálculo amostral

Este é um estudo de prevalência dos alelos HLA predisponentes para DC (DQ2 e DQ8) em recém-nascidos, com delineamento transversal. Para encontramos o cálculo de sujeitos participantes da pesquisa, partimos da prevalência aproximada de 30% descrita na literatura para a presença de alelos predisponentes para DC na população geral (WOLTERS e WIJMENGA, 2008). O tamanho da amostra (n) foi calculado utilizando o programa Epi Info versão 3.5.3, e o n encontrado foi de 323 indivíduos, considerando o erro máximo de 5% e o intervalo de confiança de 95%.

3.3 Coleta das amostras

Após a obtenção do consentimento das mães dos recém-nascidos, foram coletados 3mL de sangue total de cordão umbilical dos neonatos participantes da pesquisa em tubos contendo EDTA, seguindo a norma H3-A6 do *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

As razões que levaram a escolha da coleta de sangue do cordão umbilical de recém-nascidos foram baseadas em dois fatores, primeiramente na facilidade de realizar a coleta da amostra, pois essa é uma forma não invasiva de coletar material sanguíneo, não causando nenhum desconforto ou dor ao recém-nascido. E o segundo fator baseou-se principalmente na não interferência da idade em relação à presença ou ausência dos genes HLA que os recém-natos podem assegurar (ALMICI et al, 1995; REWERS et al, 1996 LEHMANN et al, 2011). As amostras de sangue foram armazenadas a uma temperatura de 8° C por um período máximo de 72 horas antes da extração do material genético.

3.4 Extração de DNA

As amostras de sangue foram utilizadas para extração do DNA pelo método de coluna de sílica, usando *kit* comercial *Illustra™ Blood genomicPrep Mini Spin* (GE Helathcare, Buckinghamshire, UK) seguindo as recomendações do fabricante. A concentração final de cada amostra de DNA variou de 10ng/μL a 100ng/μL. Todas as amostras de DNA foram armazenadas a uma temperatura de -20° C. Após a extração do DNA, as amostras de sangue foram devidamente tratadas e descartadas como resíduos biológicos.

3.5 Análise do DNA extraído

A quantidade do DNA extraído foi determinada através do equipamento *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer* (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA), que utiliza a leitura espectrofotométrica nas densidades óticas (DO) 260 nm e 280 nm. Quando a razão dessas densidades óticas (A260/A280) foi entre 1.8 e 2.0, o grau de pureza do DNA foi considerado adequado para a realização das análises.

3.6 Tipagem dos genes HLA DQ2 e DQ8

As amostras de DNA foram utilizadas para amplificação dos alelos DQA1*05, DQB1*02 (DQ2), e DQA1*03, DQB1*03:02 (DQ8). A amplificação desses alelos foi realizada pelo método de PCR em tempo real (q-PCR ou *real time* PCR), utilizando o aparelho *Step-One Instrument* (Applied BioSystems – Life Technologies™, Carlsbad, USA). Foram utilizadas sequencias específicas de *primers* para os alelos DQA1*05, DQB1*02 e DQA1*03:01 como descrito por Olerup et al (1993), e as sequencias dos *primers* para o alelo DQB1*03:02 foram utilizadas de acordo como descrito por Profzaizer et al (2011) (Tabela 2). Como controle da reação de PCR foi usado um par de *primers* de uma região conservada do gene HGH, o

Hormônio do Crescimento (*growth hormone*) conforme Profaizer et al (2011) descreveu. Todos os *primers* foram usados em uma concentração de 10µM (Tabela 3).

Tabela 2 - Sequência dos *primers* utilizados para q-PCR

Alelo	Cadeia	Primer	
		Foward (5'-3')	Reverse(5'-3')
DQA1*05	αDQ2	5'-ACG GTC CCT CTG GCC AGT A-3'	5'-AGT TGG AGC GTT TAA TCA GAC-3'
DQB1*02	βDQ2	5'-GTG CGT CTT GTG AGC AGA AG-3'	5'-GCA AGG TCG TGC CGA GCT-3'
DQA1*03	αDQ8	5'-TTC ACT CGT CAG CTG ACC AT-3'	5'-CAA ATT GCG GGT CAA ATC TTC T-3'
DQB1*03:02	βDQ8	5'-GCG CGT GCG TCT TGT GAC C-3'	5'-CTG TTC CAG TAC TCG GCG GCA-3'
HGH	Controle da reação (<i>Growth Hormone</i>)	5'-GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3'	5'-TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT-3'

Foram realizadas quatro reações por amostra para amplificar individualmente cada alelo. Essas reações foram feitas em triplicatas e foram efetuadas conforme descrito a seguir e na tabela 2: 1µL do *primer foward*, 1µL do *primer reverse*, 10µL de *SYBR Green* (*Absolute qPCR SYBR Green Rox Mix - Thermo Fisher Scientific Inc, Vilnius, Lithuania*), 2µL de DNA genômico e 6µL de água ultra pura (*Thermo Fisher Scientific Inc, Vilnius, Lithuania*) para um volume total de 20µL por reação. Foram usadas como controles positivos amostras previamente tipadas para cada um dos alelos HLA estudados. Como controle negativo e de contaminação foi usada uma amostra que não continha DNA. As reações de PCR foram adicionadas a placas de 48 poços (*Applied BioSystems – Life Technologies™, Carlsbad, USA*), depois centrifugadas por um minuto a 1300rpm e em seguida foram colocadas no aparelho *Step-One Instrument*.

Tabela 3- Resumo das condições das reações de qPCR

Componentes	Volume	Concentração
<i>Primer foward</i>	1µL	10µM
<i>Primer reverse</i>	1µL	10µM
<i>SYBR Green</i>	10µL	2X
DNA	2µL	10ng/µL a 100ng/µL
Água ultra pura	6µL	-
Total	20µL	-

Os alelos DQA1*05, DQB1*02 e DQA1*03 foram amplificados sob as seguintes condições (tabela 4): uma etapa inicial de desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguida de uma sequência de 32 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 60 segundos a 60°C (anelamento

e extensão); após a amplificação dos alelos segue-se a etapa da curva de *melting* (essa etapa é realizada em 3 passos: 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e novamente 95°C por 15 segundos).

Tabela 4 - Condições da qPCR para os alelos DQA1*05, DQB1*02 e DQA1*03

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	10 minutos	1
Desnaturação	95°C	15 segundos	32
Anelamento e extensão	60°C	60 segundos	
Curva de <i>melting</i> passo 1	95°C	15 segundos	1
Curva de <i>melting</i> passo 2	60°C	60 segundos	
Curva de <i>melting</i> passo 3	95°C	15 segundos	

O alelo DQB1*03:02 foi amplificado de acordo com as condições descritas por Profazer et al (2011): uma etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguida de 6 etapas de amplificação e por fim segue-se a etapa da curva de *melting*; essas condições estão descritas em detalhes na tabela 5.

Tabela 5 - Condições da qPCR para o alelo DQB1*03:02 descritos por Profazer et al, 2011

Etapa	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
Amplificação 1	95°C	20 segundos	2
	71°C	45 segundos	
	72°C	10 segundos	
Amplificação 2	95°C	20 segundos	10
	70°C	45 segundos	
	72°C	10 segundos	
Amplificação 3	95°C	20 segundos	10
	69°C	45 segundos	
	72°C	10 segundos	
Amplificação 4	95°C	20 segundos	5
	67°C	45 segundos	
	72°C	10 segundos	
Amplificação 5	95°C	20 segundos	5
	66°C	45 segundos	
	72°C	10 segundos	
Amplificação 6	95°C	20 segundos	2
	65°C	45 segundos	
	72°C	10 segundos	
Curva de <i>melting</i>	95°C	5 segundos	1
	50°C	1 minuto	
	97°C	Contínuo	

3.7 Análise dos dados processados pela técnica de PCR em tempo real

Para analisar e garantir a qualidade do produto amplificado pela técnica de PCR em tempo real, em todas as reações foram analisados os produtos da amplificação dos alelos. A figura 6 representa os picos de desnaturação dos alelos, que são gerados a partir da derivada da intensidade de fluorescência da curva de desnaturação, onde se observa um único pico de *Temperature melting* (T_m), que é única para cada alelo estudado, o que demonstra a presença de um único produto amplificado para cada alelo individualmente.

