

**Lucas Malta Almeida**

**ANÁLISE DO RISCO GENÉTICO ASSOCIADO À PRESENÇA DE  
ALELOS HLA-DQ EM PACIENTES COM DOENÇA CELÍACA.**

**Brasília, 2016**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

TESE DE DOUTORADO

**Análise do risco genético associado à presença de alelos HLA-DQ em  
pacientes com Doença Celíaca.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

**Lucas Malta Almeida**

**Orientadora: Profa. Dra. Lenora Gandolfi**

**Coorientadora: Profa. Dra. Yanna Karla de  
Medeiros Nóbrega**

**Brasília, 2016**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

Tese de Doutorado

## **Análise do risco genético associado à presença de alelos HLA-DQ em pacientes com Doença Celíaca.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

**Lucas Malta Almeida**

Banca Examinadora:

Presidente: Profa. Dra. Lenora Gandolfi, FM/UnB;

Membro: Prof. Dr. Luiz Cláudio Gonçalves de Castro, FM/FS/UnB;

Membro: Profa. Dra. Nadjar Nitz Silva Lociks de Araújo, FM/UnB;

Membro: Profa. Dra. Angélica Amorim Amato, FS/UnB;

Membro: Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira, UCB;

Suplente: Profa. Dra. Mariana Machado Hecht, FM/UnB.

**Brasília, 2016**

Dedico este trabalho...

Aos meus pais Nascimento e Joelice, porque um dia sonharam que seus filhos poderiam ir muito longe e, hoje, veem a concretização dos seus sonhos, fazendo parte desta realidade.

Aos meus irmãos Társis e Dener pelo apoio, companheirismo e amizade ao longo de tantos anos de convivência.

À minha querida esposa e amiga Indiara (*in memoriam*), que trouxe todas as facilidades necessárias para que este trabalho fosse desenvolvido e que lutou e conseguiu, com êxito, vencer a grande batalha de viver. Descanse com o nosso Senhor Deus.

Ao meu querido Lorenzo, filho meu, que me agracia todos os dias com um lindo sorriso e dizendo “Papai”.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço sempre ao bom e misericordioso Deus, que nos surpreende com tantas maravilhas e obras de suas mãos, que me susteve com sua mão forte quando em mim não restava mais forças para concluir o que havia começado e que hoje me ergue para viver o que ainda virá.

Agradeço ao Laboratório de Biociências por ter disponibilizado todas as facilidades que eram necessárias ao bom desempenho do curso de doutorado.

Agradeço, de forma especial, aos professores Lenora Gandolfi, Riccardo Pratesi e Yanna Karla Nóbrega por terem acreditado que o trabalho seria começado e terminado e, ainda, por terem boa disposição de serem verdadeiros orientadores. Hoje posso dizer que, mais do que bons orientadores, são pessoas de bem, que auxiliam na formação de pessoas e que têm se tornado importantes amigos.

Agradeço a equipe da Pós-Graduação em Ciências Médicas da UnB pelo compromisso com a qualidade do curso, pela prontidão em solucionar os problemas enfrentados pelos alunos e pela bela organização que possuem.

Agradeço aos membros e amigos da Assembleia de Deus em Sobradinho (ADS), pelo apoio em momentos difíceis e pela excelente parceria.

Agradeço aos meus sogros Abinélio e Maria de Fátima, pela impagável ajuda nos cuidados com meu filho, o que possibilitou a concretização deste trabalho.

Agradeço a todos os alunos, ex-alunos e funcionários do Laboratório de Biociências, com os quais convivi, por terem sido, sempre, solícitos e amigáveis no convívio diário. Agradeço, de forma especial, à Fernanda C. de Almeida, Nicole Selleski e Rosa H. Uenishi pela prontidão em desempenhar vários trabalhos e análises necessários ao bom desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pelo apoio financeiro fornecido, o qual possibilita que nós, bolsistas, consigamos ter mais tempo de qualidade para desempenhar os trabalhos propostos nas pós-graduações.

Agradeço à equipe do Centro de Educação Profissional - Escola Técnica de Saúde de Planaltina-DF pelo apoio prestado durante a realização e finalização do curso de doutorado.