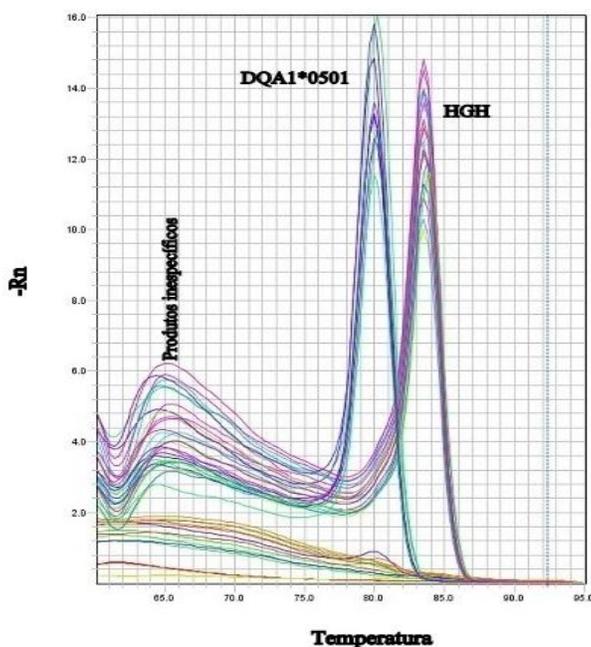


Figura 6 – Representação gráfica das curvas de *melting* do alelo DQA1*05 e do controle da reação (HGH). Temperatura em ° C

3.8 Validação da técnica aplicada no estudo (PCR em tempo real *versus* PCR SSP comercial)

Todos os resultados positivos analisados pelo método de PCR em tempo real foram validados utilizando o *kit* comercial *DQ-CD Typing Plus* (BioDiagene®, Palermo, Italy), devidamente certificado pela Agência espanhola de medicamentos (Cert. 93/42/1.1-Ver. 20/02/2003). Esse *kit* é usado para identificação de alelos HLA de classe II associados a DC, e permite identificar o status de homozigose do alelo DQB1*02. Os alelos HLA identificados pelo *kit* são: DQA1*02:01, DQA1*03, DQA1*05, DQB1*02, DQB1*03:01/04, DQB1*03:02, DRB1*03, DRB1*04, DRB1*07, DRB1*11, DRB1*12. O *kit* identifica o risco de desenvolvimento da DC baseado nos alelos alvos. Esse *kit* identifica os mesmos alelos analisados pela técnica de PCR em tempo real (DQA1*05, DQB1*02, DQA1*03 e DQB1*03:02), além de outros alelos que formam os diferentes haplótipos

O princípio do método utilizado pelo *kit*, consiste na amplificação dos genes alvos por PCR-SSP (*sequence-specific primers*). Para cada amostra são analisados 12 tubos de PCR, um tubo para cada alelo alvo. Cada tubo contém dois pares de *primers*, um par para amplificação do controle interno e outro para amplificação de um alelo específico. A identificação e detecção desses alelos HLA de classe II são realizadas por eletroforese em gel de agarose. Ao final da corrida de eletroforese, o gel de agarose é exposto a um transiluminador de luz ultravioleta, o qual permite a visualização do material amplificado como bandas de tamanhos diferentes. O tamanho de cada banda refere-se ao peso molecular de cada fragmento de amplificação e é dado em pares de base (pb).

Os alelos alvos e o controle interno são identificados pelo tamanho do fragmento de amplificação ou banda. A tabela 6 mostra o peso molecular do controle interno e de cada banda dos alelos alvos.

Tabela 6 - representação dos alelos alvos e seus respectivos pesos moleculares

Alelo	Peso molecular (pb)
DQA1*02:01	170 pb
DQA1*03	183 pb
DQA1*05	186 pb
DQB1*02	205 pb
DQB1*03:01/04	250 pb
DQB1*03:02	119 pb
DRB1*03	151 pb
DRB1*04	260 pb
DRB1*07	232 pb
DRB1*11	176 pb
DRB1*12	248 pb
Estado de heterozigose do alelo DQB1*02	111 pb
Controle interno	796 pb

Para cada alelo alvo há duas possibilidades de resultados: presença de duas bandas ou presença de apenas uma banda. A presença de duas bandas equivale a uma banda com um elevado

peso molecular (796 pb), correspondente ao controle interno, e outra banda com baixo peso molecular, correspondente a presença do alelo alvo (figura 7).

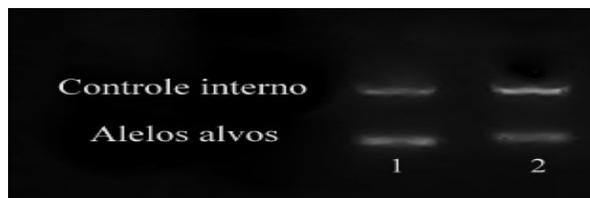


Figura 7 – Presença das bandas equivalentes ao controle interno e aos alelos alvos. 1 = alelo DQA1*05; 2 = alelo DQB1*02

Quando há a presença de apenas uma banda com elevado peso molecular (correspondente ao controle interno – 796 pb), significa que a amostra testada não possui o alelo alvo, ou seja, o resultado é negativo (figura 8 A). Contudo, a presença de apenas uma banda com baixo peso molecular indica que a amostra testada possui o alelo alvo mas o controle interno não foi amplificado (Figura 8 B). O teste é considerado válido quando pelo menos uma banda (controle interno ou alelo alvo) for visível no gel, a ausência de bandas indica erro na amplificação.

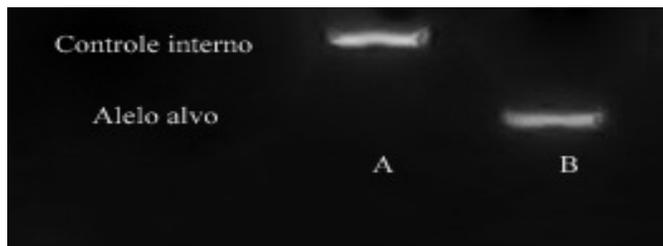


Figura 8 – Exemplo de um resultado negativo (A) e de um resultado positivo (B).
A: presença apenas da banda equivalente ao controle interno
B: presença apenas da banda equivalente alelo alvo (DRB1*07)

A presença da banda correspondente ao estado de heterozigose do alelo DQB1*02 (111 pb) indica que a amostra testada não está em homozigose para o alelo em questão (figura 9). Já a ausência dessa banda indica que a amostra testada está em homozigose para o alelo DQB1*02.

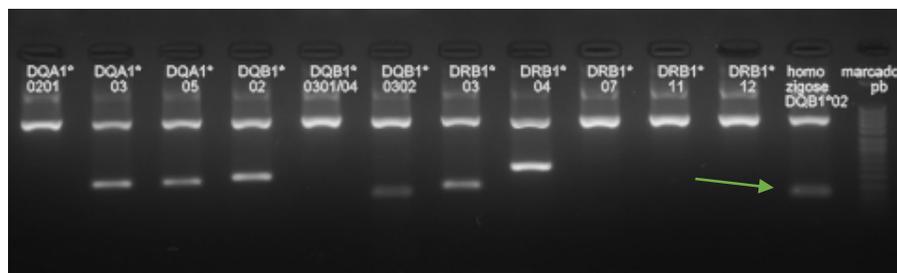


Figura 9 - Resultado de uma amostra que apresenta simultaneamente os heterodímeros DQ2 e DQ8. Marcador pb: marcador de peso molecular em pares de base (pb). A seta aponta para a presença de uma banda que indica que a amostra não está em homozigose para o alelo DQB1*02.

O heterodímero DQ2 é identificado pela presença dos alelos DQA1*05 e DQB1*02 (figura 10). Esse alelos, que codificam o heterodímero DQ2, são comumente encontrados no haplótipo DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02 (combinação CIS – figura 10 A) ou nos haplótipos DRB1*11/12-DQA1*05-DQB1*03:01; DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02 (combinação TRANS – figura 10 B). O heterodímero DQ8 é identificado pela presença dos alelos DQA1*03 e DQB1*03:02 (figura 9). Os alelos que formam o heterodímero DQ8 são encontrados no haplótipo DRB1*04-DQA1*03-DQB1*03:02 (combinação CIS).

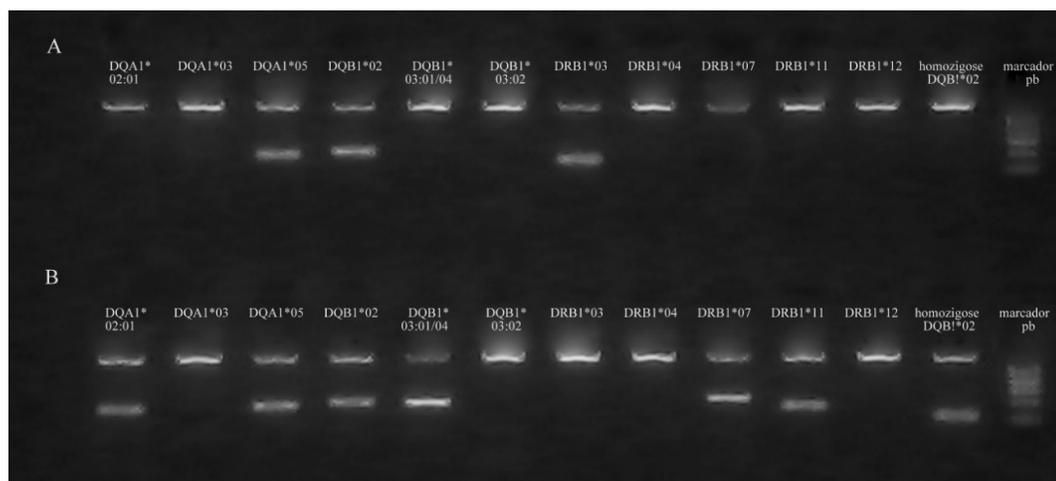


Figura 10 – Exemplos de amostras que apresentam a combinação CIS e TRANS dos alelos DQA1*05 e DQB1*02.

A presença do alelo DQB1*02 e ausência do alelo DQA1*05 (figura 11), identifica um heterodímero encontrado no haplótipo DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02, o qual é diferente do DQ2 mas confere um risco moderado para DC (MEGIORNI & PIZZUTI, 2012). A presença do alelo DQA1*05 e ausência do alelo DQB1*02 identifica outro heterodímero diferente do DQ2 e encontrado no haplótipo DRB1*11/12-DQA1*05-DQB1*03:01, esse heterodímero confere um risco muito baixo para desenvolvimento de DC (MEGIORNI et al, 2009).