<b>Sumário.....</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de tabelas.....</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de siglas e abreviaturas.....</b>	<b>X</b>
<b>Lista de figuras.....</b>	<b>XII</b>

## SUMÁRIO

<b>1. Resumo.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Abstract.....</b>	<b>14</b>
<b>3. Introdução.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Histórico.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Doença Celíaca.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. Sinais e Sintomas.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4. Associação com Doenças Autoimunes.....</b>	<b>17</b>
<b>3.5. Associação com Síndromes Genéticas.....</b>	<b>18</b>
<b>3.6. Prevalência.....</b>	<b>18</b>
<b>3.6.1. Prevalência Européia.....</b>	<b>19</b>
<b>3.6.2. Prevalência Oriente Médio e Norte da África.....</b>	<b>19</b>
<b>3.6.3. Prevalência na Ásia e Oceania.....</b>	<b>20</b>
<b>3.6.4. Prevalência na América do Norte e América Central.....</b>	<b>20</b>
<b>3.6.5. Prevalência na América do Sul.....</b>	<b>20</b>
<b>3.7. Imunopatologia.....</b>	<b>21</b>
<b>3.7.1. Glúten – “Gatilho ambiental de desenvolvimento da DC”.....</b>	<b>21</b>
<b>3.7.2. Processo Imunopatológico.....</b>	<b>23</b>
<b>3.8. Diagnóstico da DC.....</b>	<b>26</b>
<b>3.8.1. Sorologia.....</b>	<b>34</b>
<b>3.9. Patologia.....</b>	<b>37</b>
<b>3.9.1. Tratamento proposto para DC.....</b>	<b>29</b>
<b>3.10. Genética, Imunogenética e Doença Celíaca.....</b>	<b>29</b>
<b>3.10.1. Complexo Principal de Histocompatibilidade.....</b>	<b>29</b>
<b>3.10.2. Alelos HLA-DQ predisponentes à DC.....</b>	<b>30</b>
<b>3.10.3. Determinação de alelos HLA.....</b>	<b>33</b>
<b>3.10.4. Risco genético associado à HLA-DQ2 e HLA-DQ8.....</b>	<b>35</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>37</b>
<b>4.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>37</b>
<b>5. Metodologia.....</b>	<b>38</b>
<b>5.1. Aprovação da Pesquisa.....</b>	<b>38</b>

5.2. Pacientes celíacos e controles.....	38
5.3. Coleta, processamento e armazenamento de material biológico.....	39
5.4. Pesquisa de anticorpos IgA anti-transglutaminase humana (IgA-htTG) – ELISA.....	39
5.5. Pesquisa de anticorpos IgA anti-endomísio (IgA-EMA) – Imunofluorescência Indireta.....	40
5.6. Extração de DNA.....	41
5.7. Análise do DNA extraído.....	42
5.8. Genotipagem de alelos HLA-DQ predisponentes à DC.....	42
5.8.1. Pesquisa de alelos HLA-DQ por qPCR.....	42
5.8.2. Pesquisa de alelos HLA-DQ por Reação em Cadeia de Polimerase sequência específico (PCR-SSP).....	45
5.9. Análise Estatística.....	46
5.10. Nomenclatura.....	46
6. Resultados.....	47
6.1. Resultados gerados em PCR em tempo real (qPCR).....	51
6.2. Resultados gerados por meio do <i>Kit</i> DQ-CD Typing Plus (BioDiagene®, Palermo, Italy).....	52
6.3. Combinações alélicas não esperadas dentro de haplótipos e suas inclusões em categorias HLA-DQ.....	55
6.4. Risco genético baseado em alelos HLA-DQ predisponentes à DC.....	56
7. Discussão.....	58
8. Conclusões.....	72
9. Perspectivas.....	73
10. Referências Bibliográficas.....	74
11. Anexo I.....	87



## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Principais manifestações gastrointestinais e não gastrointestinais encontradas em celíacos sintomáticos e principais autoimunidades e doenças genéticas.

**Tabela 2** – Esquema simplificado de classificação histopatológica de biópsias intestinais de pacientes com DC.

**Tabela 3** – *Primers* para alelos HLA-DQ e do gene HGH, suas sequências, conteúdo das bases GC, tamanho do fragmento em pares de base (pb) e respectivas temperatura de dissociação.

**Tabela 4** – Condições de temperatura, tempo e quantidade de ciclos programados em qPCR para amplificação de alelos HLA-DQ associados com a Doença Celíaca e do gene HGH.

**Tabela 5** - Condições de temperatura, tempo e quantidade de ciclos programados em qPCR para amplificação do alelo DQB1\*03:02 que codifica a cadeia  $\beta$  da molécula de MHC-II DQ8.

**Tabela 6** – Frequência e porcentagem de genótipos HLA-DQ associados com a Doença Celíaca em pacientes e controles.

**Tabela 7** – Frequências HLA-DQ predisponentes à DC em pacientes e controles, valor de  $p$  e risco geral de desenvolvimento da DC baseado em prevalência presumida de 1:100.