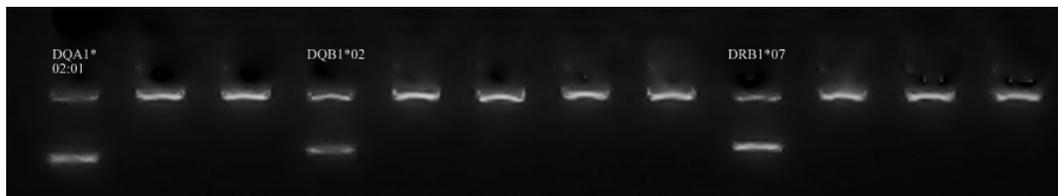


Figura 11 – haplótipo DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02

3.9. Análise estatística

A análise de dados foi realizada pelo *software Statistical Package for Social Sciences* (SPSS *Statistics for Windows, Version 17.0*. Chicago: SPSS Inc, U.S.A.) e Microsoft Office Excel 2010.

4. Resultados

4.1 Análise descritiva da população estudada

No presente estudo foram analisadas 329 amostras de recém-nascidos, das quais 143 eram do sexo masculino e 186 eram do sexo feminino. Desse total, 187 (56,8%) apresentaram os alelos HLA predisponentes para DC. Dos 187 recém-nascidos afetados, 77 eram do sexo masculino e 110 eram do sexo feminino.

4.2 Distribuição da frequência dos alelos HLA predisponentes para DC

Dos 329 neonatos, 5 (1,52%) apresentaram tanto o heterodímero DQ2 quanto o DQ8; 58 (17,63%) apresentaram apenas o heterodímero DQ2 completo (DQA1*05 e DQB1*02); 77 (23,40%) apresentaram DQ2 incompleto. Desses 77 recém-nascidos com DQ2 incompleto, 43 (13,07%) foram positivos para o alelo DQA1*05 e 34 (10,33%) positivos para o alelo DQB1*02. Dos 47 (14,29%) recém-nascidos restantes, 37 (11,2%) apresentaram apenas o heterodímero DQ8 (DQA1*03 e DQB1*03:02) e 10 (3,04%) neonatos apresentaram o DQ8 em conjunto com o alelo DQB1*02. A distribuição detalhada da prevalência dos alelos HLA predisponentes para DC está demonstrada na Tabela 7.

Tabela 7– Prevalência dos alelos HLA predisponentes para DC encontrados em 187 (56,84%) recém-nascidos, utilizando a técnica qPCR.

Genótipo	Heterodímero	Alelos	N	Prevalência	Total
DQ2 e DQ8	$\alpha\beta$ DQ2 $\alpha\beta$ DQ8	α DQ2(DQA1*05) β DQ2(DQB1*02) α DQ8(DQA1*03) β DQ8(DQB1*03:02)	5	1,52 %	1.52 %
DQ2	$\alpha\beta$ DQ2	α DQ2(DQA1*05) β DQ2(DQB1*02)	58	17.63 %	17.63 %
DQ2 incompleto	α DQ2	α DQ2(DQA1*05) β DQ2 (X)	43	13.07 %	23.40 %
	β DQ2	α DQ2 (X) β DQ2(DQB1*02)	34	10.33 %	
DQ8	$\alpha\beta$ DQ8	α DQ8(DQA1*03) β DQ8(DQB1*03:02)	37	11.25 %	14.29 %
DQ8 e DQ2 incompleto	$\alpha\beta$ DQ8 β DQ2	α DQ8(DQA1*03) β DQ8(DQB1*03:02) β DQ2(DQB1*02)	10	3.04 %	
Total					56.84%

X = cadeia não identificada; α = cadeia α do heterodímero DQ; β = cadeia β do heterodímero DQ

4.3 Confirmação dos resultados utilizando kit *DQ-CD Typing Plus* – PCR-SSP

Os 187 resultados positivos obtidos pela técnica de qPCR foram confirmados pelo método PCR-SSP, utilizando o kit *DQ-CD Typing Plus* (BioDiagene, Palermo, Italy). Todos os resultados obtidos pela técnica qPCR, demonstrados na tabela 7, foram condizentes com os resultados encontrados com o kit *DQ-CD Typing Plus* – PCR-SSP (tabela 8). Ao aplicar o método PCR-SSP nas 58 amostras que foram positivas para o heterodímero DQ2 (DQA1*05 e DQB1*02), foi possível detectar o estado de homozigose do alelo DQB1*02 em 18 amostras e heterozigose desse mesmo alelo em 40 amostras (tabela 8).

O alelo DQA1*05 foi identificado em 43 amostras que apresentaram DQ2 incompleto (tabela 7), com o uso do kit *DQ-CD Typing Plus* – PCR-SSP foi possível identificar nessas amostras o alelo DQB1*03:01/04 (tabela 8), que codifica a cadeia β não identificada pela técnica qPCR. O alelo DQB1*02 foi identificado nas outras 34 amostras

que apresentaram DQ2 incompleto, o kit *DQ-CD Typing Plus* – PCR-SSP permitiu a identificação do alelo DQA1*02:01 (tabela 8), que codifica a cadeia α não identificada pela técnica qPCR. Além disso, nessas 34 amostras (DQA1*02:01 e DQB1*02 positivas), o kit *DQ-CD Typing Plus* – PCR-SSP também identificou o estado de homozigose do alelo DQB1*02 em 4 amostras e o estado de heterozigose desse mesmo alelo em 30 amostras (tabela 8).

Tabela 8 – Prevalência dos alelos HLA predisponentes para DC em recém-nascidos usando o kit *DQ-CD Typing Plus* - PCR-SSP

Genótipo	Heterodímeros	Alelos	N	Prevalência	Total
DQ2 e DQ8	$\alpha\beta$ DQ2 $\alpha\beta$ DQ8	α DQ2(DQA1*05) β DQ2(DQB1*02) α DQ8(DQA1*03) β DQ8(DQB1*03:02)	5	1,52%	1,52%
DQ2	$\alpha\beta$ DQ2 (β homozigose)	α DQ2(DQA1*05) β DQ2(DQB1*02/02)	18	5,47%	17,63%
	$\alpha\beta$ DQ2 (β heterozigose)	α DQ2(DQA1*05) β DQ2 (DQB1*02/x)	40	12,15%	
DQ2 incompleto	α DQ2 β DQ2 [‡]	α DQ2(DQA1*05) β DQ2(DQB1*03:01/04)	43	13,07%	23,40%
	α DQ2 [‡] β DQ2 (β homozigose)	α DQ2(DQA1*02:01) β DQ2(QB1*02/02)	4	1,22%	
	α DQ2 [‡] β DQ2 (β heterozigose)	α DQ2(DQA1*0201) β DQ2 (DQB1*02/x)	30	9,12%	
DQ8	$\alpha\beta$ DQ8	α DQ8(DQA1*03) β DQ8(DQB1*03:02)	37	11,25%	14,29%
DQ8 e DQ2 incompleto	$\alpha\beta$ DQ8 β DQ2	α DQ8(DQA1*03) β DQ8(DQB1*03:02) β DQ2(DQB1*02)	10	3,04%	
Total					56,84%

Com o kit *DQ-CD Typing Plus* - PCR-SSP foi possível diferenciar as conformações *cis* e *trans* do heterodímero DQ2 encontrado em 58 amostras analisadas. Desse total, 42 apresentaram a configuração *cis* (haplótipo DRB1*03-DQA1*05-

DQB1*02) e 16 apresentaram a configuração *trans* (haplótipos DRB1*11/12-DQA1*05-DQB1*03:01/04; DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02). A tabela 9 mostra a distribuição da frequência das diferentes conformações do heterodímero DQ2.

Tabela 9 – Distribuição da frequência das diferentes conformações do heterodímero DQ2.

Genótipo	Heterodímeros	Alelos	N	Prevalência
DQ2 em CIS	$\alpha\beta$ DQ2	α DQ2(DQA1*05) β DQ2(DQB1*02)	42	12,77%
DQ2 em TRANS	$\alpha\beta$ DQ2	α DQ2(DQA1*05) β DQ2(DQB1*02)	16	4,86%
Total			58	17,63%

5. Discussão

No Brasil não há estudos a respeito da prevalência dos genes HLA predisponentes para DC na população geral. No presente trabalho foi utilizado sangue de cordão umbilical (SCU) obtido no momento do parto de recém-nascidos (RNs) não selecionados. A coleta do SCU para rastreamento dos marcadores HLA em RNs foi realizada com sucesso em estudos anteriores sobre determinação do risco genético em diabetes tipo 1 (BERZINA et al, 2002; EMERY et al, 2005). Se a técnica de coleta for realizada com cuidado, as chances de contaminação com o sangue materno são insignificantes (REWERS et al, 1996).

Os *primers* utilizados neste estudo foram desenhados para serem usados na técnica de PCR-SSP (OLERUP et al, 1993). Contudo, nós utilizamos esses *primers* no método qPCR e todos os resultados obtidos foram confirmados pelo kit comercial *DQ-CD Typing Plus* (BioDiagene®, Palermo, Italy). Apesar de não ter identificado o estado de homozigose do alelo DQB1*02, o método qPCR mostrou-se altamente confiável, pois não houve nenhuma discordância com os resultados obtidos pelo kit comercial.

O presente trabalho encontrou uma prevalência de 33,44% para os heterodímeros HLA-DQ2 completo (DQA1*05:01, DQB1*02:01) e/ou DQ8 completo (DQA1*03, DQB1*03:02). O resultado encontrado foi semelhante aos achados na Europa, onde a prevalência desses alelos varia de 20 a 30% (MEGIORNI et al, 2009; WOLTERS e WIJMENGA, 2008). Entretanto, como mostra a tabela 10, se analisarmos as prevalências de cada alelo separadamente, uma porcentagem elevada para aqueles alelos que conferem maior risco para DC pode ser observada entre os RNs brasileiros, quando comparamos aos 292 italianos saudáveis analisados recentemente por Mergioni et al (2009).

Tabela 10 – Comparação entre a prevalência (%) dos alelos HLA predisponentes para DC em 329 recém-nascidos brasileiros e 292 indivíduos saudáveis italianos.

	Itália	Brasil
$\alpha\beta$ DQ2/ $\alpha\beta$ DQ8	0.2 %	1.5 %
$\alpha\beta$ DQ2/ β homozigose	2.4 %	5.4 %
$\alpha\beta$ DQ8/ β DQ2	0.7 %	3.0 %
β DQ2 homozigose	0.4 %	1.2 %
$\alpha\beta$ DQ2/ β heterozigose	19.2 %	12.1 %
$\alpha\beta$ DQ8	6.5 %	11.2 %
β DQ2 heterozigose	9.7 %	9.2 %
α DQ2	37.9 %	13.0 %
Outros	23.0 %	43.1 %

Essa incongruência pode ser explicada pelo elevado grau de heterogeneidade da população brasileira, resultado de cinco séculos de miscigenação entre três etnias principais: caucasiana, africana e ameríndia. Além disso, nos últimos dois séculos ocorreram sucessivas ondas migratórias principalmente de italianos, portugueses, espanhóis, alemães, japoneses, libaneses e sírios, que colaboraram para a diversidade étnico-racial do Brasil. Portanto, cada brasileiro recebeu uma contribuição genética dessas diferentes etnias, o que dificulta a caracterização do indivíduo em um grupo étnico específico (PENA et al, 2009). A heterogeneidade da população brasileira foi confirmada por análises de marcadores de ancestralidade em indivíduos das cinco regiões do Brasil. A maior contribuição genética veio da Europa (0,643 a 0,771), seguida da África (0,143 a 0,252) e da etnia ameríndia (0,085 a 0,105) (GODINHO et al, 2008; LINS et al, 2010).

A prevalência aumentada para os alelos que conferem maior risco para DC foi inesperada, pois, como mostram diversos estudos populacionais (GANDOLFI et al, 2000; CROVELLA et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2007), a prevalência de DC no Brasil, embora significativa, não é expressiva como a encontrada na Europa. Pratesi et al (2003) anteriormente realizaram um estudo em Brasília com um grupo populacional semelhante e encontraram uma prevalência de 0,34% (1:294) para DC. Essa discrepância entre a presença de um risco genético aumentado e baixa prevalência de DC em nossa população poderia ser parcialmente explicada pelo baixo consumo de glúten no Brasil. A principal refeição básica brasileira é constituída predominantemente por arroz e feijão, conseqüentemente a ingestão de glúten não é muito elevada (53,5 kg/ano *per capita*) quando comparada ao consumo de trigo na Europa (144,2 kg/ano *per capita*) (FAOSTAT, 2009). Outra possível explicação, sugerida por Pratesi et al (2003), é a mortalidade aumentada em um grupo etário mais jovem, e a falta de diagnóstico para a DC.

Nosso estudo não esteve isento de limitações. Embora as contaminações de amostras de RNs pelo material sanguíneo materno não pareceu ser um problema significativo, a frequência exata dos genótipos HLA-DQ2 e DQ8 deve ser determinada no futuro em amostras de sangue obtidas diretamente das crianças (REWERS et al, 1996). Ademais, embora tenhamos afirmado anteriormente que a população de Brasília é uma boa representação da população brasileira, essa afirmação está parcialmente correta. Apesar de 49,6% da população de Brasília ser formada por migrantes de todas as regiões do país, a maioria veio das regiões Centro-Oeste (60%) e Nordeste (23%) (IBGE, 2010). Essas duas regiões receberam elevada contribuição

genética de afrodescendentes e ameríndios, quando comparadas às outras regiões do Brasil (GODINHO et al, 2008).

6. Conclusão

Este é o primeiro estudo realizado no Brasil de prevalência dos genes HLA predisponentes para DC na população geral. Como já previamente citado, apesar do estudo ter sido efetuado em população do Distrito Federal, levando em consideração o grande fluxo migratório das diferentes regiões do país para a capital, o grupo estudado pode ser considerado bastante representativo da população geral do Brasil. Espera-se que novos estudos venham complementar as conclusões aqui obtidas, principalmente enfocando grupos populacionais menos representados na presente pesquisa, como é o caso de populações das regiões sudeste e sul do país. A prevalência encontrada dos dois heterodímeros, HLA-DQ2 completo (DQA1*05, DQB1*02) e/ou DQ8 completo (DQA1*03, DQB1*03:02) foi de 33,44%, o que é relativamente similar à encontrada na população europeia, onde a prevalência varia entre 20 a 30%, nas diferentes regiões. Os quatro alelos que codificam esses dois heterodímeros, quando herdados em conjunto (DQA1*05 em conjunto com DQB1*02, DQA1*03 em conjunto com DQB1*03:02 ou os quatro alelos juntos), são considerados os alelos de maior risco para a eclosão da doença celíaca ao longo da vida. Adicionalmente, este estudo permitiu a adoção e padronização da técnica de qPCR, que foi validada por testes efetuados com *kit* comercial baseado na técnica de PCR-SSP de reconhecida exatidão e reprodutibilidade. A padronização da técnica de qPCR, seguida de sua validação, resultou em maior praticidade e velocidade no processo de detecção destes alelos, sem perda da exatidão.

7. Referências

- ABADIE V., 2011. Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol*, v.29, p.493–525, 2011.
- ABADIE, V; Discepolo, V; Jabri, B. Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Semin Immunopathol*, v.34, p.551–566, 2012.
- ADMOU B, ESSAADOUNI L, KRATI K, et al. Atypical celiac disease: from recognizing to managing. *Gastroenterol Res Pract*, v.63, p.7187, 2012.
- ALMICI, C. et al. Umbilical cord blood as a source of hematopoietic stem cells: from research to clinical application. *Haematologica*, v.80, p.473-479, 1995.
- AURICCHIO, S.; TRONCONE, R. History of coeliac disease. *Eur J Pediatr*, v.155, n.6, p.427-428, 1996.
- BAO, F.; GREEN, P. H. R.; BHAGAT, G. An Update on Celiac Disease Histopathology and the Road Ahead. *Arch Pathol Lab Med*, v.136, p. 735-745, 2012.
- BERZINA L, SHTAUVERE-BRAMEUS A, LUDVIGSSON J, SANJEEVI CB. Newborn screening for high-risk human leukocyte antigen markers associated with insulin-dependent diabetes mellitus: the ABIS study. *Ann N Y Acad Sci*, v.958, p.312-6, 2002.
- BITTOLO M, NOT T, PERTICARARI S, CAUCI S, GRAZIOSI G, MARZARI R. A dot immunobinding assay to detect anti-alpha-gliadin antibodies in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, v.11, n.3, p.337-41, 1990.
- BRIANI, C.; SAMAROO, D.; ALAEDINI, A. Celiac disease: From gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, v.7, p. 644–650, 2008.
- CATASSI C. et al. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *The Lancet*, v. 354, p. 647-648, 1999.
- CATASSI, C et al. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr Suppl*, v.412, p.29-35, 1996.
- CATASSI, C; KRYSZAK, D; LOUIS-JACQUES, O et al. Detection of celiac disease in primary care: A multicenter case-finding study in North America. *Am J Gastroenterol*, v.102, p. 1454-60, 2007.
- CHANG, M.; GREEN, P.H.R. Genetic Testing Before Serologic Screening in Relatives of Patients With Celiac Disease as a Cost Containment Method. *J Clin Gastroenterol*, v.43, p.43–50, 2009.
- CHORZELSKI T, JARZABEK-CHORZELSKA M, JABŁOŃSKA S, ORTH G, RZESA G. An immunofluorescence complement-fixation test for detection of human papilloma viruses in various warts and wartlike lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Arch Dermatol Res*, v.275, n.1, p.53-7, 1983.

COOK HB, BURT MJ, COLLETT JA, WHITEHEAD MR, FRAMPTON CM, CHAPMAN BAJ. Adult coeliac disease: prevalence and clinical significance. *Gastroenterol Hepatol*. v.15, n.9, p.1032-6, 2000.

CROVELLA S, BRANDÃO L, GUIMARÃES R, DE LIMA FILHO JL, ARRAES LC, VENTURA A et al. Speeding up coeliac disease diagnosis in developing countries. *Dig Liver Dis*, v.39, p.900-2, 2007.

Di SABATINO A, CORAZZA GR. Coeliac disease. *The Lancet*, v.373, p.1480-93, 2009.

DIETERICH, W. et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*, v.3, n.7, p.797-801, 1997.

EBERT EC. Interleukin 15 is a potent stimulant of intraepithelial lymphocytes. *Gastroenterology*, v.115, n.6, p.1439-45, 1998

EMERY LM, BABU S, BUGAWAN TL, NORRIS JM, ERLICH HA, EISENBARTH GS, et al. Newborn HLA-DR,DQ genotype screening: age- and ethnicity-specific type 1 diabetes risk estimates. *Pediatr Diabetes*, v.6, p.136-44, 2005.

FAOSTAT - Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available from: http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/FB/*/E [Acesso em: 30 de Julho de 2013]

FASANO A, CATASSI C, KRYSZAK D et al. Prevalence of celiac disease among school children in Egypt: results of a pilot study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, v.39:s222, 2004.