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

- APCs – Células apresentadoras de antígenos
- AGA – Anticorpos anti-gliadina
- DC – Doença Celíaca
- DMI – Diabetes *Mellitus* do Tipo I
- DQ2 – Família de genótipos HLA que inclui, dentre outros, HLA-DQ2.5 e HLA-DQ2.2
- DQA1\*05 – Família de alelos HLA que engloba, dentre outros, DQA1\*05:01 e DQA1\*05:05
- DQA1\*03 – Família de alelos HLA que engloba, dentre outros, DQA1\*03:01
- DQB1\*02 – Família de alelos HLA que engloba, dentre outros, DQB1\*02:01 e DQB1\*02:02
- ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*
- E – Ácido Glutâmico ou Glutamato
- HLA – Antígeno Leucocitário Humano
- htTG – Transglutaminase tecidual humana recombinante
- IEL – Linfócitos intraepiteliais
- IFN- $\alpha$  – Interferon alfa
- IFN- $\lambda$  – Interferon gamma
- IgA – Anticorpo da classe IgA
- IgG – Anticorpo da classe IgG
- IgA-htTG2 – Anticorpo IgA anti-trasnglutaminase humana 2
- IgA-EMA – Anticorpos IgA anti-endomísio
- IL – Interleucina
- IL-15 – Interleucina 15
- IL-21 – Interleucina 21
- MHC I – Complexo principal de histocompatibilidade de classe I
- MHC II – Complexo principal de histocompatibilidade de classe II
- PCR – Reação em Cadeia de Polimerase
- PCR-SSP – Reação em cadeia de polimerase sequência-específico
- PCR-SSOPH – Reação em cadeia de polimerase com posterior hibridização com oligonucleotídeos sequência-específicos (sondas)
- Q – Glutamina
- qPCR – Reação em cadeia de Polimerase quantitativa

SBT – Genotipagem por sequenciamento

SD – Síndrome de Down

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

ST – Síndrome de Turner

TCR – Receptor de células T

TGF – Fator de transformação do crescimento

TH1 – Células T *helper* 1

TH2 – Células T *helper* 2

TNF – Fator de necrose tumoral

tTG – Enzima Transglutaminase

tTG2 – Enzima Transglutaminase tecidual 2

UV – Luz Ultravioleta

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Fragmentos  $\gamma$ -gliadina ligados nas fendas P1, P4 e P9 do HLA-DQ2 e DQ8.

**Figura 2** – Modelo imunopatológico da DC mostrando a integração de células e genes descritos por *Genomic Wide Association* (GWAS) com os passos imunopatológicos descritos para a DC.

**Figura 3** – Cortes criostáticos transversais de esôfago de macaco *Rhesus* fixados em lâmina (Inova Diagnostics, *Werfen company*) e incubados com soro sanguíneo (diluição 1:5 em tampão PBS) para detecção de anticorpos IgA ou IgG.

**Figura 4** - Biópsias de mucosa intestinal evidenciando a progressão das mudanças que ocorrem nas vilosidades intestinais.

**Figura 5** – Antígeno Leucocitário Humano (HLA) associado com a Doença Celíaca.

**Figura 6** – Curva de dissociação de produtos de qPCR gerados a partir de *primers* usados na pesquisa.

**Figura 7** – Resultado da análise de DNA genômico humano quanto à presença ou ausência de alelos HLA-DQ e HLA-DR predisponentes à DC e quanto à homozigose do alelo DQB1\*02.

**Figura 8** – Gráfico de risco baseado em combinação haplotípica de alelos HLA-DQ predisponentes à DC considerando prevalência presumida de 1:100.

## 1. RESUMO

**Introdução:** O desenvolvimento da Doença Celíaca (DC) está fortemente relacionado à presença de HLA-DQ2.5, -DQ2.2 e -DQ8. Há poucos dados sobre a distribuição desses alelos em pacientes celíacos e na população geral no Brasil e não há informação sobre seu uso clínico. A ausência deles torna pouco provável o desenvolvimento da DC. Assim, para levantar dados consistentes sobre a frequência de alelos HLA-DQ predisponentes à DC e sugerir risco genético de desenvolver a DC, realizamos este estudo caso-controle. **Metodologia:** 237 pacientes celíacos e 237 controles (ambos os grupos com 164 mulheres) foram testados quanto à presença de anticorpos anti-transglutaminase (tTG-IgA) e anti-endomísio (EMA-IgA) e genotipados quanto à presença dos alelos HLA-DQ predisponentes à DC utilizando qPCR e *kit* comercial. As frequências de HLA-DQ2.5, -DQ2.2 e -DQ8 entre pacientes celíacos e controles foi comparada (teste de Fischer e teste do qui-quadrado). Os resultados foram considerados significantes quando  $p < 0.05$ . O risco foi apresentado como 1:N para cada uma das categorias HLA-DQ descritas neste estudo. **Resultados:** Os resultados de qPCR foram 100 % concordantes com aqueles gerados por *kit* comercial. HLA-DQ2.5 e/ou HLA-DQ8 foi detectado em 224 pacientes (94,5 %) e em 84 controles (35,4 %). Oito celíacos (3,4 %) e 38 controles (16 %) possuíam exclusivamente HLA-DQ2.2. HLA-DQ2.5, sem HLA-DQ8, foi encontrado em 178 celíacos (75,1 %) e 38 controles (16 %). HLA-DQ8, sem outros alelos HLA-DQ predisponentes à DC, estava presente em dez celíacos (4,2 %) e em 36 controles (15,2 %). Indivíduos que possuem apenas DQA1\*05 ou DQA1\*03 ou não possuem alelos predisponentes à DC somam, juntos, 5 celíacos (2,1 %) e 115 controles (48,4 %). Os riscos genéticos variaram entre 1:7 a 1:3014 sendo que HLA-DQ2.5/DQ2.5, HLA-DQ2.5/DQ2.2 e HLA-DQ2.5/DQ8 predispõem mais ao desenvolvimento da DC. Embora HLA-DQ2.2 tenha baixo risco de desencadear a DC (1:251, homozigose e 1:550, heterozigose com HLA-DQ  $\neq$  HLA-DQ2.5 e HLA-DQ8), quando associado a HLA-DQ2.5 mostra o segundo maior risco de desenvolvê-la (1:10;  $p < 0.0001$ ). **Conclusões:** O estudo permitiu gerar dados significantes sobre a frequência de HLA-DQ2.5, -DQ2.2, e -DQ8 em grupo populacional representativo de pacientes celíacos e controles do Distrito Federal, Brasil, e estabelecer um gradiente de risco baseado em alelos HLA-DQ aplicável à população brasileira.

**Palavras chaves:** Doença Celíaca, Genética, Risco Genético, HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2, HLA-DQ8, Frequência

## 2. ABSTRACT

**Introduction:** Celiac Disease (CD) development is strongly related to HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 and HLA-DQ8 genotypes. In Brazilian population, few studies have described the frequency of these genotypes. All of them have just used few cases and no clinical use was attributed to this information. DC is unlikely in people without predisposing genotypes. In order to establish the frequency of HLA-DQ predisposing alleles to CD and a risk gradient related to HLA-DQ, this case-control study was developed. **Methodology:** 237 celiac and 237 controls were tested to IgA-htTG and IgA-EMA (both groups with 164 females and 73 males). All of them were genotyped for CD predisposing genotypes/alleles HLA-DQ by qPCR and commercial kit. HLA-DQ2.5, -DQ2.2 and -DQ8 frequencies were compared between celiac and controls (Fisher exact test and qui-squared test). The results were significant when  $p < 0.05$ . The risk were assigned using 1:N representation, according to each HLA-DQ category described. **Results:** qPCR results were 100 % concordant with the commercial kit results. HLA-DQ2.5 and/or HLA-DQ8 were detected in 224 patients (94.5 %) and in 84 controls (35 %). HLA-DQ2.2, without another CD HLA-DQ, were detected in eight celiac (3.4 %) and 38 controls (16 %). HLA-DQ2.5, without HLA-DQ8 were detected in 178 celiac (75.1 %) and 38 controls (16 %). Isolated HLA-DQ8 were present in ten celiac (4.2 %) and 36 controls (15.2 %). Five celiac (2.1 %) and 115 controls (48.4 %) had  $\alpha 5$  (DQA1\*05),  $\alpha 8$  (DQA1\*03) or no CD HLA-DQ. Genetic risk ranged from 1:7 to 1:3014 with HLA-DQ2.5/DQ2.5, HLA-DQ2.2/DQ2.2 and HLA-DQ2.5/DQ8 being the major CD risk factors. Even though HLA-DQ2.2 showed a low CD risk of 1:251 (homozygosis) and 1:550 (heterozygosis with HLA-DQ different from HLA-DQ2.5 and HLA-DQ8), when associated with HLA-DQ2.5 it showed a second highest CD risk of 1:10 ( $p < 0.0001$ ). **Conclusions:** This study enables us to show the frequency of genotypes HLA-DQ2.5, -DQ2.2, -DQ8 in a representative population group of celiac patients and controls in the city of Brasilia (Brazil) and surroundings (DF) and to establish a risk gradient based on HLA-DQ profile applicable to the Brazilian population.

**Key Words:** Celiac Disease, Genetics, Genetic Risk, HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 and HLA-DQ8, frequency.