FASANO A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev*, v.91, p.151–175, 2011.

FASANO, A. Celiac disease: the past, the present, the future. *Pediatrics*, v.107, n.4, p.768-770, 2001.

GANDOLFI, L. et al. Prevalence of Celiac Disease Among Blood Donors in Brazil. *The American Journal of Gastroenterology*, v.95, n.3, p.689-692, 2000.

GIANFRANI, C; AURICCHIO, S; TRONCONE, R. Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Immunology Letters*, v.99, p.141–145, 2005.

GODINHO N.M.O, GONTIJO C.C, DINIZ M.E.C.G, FALCÃO-ALENCAR G, DALTON G.C, AMORIM C.E.G, BARCELOS R.S.S, KLAUTAU-GUIMARÃES M.N, OLIVEIRA S.F. Regional patterns of genetic admixture in South America. *F Sci Int: Genetics Supplement Series*, v.1, p.329–330, 2008.

GOMEZ J.C, SELVAGGIO G.S, VIOLA M, et al. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol*,v.96, n.9, p.2700-4, 2001.

GUJRAL, N; FREEMAN, HJ; THOMSON, ABR. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World J Gastroenterol*, v.18, n.42, p.6036-6059, 2012.

- HARRIS, L.A.; PARK, J.Y.; VOLTAGGIO, L.; LAM-HIMLIN, D. Celiac disease: clinical, endoscopic and histopathologic review. *Gastrointest Endosc.* v.76, n.3, p.625-40, 2012.
- HOVELL CJ, COLLETT JA, VAUTIER G, CHENG AJ, SUTANTO E, MALLON DF, OLYNYK JK, CULLEN DJ. High prevalence of coeliac disease in a population-based study from Western Australia: a case for screening? *Med J Aust*, v.175, n.5, p.247-50, 2001.
- HUSBY S. Guideline - European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *JPGN*, v.54, p.136–160, 2012.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Censo 2010. Available from: <http://censo2010.ibge.gov.br/> [Acesso em: 12 de Agosto de 2013].
- KAGNOFF M.F. AGA Institute medical position statement on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*, v.131, n.6, p.1977-80, 2006.
- KARREL K et al. HLA Types in Celiac Disease Patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) Heterodimer: Results From the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Human Immunology*; v.64, p.469–77, 2003.
- KLEIN, J; SATO, A. The HLA System. *N Engl J Med*, v.343, p.702-709, 2000.
- KUPFER S. S., JABRI B. Pathophysiology of Celiac Disease. *Gastrointest Endoscopy. Clin N Am*, v.22, p.639–660, 2012.
- LEFFLER DA, SCHUPPAN D: Update on serologic testing in celiac disease. *The American Journal of Gastroenterology*, v.105, p.2520–4, 2010.
- LEHMANN, A. S. et al. Collection of human genomic DNA from neonates: a comparison between umbilical cord blood and bucal swabs. *Am J Obstet Gynecol*, v.6, p.204:362, 2011.
- LINDFORS K, MAKI M, KAUKINEN K. Transglutaminase 2-targeted autoantibodies in celiac disease: Pathogenetic players in addition to diagnostic tools? *Autoimmunity Reviews*. V.9, n.11, p.744-9, 2010.
- LINS T.C, VIEIRA R.G, ABREU B.S, GRATTAPAGLIA D, PEREIRA R.W. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol*, v.22, p.187-92, 2010.
- 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.
- 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.
- LUDVIGSSON J.F, LEFFLER D.A, BAI J.C, et al .The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, v.62, n.1, p.43–52, 2013.

- MAHADOV S, GREEN P.H. Celiac disease: a challenge for all physicians. *Gastroenterol Hepatol*, v.7, n.8, p.554-6, 2011.
- MANOLIO, T.A. Genome wide association studies and assesment of the risk of disease. *N Engl J Med*, v.363, p.166-76, 2010.
- MARSH M.N. Grains of thruth: evolutionary changes in small intestinal mucosa in response to environmental antigen challenge. *Gut*, v.31, p.111-4, 1990.
- MATYSIAK-BUDNIK T, MOURA IC, Arcos-Fajardo M, Lebreton C, Ménard S, Candalh C, et al. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *The Journal of experimental medicine*, v.205, n.1, p.143-54, 2008.
- MEDRANO, LM; DEMA, B; LOPEZ-LARIOS, A. HLA and Celiac Disease Susceptibility: New Genetic Factors Bring Open Questions about the HLA Influence and Gene-Dosage Effects. *Plos One*, V. 7 p. 1-5, 2012.
- MEGIORNI, F.et al. HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Human Immunology*, v.70, p.55-59, 2009.
- MEGIORNI, F;PIZZUTI, A. HLA-DQA1andHLA-DQB1in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of Biomedical Science*, v.19, p.88, 2012.
- MERESSE B, MALAMUT G, CERF-BENSUSSAN N. Celiac disease: an immunological jigsaw. *Immunity*, v.36, n.6, p.907-19, 2012.
- MUSTALAHTI K, CATASSI C, REUNANEN A, et al. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med*, v.42, n.8, p.587-95, 2010.
- OLERUP O. et al. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*, v.41, p.119-34, 1993.
- OLIVEIRA R.P, SDEPANIAN V.L, BARRETO J.A, CORTEZ A.J, CARVALHO F.O, BORDIN J.O, et al. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, v.19, p.43-9, 2007.
- PENA S.D, BASTOS-RODRIGUES L, PIMENTA J.R, BYDLOWSKI S.P. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Braz J Med Biol Res*, v.42, p.870-6, 2009.
- PRATESI, R. et al. Prevalence of Coeliac Disease: Unexplained Age-related Variation in the Same Population. *Scand J Gastroenterol*, v.38, p.747-750, 2003.
- PRAVELEY W.F. From Arateus to Crosby - a history of coeliac disease. *BMJ*, v.29, p.724-731, 1988
- PRESUTTI, R.J. et al. Celiac Disease. *Am Fam Physician*, v.76, p.1795-1802, 2007.
- PROFAIZER, T. et al. Celiac disease and HLA typing using real-time PCR with melting curve analysis. *Tissue Antigens*, v.78, p.31-37, 2011.

- REWERS, M. et al. Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: Diabetes DAISY). *Diabetologia*, v.39, p.807-812, 1996.
- ROSTOM 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, p.1981–2002, 2006.
- ROSTOM A, DUBÉ C, CRANNEY A, et al. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology*, v.128(4 Suppl 1):S38-46, 2005.
- SAPONE A, BAI J.C, CIACCI C, et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med.* v.10, p.13, 2012.
- SCHUMANN M, RICHTER JF, WEDELL I, et al. Mechanisms of epithelial translocation of the α 2-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut*, v.57, n.6, p.747-54, 2008.
- SCHUPPAN D, ZIMMER K. The Diagnosis and Treatment of Celiac Disease. *Dtsch Arztebl Int*, v.110, n.49, p.835–46, 2013.
- SCHUPPAN, D.; JUNKER, Y.; BARISANI, D. Celiac Disease From Pathogenesis to Novel Therapies. *Reviews in Basic and Clinical Gastroenterology. Gastroenterology*, v.137, p.1912–1933, 2009.
- SOLLID L.M. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha-beta heterodimer. *J Exp Med*, v.169, p.345–350, 1989.
- SOLLID L.M, JABRI B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol*, v.13, n.4, p.294-302, 2013.
- SOOD A, MIDHA V, SOOD N, AVASTHI G, SEHGAL A. Prevalence of celiac disease among school children in Punjab, North India. *J Gastroenterol Hepatol*, v.21, n.10, p.1622-5, 2006.
- SPURKLAND, A. et al. Susceptibility to Develop Celiac Disease Is Primarily Associated with HLA-DQ Alleles. *Human Immunology*, v.29, p.157-165, 1990.
- STOKES P.L, ASQUITH P, HOLMES G.K, MACKINTOSH P, COOKE W.T. 1972. Histocompatibility antigens associated with adult coeliac disease. *Lancet*, v.2, p.162–64, 1972.
- TACK, GJ; VERBEEK W; SCHREURS M, MULDER C. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, v.7, n.4, p.204-13, 2010.
- TJON, J.M.; Van BERGEN, J.; KONING, F. Celiac disease how complicated can it get. *Immunogenetics*, v.62, p.641–651, 2010.
- TRYNKA G et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nature Genetics*; v.43, p.1193-1201, 2011.
- TRYNKA, G; WIJMENGA, C; VAN HEEL, D. A genetic perspective on celiac disease. *Trends in Molecular Medicine*, v. 16, n. 11, 2010.

VAN BERGE-HENEGOUWEN G.P, MULDER C.J. Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten free diet. *Gut*. v.34, n.11, p.1473-5, 1993.

VILPPULA A, KAUKINEN K, LUOSTARINEN L, KREKELÄ I, PATRIKAINEN H, VALVE R, MÄKI M, COLLIN P. Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in elderly people: a population-based study. *BMC Gastroenterol*, v.9, p.49, 2009.

VIVES-PI, M.; TAKASAWA, S; PUJOL-AUTONELL, I. et al. Biomarkers for Diagnosis and Monitoring of Celiac Disease. *J Clin Gastroenterol*, v.47, p.308–313, 2013.

WALPORT, MARK; TRAVERS, PAUL; JANEWAY J, CHARLES A. *Imunobiologia de Janeway - 7ª Ed*. Editora: Artmed. São Paulo. Cap 3, pag 125, 2010.