### 3. INTRODUÇÃO

#### 3.1. Histórico

A DC tem relato histórico bem antigo, que remete aos primeiros séculos depois de Cristo (dC) (TACK *et al.*, 2010), sendo que primeira descrição de uma doença similar à DC foi feita por *Aretaeus* da Capadócia no século II dC (TEKINER, 2014). Entretanto, nenhuma associação foi feita entre os sintomas descritos por *Aretaeus* e o consumo de trigo e/ou outros cereais na época (TOMMASINI *et al.*, 2011).

Em 1888, um pediatra inglês chamado Samuel Gee (1839-1911) voltou a descrever, com mais detalhes, os sintomas clássicos dessa desordem. Esta doença foi denominada “afecção celíaca”, pois foi baseada no termo grego “*koiliakos*” que significa sofrimento intestinal (LOSOWSKY, *et al.*, 2008). Entretanto, Samuel Gee não conseguiu identificar o que causava a então denominada afecção celíaca (TOMMASINI *et al.*, 2011).

Em 1949 o pediatra holandês Wilhelm Karel Dicke, durante o período de escassez de alimentos na Holanda provocado pela II guerra mundial, observou que a ausência de cereais na dieta da população levou os pacientes celíacos à melhora clínica. Em 1950, Dicke e colaboradores sugeriram que o efeito danoso causado em paciente com DC era produzido por uma desconhecida substância presente na farinha de trigo e chamou esta substância de “fator do trigo”. (AURICCHIO; TRONCONE, 1996; LOSOWSKY *et al.*, 2008).

#### 3.2. Doença Celíaca (DC)

A doença celíaca (DC) é caracterizada como uma doença autoimune do aparelho digestivo com manifestações sistêmicas. Possui alta morbidade e, se não tratada, pode levar a óbito. A DC afeta cerca de 1% da população mundial e é predominantemente encontrada em indivíduos com descendência europeia (van HEEL; WEST, 2006). A manifestação da DC está relacionada à presença dos alelos HLA do Complexo Principal de Histocompatibilidade de Classe II (MHC-II) que codificam os heterodímeros HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e à ingestão do glúten, uma proteína presente no trigo e/ou proteínas similares do centeio e da cevada (DI SABATINO; CORAZZA, 2009). A manifestação da doença varia desde sinais e sintomas clássicos, tais como diarreia, perda de peso,

distensão abdominal e flatulência, até a ausência de sinais e sintomas que possam ser correlacionados à presença desta doença (GUANDALINI; ASSIRI, 2014). As mudanças observadas no padrão histológico das vilosidades intestinais são consideradas padrão ouro para o diagnóstico da DC. Entretanto, novos critérios foram estabelecidos para seu diagnóstico e sugerem a não realização de biópsia intestinal, caso esses critérios sejam preenchidos (HUSBY *et al.*, 2012). O padrão histológico de biópsia intestinal de celíacos inclui: infiltração de linfócitos na mucosa intestinal, hiperplasia de criptas e atrofia vilositária (GREEN; CELLIER, 2007). Atualmente, o único tratamento adotado consiste em uma dieta livre de glúten e proteínas relacionadas.

### **3.3. Sinais e sintomas**

A doença celíaca pode aparecer em qualquer período da vida, afetar indivíduos de qualquer etnia e afetar, como manifestação extragastrointestinal, qualquer órgão. O quadro clínico clássico da DC é caracterizado pelos seguintes sintomas gastrointestinais: diarreia crônica com perda de peso, dor abdominal recorrente, flatulência, distensão abdominal, esteatorréia, constipação, baixa absorção de nutrientes além de fadiga (DI SABATINO; CORAZZA, 2009). Os problemas gastrointestinais clássicos são mais comuns em crianças do que em adultos e incluem, com mais frequência, diarreia crônica e distensão abdominal (GUANDALINI; ASSIRI, 2014).

As manifestações extragastrointestinais podem ser: anemia por deficiência de ferro resistente ao tratamento oral, osteopenia e/ou osteoporose (FREEMAN, 2008), aftas recorrentes, depressão e problemas neurológicos (HOPPER *et al.*, 2007). Dentre as autoimunidades associadas à DC podemos citar: dermatite herpetiforme (COLLIN; REUNALA, 2003), diabetes melitus tipo 1, tireoidite de Hashimoto, síndrome de Sjögren (GREEN *et al.*, 2001; SANDERS *et al.*, 2002). Também foram evidenciados indivíduos celíacos com sintomatologia mínima, restrita a um leve desconforto abdominal e mal-estar indefinido, com diarreia ocasional (GREEN; CELLIER, 2007), até ausência total de sintomatologia (VERECKEI *et al.*, 2011). A tabela 1 apresenta os principais sinais e sintomas e doenças associadas à DC.