WOLTERS VM, WIJMENGA C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *The American Journal of Gastroenterology*; v.103, n.1, p.190-5, 2008.

8. Anexos

8.1 Anexo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

Seu(sua) filho(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto “**Prevalência dos alelos HLA DQ2 e DQ8 predisponentes para doença celíaca em recém-nascidos no Distrito Federal**”. Para isso, gostaríamos de convidá-la a autorizar a participação do(a) seu(sua) filho(a). Esse projeto é um estudo sobre a doença celíaca, que é uma doença provocada por uma sensibilidade ao glúten. O glúten é uma proteína contida no trigo, cevada e centeio, por isso, quando a pessoa com doença celíaca come pão, biscoito, bolo, massas e outros alimentos que contém glúten, ela pode vir a apresentar manifestações como: diarreia, perda de peso, vômitos, barriga distendida, fraqueza e irritação. A doença celíaca tem ligação com genes chamados HLA DQ2 e DQ8, portanto, se seu(sua) filho(a) apresentar esses genes terá chances de desenvolver a doença celíaca, mas não é certeza, pois muitas pessoas têm esse gene e não são celíacas.

O objetivo desta pesquisa é: encontrar a frequência dos alelos HLA DQ2 e DQ8 em grupo populacional de Brasília. Esses alelos são genes que quase todos os celíacos possuem.

O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome e o do(a) seu(sua) filho(a) não aparecerão, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-los(as).

A participação do(a) seu(sua) filho(a) será através de uma coleta de sangue do cordão umbilical após o parto, que é um procedimento que não causará dor ou desconforto ao seu(sua) filho(a) e que tem risco mínimo para a saúde. O sangue será coletado na Unidade de Neonatologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), na data combinada _____ com um tempo estimado para sua realização: 10 minutos. Informamos que o(a) Senhor(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Os resultados da pesquisa serão divulgados no Laboratório de Pesquisa em Pediatria e Centro de Pesquisa em Doença Celíaca da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, podendo ser publicados posteriormente. No caso do resultado do exame dar positivo, haverá uma assistência continuada pelo médico do Serviço de Gastroenterologia do HUB. A sua recusa em participar da pesquisa não implicará em qualquer prejuízo na prestação da assistência. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de no mínimo cinco anos, após isso serão destruídos ou mantidos na instituição.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Dr. Riccardo Pratesi, no Laboratório de Pesquisa em Pediatria e Centro de Pesquisa em Doença Celíaca da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, telefone: 3107-1988, no horário: entre 8 horas e 18 horas.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou aos direitos do sujeito da pesquisa podem ser obtidos através do telefone: (61) 3107-1918.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com a senhora.

Nome / assinatura

Pesquisador Responsável

Brasília, ____ de _____ de _____

8.2 Anexo II

Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto: 132/2008

Título do Projeto: Rastreamento sorológico e determinação da presença de HLA predisponentes (DQ2 e DQ8) em crianças sem evidência clínica para doença celíaca.

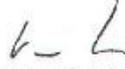
Pesquisadora Responsável: Rodrigo Coutinho de Almeida

Data de entrada: 16/09/2008

Com base nas Resoluções 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto 132/2008 com o título: "Rastreamento sorológico e determinação da presença de HLA predisponentes (DQ2 e DQ8) em crianças sem evidência clínica para doença celíaca", analisado na 9ª Reunião Ordinária realizada no dia 14 de Outubro de 2008.

O pesquisador responsável fica, desde já, notificado da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 21 de Novembro de 2008.


Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP-FS/UnB

8.3 Anexo III



nandacouts . <nandacouts87@gmail.com>

Fwd: Submission Confirmation

1 mensagem

Riccardo Pratesi <pratesir@gmail.com>

26 de novembro de 2013 14:50

Para: Yanna Nobrega <yannanobrega@gmail.com>, "nandacouts ." <nandacouts87@gmail.com>

----- Forwarded message -----

From: **Human Immunology** <js1040@columbia.edu>

Date: 2013/10/15

Subject: Submission Confirmation

To: pratesiunb@gmail.com, pratesir@gmail.com

Dear Pratesi,

Your submission entitled "Prevalence of celiac disease predisposing alleles HLA-DQ2 and -DQ8 in Brazilian newborns" has been received by Human Immunology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/him/>.

Your username is: pratesiunb@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to:

http://ees.elsevier.com/him/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Human Immunology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

8.4 Anexo IV

Prevalence of celiac disease predisposing alleles HLA-DQ2 and -DQ8 in Brazilian newborns

Fernanda Coutinho de Almeida^{2,5}, Lenora Gandolfi^{1,2,3,5}, Karina N. Costa³, Marilucia Rocha de Almeida Picanço³, Lucas Malta Almeida^{2,5}, Yanna Karla de Medeiros Nóbrega^{2,4,5}, Riccardo Pratesi^{1,2,3,5}

¹ Graduate Program in Health Sciences, School of Health Sciences, University of Brasilia, Campus Universitario Darcy Ribeiro, CEP 70.900.910, Brasilia, DF, Brazil

² Graduate Program in Medical Sciences, School of Medicine, University of Brasilia, Campus Universitario Darcy Ribeiro, CEP 70.900.910, Brasilia, DF, Brazil

³ Department of Pediatrics, School of Medicine, University of Brasilia, Campus Universitario Darcy Ribeiro, CEP 70.900.910, Brasilia, DF, Brazil

⁴ Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, University of Brasilia, Campus Universitario Darcy Ribeiro, CEP 70.900.910, Brasilia, DF, Brazil

⁵ Research Center for Celiac Disease, School of Medicine, University of Brasilia, Campus Universitario Darcy Ribeiro, CEP 70.900.910, Brasilia, DF, Brazil

Fernanda Coutinho de Almeida – nandacouts87@gmail.com

Lenora Gandolfi – lenoragandolfi1@gmail.com

Karina N. Costa – knc@terra.com.br

Marilucia Rocha de Almeida Picanço – al.picanco@gmail.com

Lucas Malta Almeida – lucasmalta20@yahoo.com.br

Yanna Karla de Medeiros Nóbrega – yannanobrega@gmail.com

Riccardo Pratesi – pratesiunb@gmail.com

Abstract

Forty percent of the genetic susceptibility to celiac disease (CD) is associated with class II HLA-DQ2 and -DQ8 genes, with the other 60% being shared by an unknown number of non-HLA genes. The prevalence of DQ2 and DQ8 genes has shown significant variations among different world regions and has not been previously determined among the highly interbred Brazilian population. We typed DQ2 and DQ8 genes in 329 newborns using qPCR and confirmed the results using a PCR-SSP kit. The prevalence of DQ2 and/or DQ8 heterodimers was 33.44%, which is comparable to results obtained in European screening studies. However, only considering the presence of at least one of the CD predisposing alleles, an increased percentage of high-risk alleles could be observed among the Brazilian newborns. In conclusion, the prevalence of DQ2 and/or DQ8 heterodimers in our population can be considered comparable to that observed in Italian population screening studies, although the prevalence of high-risk susceptible alleles is increased among Brazilian subjects. Additionally, an increased prevalence of CD has not been observed in screening performed in this same city focusing on a similar ethnic and socioeconomically comparable population. Possibly the lower consumption of gluten in Brazilian staple diet could partially explain this discrepancy.

Key-words: Celiac disease, prevalence, HLA-DQ genes, newborn, Brazilian population.

Introduction

Celiac disease (CD) is an immune-mediated inflammatory disease of the small intestine that is mainly triggered and maintained by the storage proteins (gluten) of wheat, barley, and rye in genetically predisposed individuals [1]. Accurate epidemiologic studies have disclosed that CD affects approximately 1% of the general population, both in Europe and North America [2, 3]. The prevalence of CD in developing countries has shown significant variations, being rare in some and very common in others [4] most likely due to the difference in wheat consumption and the frequency of specific HLA class II MHC molecules in different populations [5]. Screening studies in Brazil have shown uneven CD prevalence rates in different regions of the country, ranging from 1:119 to 1:417 in the general population [6, 7] and 1:214 to 1:681 in presumably healthy blood donors [8, 9].

Genetic susceptibility to CD is associated with class II HLA DQ2 (DQA1*05:01 and DQB1*02:01) and DQ8 (DQA1*03:01 and DQB1*03:02) alleles [10]. Approximately 95% of

celiac patients carry the HLA-DQ2 alleles, and the remaining 5% carry HLA-DQ8 [11]. These genes are responsible for only 40% of the familiar risk of CD but are also carried by roughly a third of the population [10, 12], thus suggesting that HLA is only partly the cause of the condition. The other 60% of the genetic susceptibility to CD is shared between an unknown number of non-HLA genes, each of which is estimated to contribute only with a small risk effect [13].

The prevalence of DQ2 and DQ8 genes has also shown significant variations among different populations [14]. Screening to determine the prevalence of CD predisposing alleles in the Brazilian population has not been previously performed. Consequently, the aim of the present study was to determine the prevalence of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 alleles in a representative group of newborns in the city of Brasilia, Brazil.

Methods

Ethics Statement

The study complied with the principles of the latest Declaration of Helsinki (2008) and was approved by the Research Ethics Committee on Medical Sciences of the University of Brasilia School of Medicine (protocol nº 132/2008).