**Tabela 1** – Principais manifestações gastrointestinais e não gastrointestinais encontradas em celíacos sintomáticos e principais autoimunidades e doenças genéticas associadas

Celíacos	
Sinais e sintomas Gastrointestinais	Autoimunidades associadas
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dor e distensão abdominal</li> <li>- Diarréia</li> <li>- Perda de peso</li> <li>- Constipação</li> <li>- Esteatorréia</li> <li>- Baixa absorção de nutrientes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Dermatite Herpetiforme</li> <li>- Diabetes Mellitus do Tipo I</li> <li>- Hipertireoidismo</li> <li>- Síndrome de Sjögren</li> <li>- Lupus</li> <li>- Doença de Addison</li> </ul>
Manifestações não gastrointestinais	Doenças genéticas associadas
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Deficiência de crescimento</li> <li>- Anemia por deficiência de ferro não responsiva à terapia oral</li> <li>- Osteoporose/osteopenia/baixa massa óssea</li> <li>- Depressão e problemas neurológicos</li> <li>- Baixa estatura</li> <li>- Infertilidade (em mulheres)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Síndrome de Down</li> <li>- Síndrome de Turner</li> <li>- Síndrome de Williams</li> </ul>

### 3.4. Associação com Doenças Autoimunes

As doenças autoimunes mais comumente encontradas em concomitância com a DC estão associadas com o sistema endócrino, que são: Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMI) e doenças autoimunes na tireóide.

A presença do DM1 tem sido relatada em crianças celíacas e também em adultos celíacos e seu aparecimento geralmente precede ao aparecimento da DC (REILLY *et al.*, 2012). A prevalência de DC entre os pacientes com DM1 é estimada em aproximadamente 4% (AGGARWAL *et al.*, 2012) podendo chegar até 10% (SALARDI *et al.* 2008). Tanto a DC como a DM1 compartilham os alelos MHC de classe II que codificam os genótipos HLA-DQ2 e HLA-DQ8, ambos importantes para o início da resposta imunológica, que reside principalmente na apresentação antigênica (CAMARCA *et al.*, 2012).

A DC também tem sido diagnosticada entre pacientes com processos autoimunes

na tireoide (tireoidite de Hashimoto e doença de Graves) com prevalência maior que a relatada para a população geral (CH'NG *et al.*, 2007). É possível que outros genes fora da região do MHC de classe II predisponham para a coexistência da DC e doenças autoimunes da tireoide, como, por exemplo, o gene que codifica a molécula CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) (HUNT *et al.*, 2005).

### **3.5. Associação com Síndromes Genéticas**

As doenças genéticas que são encontradas maior associação com a DC são: Síndrome de Down, com prevalência de DC em torno de 6 % (CARCINER *et al.*, 2001; ZACHOR *et al.*, 2000) e Síndrome de Turner (ST) (BONAMICO *et al.*, 2002) com prevalência em torno de 3,6 - 6 % (DIAS *et al.*, 2010; BONAMICO *et al.*, 2002), Pacientes com ST possuem de 2 a 5 x mais risco de desenvolver a DC quando comparado com população geral (MÂRILD *et al.*, 2016).

### **3.6. Prevalência**

A DC era diagnosticada com base na apresentação de sintomatologia clássica, no entanto casos atípicos e assintomáticos permaneciam sem diagnóstico ou seus sintomas eram tratados como manifestações de outras doenças. A DC é uma doença autoimune comum e com prevalência mundial relatada de 1 %, embora a real prevalência da DC seja heterogênea dentre as várias etnias espalhadas pelo mundo. É estimado que a frequência da DC pode ter aumentado de 4 a 5 vezes nos últimos 50 anos (RUBIO-TAPIA *et al.*, 2009). Os fatores que contribuíram para esse aumento de casos diagnosticados estão relacionados com: o nível de conhecimento sobre a DC, o surgimento de exames com alta sensibilidade e especificidade (HILL, 2005), mudanças dos hábitos alimentares que envolvem dietas com glúten desde os primeiros meses de vida, dentre outros (CATASSI *et al.*, 2014).

#### **3.6.1. Prevalência Européia**

Em países do norte da Europa e Estados Unidos, a prevalência da DC em população geral é de aproximadamente 1 % (MUSTALAHTI *et al.*, 2010; FASANO *et al.*, 2003). Diferenças na prevalência entre países como Finlândia (2,4 %), Alemanha

(0.3 %) e Itália (0.7 %) foram relatadas (MUSTALAHTI *et al.* 2010). Na Suécia foi relatado epidemia de DC no período de 1985 a 1987 acompanhada de forte declínio da incidência desta doença em 1995 (IVARSSON *et al.*, 2000). Entretanto a prevalência nessa região ainda é alta (3 %) (MYLÉUS *et al.*, 2009). Na Espanha foi relatada prevalência de DC de 1:389 (0,26 %) (RIESTRA *et al.*, 2000), entretanto ela pode ser ainda maior (CILLERUELLO *et al.*, 2014).