Study population

Mothers-to-be admitted to the maternity ward of the Brasilia University Hospital during the period February 2012 to March 2013 received extensive exposition of the research objectives and provided written consent for the participation of their forthcoming newborns in the study protocol. The Brasilia University Hospital is a general hospital pertaining to the Brazilian Unified Health System that mainly attends to a low-income class population originating from different neighborhoods and the outskirts of the city of Brasilia. All newborns were eligible for screening; however, newborns with low birth weight, prematurity, or severe congenital abnormalities were excluded from the study to avoid overburdening the medical team with additional tasks during difficult deliveries. At the time of birth, immediately after the collection of umbilical cord blood (UCB) samples for blood group typing, a second sterile EDTA-coated tube was filled with approximately 10 ml of the newborn blood. DNA extraction was performed within the first 48 hours after collection using an Illustra™ Blood genomic Prep

Mini Spin kit (Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to the manufacturer's instructions. Concentrations of DNA samples were adjusted to 15 ng/ μ g after being quantified at 260 nm using the Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

qPCR HLA-DQ typing

DQA1*05:01, DQB1*02:01 (DQ2) and DQA1*03:01, DQB1*03:02 (DQ8) amplification was performed using qPCR (Step One Real Time PCR System; Applied Biosystems, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA). Hybridization was accomplished using sequence-specific primers for DQA1*05:01, DQB1*02:01 and DQA1*03:01 as described by Olerup *et al* [15], and primers for DQB1*03:02 as described by Profaizer *et al* [16]. Primers for human growth factor (HGF) hormone were used as an internal control [16]. Each primer was used at a concentration of 10 μ M.

Four separate reactions were performed to test each allele individually. Reactions for HLA-DQ alleles were mixed as follows: 1 μ L of 5'DQ-specific primer, 1 μ L of 3'DQ-specific primer, 10 μ L of Absolute qPCR SYBR Green Rox Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., Vilnius, Lithuania), 2 μ L of genomic DNA and 6 μ L of ultra-pure water (Thermo Fisher Scientific Inc., Vilnius, Lithuania) for a total volume of 20 μ L per reaction. Reactions for the HGF control samples were mixed as follows: 1 μ L of 5'HGF-specific primer, 1 μ L of 3'HGF-specific primer, 10 μ L of Absolute qPCR SYBR Green Rox Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., Vilnius, Lithuania), 2 μ L of genomic DNA and 6 μ L of ultra-pure water (Thermo Fisher Scientific Inc., Vilnius, Lithuania) for a total volume of 20 μ L per reaction. The PCR reactions were added to a 48-well plate (Applied BioSystems, Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA) and then centrifuged for 1 min at 1300 rpm. The plate was loaded onto the Step-One Instrument (Applied BioSystems - Life Technologies™, Carlsbad, CA, USA). Table 1 describes the specific qPCR conditions. A known positive sample was used as a control for each experiment. Additionally, a negative DNA sample was run in each reaction as a control for contamination. Amplified products were analyzed using a melting curve (Table 1).

Table 1

Typing of the DQB1*03:02 allele was performed using a touchdown technique [17], employing an initial annealing temperature above the projected melting temperature with

progressive transition to lower temperatures over the course of successive cycles as described by Profaizer et al [16].

PCR-SSP HLA-DQ typing

All positive samples obtained on the previous qPCR typing additionally underwent further testing using the DQ-CD Typing Kit Plus (BioDiagene, Palermo, Italy) according to the manufacturer's recommendations. The DQ2 heterodimer was identified by the presence of the alleles DQA1*05:01 and DQB1*02:01, and the DQ8 heterodimer was identified by the presence of DQA1*03:01 and DQB1*03:02. DQ2 alleles are commonly found in the haplotype DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02 (in *cis*) or in the haplotypes DRB1*11/12-DQA1*05-DQB1*03:01/04; DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02 (in *trans*). DQ8 alleles are found in the DQ8 haplotype DRB1*04-DQA1*03-DQB1*03:02 (in *cis*). Furthermore, the kit contains primers for the identification of DQB1*02 allele homozygosis.

Statistical methods

Data analysis was performed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. Chicago: SPSS Inc, U.S.A.) and Microsoft Office Excel 2010.

Results

Of a total of 329 newborns admitted to the study (143 males and 186 females), 187 (56.84%) (77 males and 110 females) disclosed HLA predisposing alleles. Analysis of the results showed 5 (1.52%) newborns carrying both DQ2 and DQ8 heterodimers, 58 (17.63%) were positive for DQ2 (DQA1*05 and DQB1*02), and 47 (14.29%) were positive for DQ8 (DQA1*03 and DQB1*03:02). Table 2 shows the prevalence of CD predisposing HLA alleles using qPCR.

Table 2

Results obtained by qPCR technique were confirmed by the PCR-SSP method that, in addition to the identification of the four alleles previously tested, also detected DQB1*02 homozygosis and allowed the differentiation of the haplotype combinations in *cis* and *trans*.

The results of five samples in which both DQ2 and DQ8 heterodimers were detected by qPCR were also confirmed by the PCR-SSP method. Furthermore, no disagreement was observed between the results obtained using the two techniques among the 58 newborns

characterized by the presence of a single DQ2 heterodimer. However, applying the PCR-SSP method made it possible to detect homozygosis of the DQ2 β -chain (DQB1*02/02) in 18 newborns, and heterozygosis of the same chain in 40 newborns (DQB1*02/x) (Table 3).

Table 3

A total of 77 samples showed incomplete DQ2 (Table 2). The chain α DQ2 (DQA1*05) was identified in 43 samples by qPCR and was confirmed by the PCR-SSP kit (DQ-CD Typing Plus), which additionally detected the chain β DQ2 as DQB1*0301/04 (Table 2). Similarly, in the remaining 34 samples, also showing incomplete DQ2 by qPCR and characterized by the single presence of the chain β DQ2 (DQB1*02), the use of the PCR-SSP kit (DQ-CD Typing Plus) allowed the identification of α DQ2 as DQA1*02:01, and the determination of homozygosis in four β DQ2 samples (DQB1*02/02) and heterozygosis of the other 30 β DQ2 samples (DQB1 * 02/x) (Table 3).

Of 47 samples that disclosed DQ8 alleles, 37 showed $\alpha\beta$ DQ8 (DQA1*03 and DQB1*03:02), and the other 10 showed the same alleles in association with the chain β DQ2 (DQB1*02). These results were similar using both qPCR and PCR-SSP methods (Tables 2 and 3).

Among the 58 neonates who were exclusively positive for the DQ2 heterodimer, encoded by DQA1*05 and DQB1*02 alleles, 42 disclosed these alleles in the *cis* configuration (DRB1*03- DQA1*05-DQB1*02) and 16 in *trans* configuration on DR5/DR7 haplotypes (DRB1*11/12-DQA1*05-DQB1*03:01/04; DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02).

Discussion

As formerly mentioned, we could not identify any previous screening study to determine the prevalence of CD predisposing alleles in the Brazilian population. We performed the current study using UCB obtained at the time of delivery from a group of unselected newborns. Collection of UCB for screening of HLA markers in newborns has been previously successfully used in research studies, including large screening programs, to determine the genetic risk for diabetes type 1 [18, 19]. Using a careful collecting technique, the chance of maternal blood contamination is negligible [20].

Because we used primers that were originally designed to be used with the PCR-SSP method [15], all qPCR results were confirmed using a PCR-SSP commercial kit. The qPCR-based typing system, despite its incapability to determine DQB1*02 allele homozygosis, proved

to be highly reliable with no discordant results compared with the results obtained with the PCR-SSP method.

In the current study, the prevalence of all the HLA-DQ2 (DQA1*05:01, DQB1*02:01) and/or DQ8 (DQA1*03, DQB1*03:02) alleles was 33.44%, which can be considered comparable to results obtained in the European population in which different studies showed a prevalence between 20 and 30% [21, 22]. However, according to Table 4, if we consider the presence of at least one of the HLA predisposing alleles (DQA1*05, DQB1*02, DQA1*03, DQB1*03:02), an increased percentage of several CD high-risk predisposing alleles can be observed among the Brazilian newborns compared with 292 healthy Italian subjects recently analyzed by Megiorni et al [21] (Table 4).

Table 4

This difference in the prevalence of specific alleles may be explained by the high degree of heterogeneity of the Brazilian population resulting from five centuries of interbreeding among peoples of three ethnicities: Amerindians, Europeans and Africans. In addition to this initial ethnic contribution, during the last two centuries, successive migratory waves, mainly comprising Italians, Spaniards, Germans, Japanese, Lebanese, and Syrians, further increased the racial diversity of the population. Consequently, each Brazilian has a singular, and quite individual, proportion of these ethnic origins, which hampers his/her precise characterization in a specific racial group [23]. Confirming the genetic heterogeneity of the Brazilian population using an analysis of ancestry informative markers from individuals derived by birth from the five geopolitical Brazilian regions Lins et al [24] disclosed a major contribution of European ancestry (0.771) followed by African (0.143) and Amerindian (0.085) ancestries. The current population of Brasilia can be considered a fairly representative sampling of the Brazilian population at large since, during the more than fifty years that have elapsed from its foundation, this city, with more than 2,500,000 inhabitants presently, harbors people to a minor or major degree who have originated from all the different regions of Brazil.

The finding of an increased prevalence of risk alleles in our population was an unexpected result because the CD prevalence in Brazil, as shown by several screening studies performed in different regions of the country [6, 8, 9] although expressive, is generally lower than the prevalence found in Europe. In a previous study in Brasilia, and with a similar

population sample, we found a CD prevalence of 0.34% (1:294) [7]. We tentatively suggest that this discrepancy between the presence of an increased genetic risk and a lower prevalence of CD in our population could be partially explained by a lower consumption of gluten in Brazil. The main Brazilian staple foods are rice and beans. Consequently, the intake of wheat is not very high (53.5 kg/year per capita), well below the Italian per capita supply that reaches 144.2 kg/year [25]. Another possible reason that we had already suggested in our aforementioned article is the existence of an increased mortality due to undiagnosed CD among the younger age groups.

This study possessed limitations. Although contamination of NB samples by maternal blood did not appear to be a significant problem, its exact frequency should be determined in the future by retyping the HLA-DQ2 and -DQ8 genotypes from blood samples obtained directly from the child [20]. Additionally, although the population of Brasilia can be considered a good representation of the Brazilian population at large, this is only partially true because the contribution of people coming from the Midwestern and Northeastern regions of Brazil in which the influence of Afro-descendants and Amerindians prevail is increased compared with people originating from the Southern states of Brazil [26, 27].

In conclusion, the prevalence of CD predisposing HLA-alleles in our group of Brazilian newborns is similar to that observed in the Italian population, although the frequency of high-risk HLA genotypes is apparently increased among Brazilian subjects. However, an increased prevalence of CD has not been observed in screening performed in Brasilia, focusing on a similar ethnic and socioeconomically comparable population [7]. The cause may be the lower consumption of gluten-containing cereals by the Brazilian population.

Reference:

1. Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology* 2009;137:1912-33.
2. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, *et al.* Coeliac EU Cluster, Project Epidemiology. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med* 2010;42:587-95.
3. Catassi C, Kryszak D, Louis-Jacques O, Duerksen DR, Hill I, Crowe SE, *et al.* Detection of Celiac disease in primary care: a multicenter case-finding study in North America. *Am J Gastroenterol* 2007;102:1454-60.

4. Cataldo F, Montalto G. Celiac disease in the developing countries: a new and challenging public health problem. *World J Gastroenterol* 2007;13:2153-9.
5. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 2011;29:493-525.
6. Crovella S, Brandão L, Guimarães R, de Lima Filho JL, Arraes LC, Ventura A *et al.* Speeding up coeliac disease diagnosis in developing countries. *Dig Liver Dis* 2007;39:900-2.
7. Pratesi R, Gandolfi L, Garcia SG, Modelli IC, Lopes de Almeida P, Bocca AL, *et al.* Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 747-50.
8. Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA, Cortez AJ, Carvalho FO, Bordin JO, *et al.* High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007;19: 43-9.
9. Gandolfi L, Pratesi R, Cordoba JC, Tauil PL, Gasparin M, Catassi C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol* 2000;95: 689-92.
10. Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med* 1989;169:345-50.
11. Karrel K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, *et al.* HLA Types in Celiac Disease Patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) Heterodimer: Results From the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Human Immunology* 2003;64:469-77.
12. Megiorni F, Pizzuti A. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *J Biomed Sci* 2012; 19:88.
13. Van Belzen MJ, Koeleman BP, Crusius JB, Meijer JW, Bardoel AF, Pearson PL, *et al.* Defining the contribution of the HLA region to cis DQ2-positive coeliac disease patients. *Genes Immun* 2004;5:215-20.
14. Catassi C, Yachha SK. The global village of celiac disease. In: Fasano A, Troncone R, Branski D, editors. *Frontiers in coeliac disease. Pediatr Adolesc Med*, vol. 12. Basel: Karger 2008. p. 23–31.

15. Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 1993;41:119-34.
16. Profaizer T, Eckels D, Delgado JC. Celiac disease and HLA typing using real-time PCR with melting curve analysis. *Tissue Antigens* 2011;78:31-7.
17. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc* 2008; 3:1452-6.
18. Berzina L, Shtauvere-Brameus A, Ludvigsson J, Sanjeevi CB. Newborn screening for high-risk human leukocyte antigen markers associated with insulin-dependent diabetes mellitus: the ABIS study. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 958:312-6.
19. Emery LM, Babu S, Bugawan TL, Norris JM, Erlich HA, Eisenbarth GS, *et al.* Newborn HLA-DR,DQ genotype screening: age- and ethnicity-specific type 1 diabetes risk estimates. *Pediatr Diabetes* 2005; 6:136-44.
20. Rewers M, Bugawan TL, Norris JM, Blair A, Beaty B, Hoffman M, *et al.* Newborn screening for HLA markers associated with IDDM: diabetes autoimmunity study in the young (DAISY). *Diabetologia* 1996;39: 807-12.
21. Megiorni F, Mora B, Bonamico M, Barbato M, Nenna R, Maiella G, *et al.* HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Hum Immunol* 2009;70:55-9.
22. Wolters VM, Wijmenga C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am J Gastroenterol* 2008;103:190-5.
23. Pena SD, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Braz J Med Biol Res* 2009;42:870-6.
24. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol* 2010;22:187-92.
25. Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAOSTAT. Available from: http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/FB/*/E [Accessed 30 July, 2013]

26. Godinho NMO, Gontijo CC, Diniz MECG, Falcão-Alencar G, Dalton GC, Amorim CEG, Barcelos RSS, Klautau-Guimarães MN, Oliveira SF. Regional patterns of genetic admixture in South America. *F Sci Int: Genetics Supplement Series* 2008. 1:329–330

27. IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Censo 2010. Available from: <http://censo2010.ibge.gov.br/> [Accessed 12 August,2013]

Table 1. Specific qPCR cycling conditions for alleles DQA1*05:01, DQB1*02:02 and DQA1*03:01.

Step	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	95° C	10 min	1
Denaturation	95° C	15 sec	32
Hybridization and extension	60° C	60 sec	
Melt curve - step 1	95° C	15 sec	1
Melt curve - step 2	60° C	60 sec	
Melt curve - step 3	95° C	15 secs	

Table 2 - Prevalence of CD predisposing HLA alleles in 187 (56.84%) of 329 newborn study participants using qPCR.

Genotype	Heterodimer	Alleles	N	Prevalence	Total
DQ2 and DQ8	$\alpha\beta$ DQ2 $\alpha\beta$ DQ8	α DQ2(DQA1*05) β DQ2(DQB1*02) α DQ8(DQA1*03) β DQ8(DQB1*03:02)	5	1,52%	1.52%
DQ2	$\alpha\beta$ DQ2	α DQ2(DQA1*05) β DQ2(DQB1*02)	58	17.63%	17.63%
Incomplete DQ2	α DQ2	α DQ2(DQA1*05) β DQ2 (X)	43	13.07%	23.40%
	β DQ2	α DQ2 (X) β DQ2(DQB1*02)	34	10.33%	
DQ8	$\alpha\beta$ DQ8	α DQ8(DQA1*03) β DQ8(DQB1*03:02)	37	11.25%	14.29%
DQ8 and Incomplete DQ2	$\alpha\beta$ DQ8	α DQ8(DQA1*03) β DQ8(DQB1*03:02)	10	3.04%	
	β DQ2	β DQ2(DQB1*02)			
Total			187	56.84%	56.84%

X = unidentified chain.

Table 3 - Prevalence of CD predisposing HLA alleles found in 187 (56.84%) of the total study group of 329 newborns using the PCR-SSP technique (Biodiagene DQ-CD Typing Plus kit).

Genotype	Heterodimer	Alleles	N	Prevalence	Total
DQ2 and DQ8	$\alpha\beta$ DQ2 $\alpha\beta$ DQ8	α DQ2(DQA1*05) β DQ2(DQB1*02) α DQ8(DQA1*03) β DQ8(DQB1*03:02)	5	1,52%	1.52 %
DQ2	$\alpha\beta$ DQ2 (β homozygous)	α DQ2(DQA1*05) β DQ2(DQB1*02/02)	18	5.47%	17.63%
	$\alpha\beta$ DQ2 (β eterozygous)	α DQ2(DQA1*05) β DQ2(DQB1*02/x)	40	12.16%	
Incomplete DQ2	α DQ2 β DQ2 [≠]	α DQ2(DQA1*05) β DQ2(DQB1*03:01/ 04)	43	13.07%	23.40%
	α DQ2 [≠] (β DQ2 homozygous)	α DQ2 (DQA1*02:01) β DQ2(DQB1*02/02)	4	1.22%	
	α DQ2 [≠] (β DQ2 heterozygous)	α DQ2(DQA1*02:01) β DQ2(DQB1*02/x)	30	9.12%	
DQ8	$\alpha\beta$ DQ8	α DQ8(DQA1*03) β DQ8(DQB1*03:02)	37	11.25%	14.29%
DQ8 complete and DQ2 incomplete	$\alpha\beta$ DQ8 + β DQ2	α DQ8(DQA1*03) β DQ8(DQB1*0302) β DQ2(DQB1*02)	10	3.04%	
Total			187	56.84%	56.84%

X = unidentified chain; [≠] identify a DQ2 heterodimer not associated with CD predisposition.

Table 4. Comparison between the prevalence (%) of HLA predisposing alleles for CD in 329 Brazilian newborns and 292 healthy Italian subjects

	Italy	Brazil
$\alpha\beta$ DQ2/ $\alpha\beta$ DQ8	0.2 %	1.5 %
$\alpha\beta$ DQ2/ β homozygous	2.4%	5.4%
$\alpha\beta$ D8/ β DQ2	0.7%	3.0%
β DQ2	0.4%	1.2%
$\alpha\beta$ DQ2/ β heterozygous	19.2%	12.1%
$\alpha\beta$ DQ8	6.5%	11.2%
β DQ2 heterozygous	9.7%	9.2%
α DQ2	37.9%	13.0%
Other	23.0%	43.1%