### 3.6.2. Prevalência no Oriente Médio e Norte da África

Esta região é conhecida como o “berço” da atividade agrícola, onde o cultivo de cereais contendo glúten (trigo e centeio) tenha se iniciado há pelo menos 10.000 anos atrás (SHEWRY, 2009). Visto que os genótipos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 estão amplamente distribuídos nas populações desta região, e que o consumo de glúten era e é frequente nesta região, considera-se que a prevalência da DC em países do Oriente Médio e Norte da África esteja subestimada. É estimado que a prevalência de DC na região do Oriente Médio varie de 0,14 % à 1,17 % em população geral (BARADA *et al.*, 2010). Estudo na Turquia revelou prevalência de 0,47 % em pacientes confirmados por biópsia dentre 20,190 crianças saudáveis (DALGIC *et al.*, 2011), sendo que esta prevalência pode ser ainda maior (CATASSI, 2011), no Irã a prevalência varia de 0,60 % a 1,10 % (EMAMI *et al.*, 2008).

Em países do Norte da África foi relatada a maior prevalência de DC encontrada no mundo até agora. Uma população que vive como refugiados no deserto do Saara, na Argélia, e com alto índice de consanguinidade, possui prevalência de DC de 5.6 % (CATASSI *et al.*, 1999). Tal fato pode ser explicado, dentre outras razões, pela alta frequência de um dos genótipos que mais predispõe à DC (HLA-DQ2) (LÓPEZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2004) e por fatores ambientais que incluem, principalmente, dieta rica em alimentos que contêm glúten em decorrência da mudança de hábitos alimentares provenientes de ajudas humanitárias na região (RÄTSCH; CATASSI, 2001). Egito e Tunísia tem prevalências que variam de 0,24 % a 0,64 % (ABU-ZEKRY *et al.*, 2008; HARIZ *et al.*, 2013; HARIZ *et al.*, 2007).

### 3.6.3. Prevalência na Ásia e Oceania

Países como Austrália, Israel, Nova Zelândia e Turquia tem prevalência variando

entre 0,1 % até 2 % (CUMMINS; ROBERTS-THOMPSON, 2009; SINGH *et al.*, 2016). Pacientes celíacos confirmados por biópsia somam 0,5% da população da Ásia, de acordo com revisão sistemática e meta-análise realizada por Singh e colaboradores (2016). Alguns estudos em países como a Malásia, China, Japão e Singapura sugerem a existência da DC nestas regiões (MAKHARIA, 2015).

#### **3.6.4. Prevalência na América do Norte e América Central**

Estudo de prevalência feito na população geral dos Estados Unidos da América (EUA) mostram prevalência que de 0,71 % até 0,75 % (RUBIO-TAPIA *et al.*, 2012; FASANO *et al.*, 2003), evidenciando que a DC é tão comum nos EUA quanto em países europeus de maioria caucasiana (WEST *et al.*, 2003). É estimado que no Canadá exista prevalência similar àquela relatada para a população caucasiana (1 %) (FEDORAK *et al.*, 2012). No México, foi estimada prevalência de DC de 2,6 % (REMES-TROCHE *et al.*, 2006), entretanto dados mais robustos precisam ser gerados para se estimar a real prevalência da DC entre população geral do México (PEÑA; CRUSIUS, 2015).

#### **3.6.5. Prevalência na América do Sul**

Vários estudos sobre prevalência de DC foram realizados no Brasil, nos mais diferentes grupos. Estes estudos demonstraram que a prevalência de DC varia de 0,84 % até 0,15 % (MELO *et al.*, 2006; OLIVEIRA *al.*, 2007; PEREIRA *et al.*, 2006; PRATESI *et al.*, 2003; GANDOLFI *et al.*, 2000). Esta heterogeneidade de prevalência pode ter, dentre outras razões: variabilidade genética dos grupos estudados, seleção de pessoas (população geral, grupos de risco e doadores de sangue), exames sorológicos empregados e variabilidade inter e intralaboratorial (CATALDO; MONTALTO, 2007). Em Brasília a prevalência encontrada em população geral foi de 0,34 %, sendo 0,21 % em adultos e 0,54 % em crianças (PRATESI *et al.*, 2003). Na Argentina o índice de prevalência foi estimado em 0,6 % (GOMEZ *et al.*, 2001) e na Colômbia é estimado que a prevalência da DC esteja entre 0,46 % e 0,64 % (PARRA-MEDINA *et al.*, 2015). Venezuela e Peru carecem de dados mais concisos sobre prevalência da DC.

### 3.7. Imunopatologia

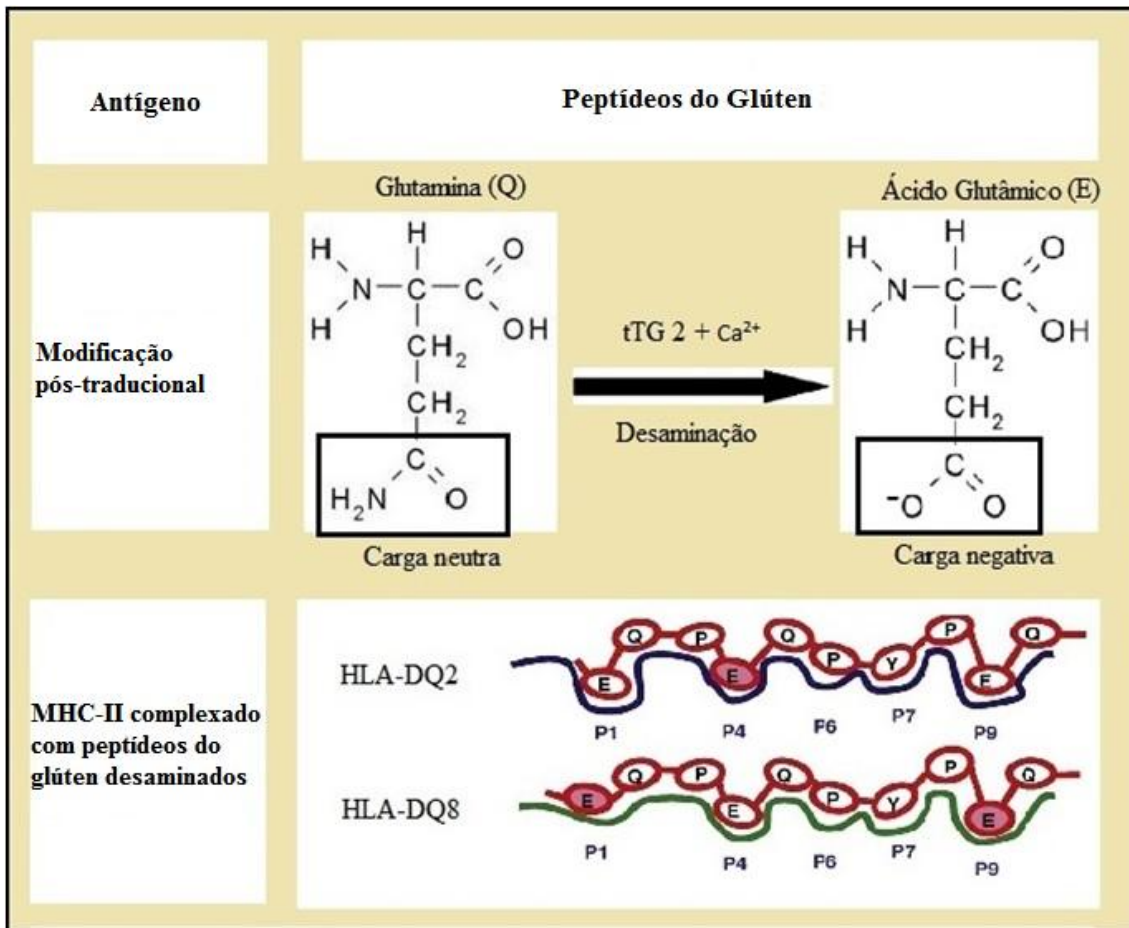
A DC é uma enteropatia desencadeada pela ingestão do glúten em indivíduos geneticamente predispostos. Esta proteína é encontrada de forma abundante em cereais como trigo, centeio e cevada. Para que o processo imunológico seja estabelecido, peptídeos do glúten gerados pela proteólise intestinal alcançam a lâmina própria intestinal e são reconhecidos e apresentados por células apresentadoras de antígenos (APCs) à linfócitos T via moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade de classe II (MHC-II) (SOLLID; LIE, 2005; ABADIE *et al.*, 2011). Esses heterodímeros são chamados de Antígeno Leucocitário Humano (HLA – sigla em inglês) e pertencem ao loco HLA-DQ presente no cromossomo 6. Os genótipos que estão fortemente associados ao início da resposta imunológica desencadeada pelo glúten são: HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 e HLA-DQ8 (GUANADALINI *et al.*, 2014; DI SABATINO E CORAZZA, 2009; KARELL *et al.*, 2003). Sabe-se que os genótipos HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 e HLA-DQ8 são necessários mas não suficientes para o desenvolvimento da DC, visto que mais de 30% da população geral mundial possuem os referidos genótipos e apenas de 3 a 5% irão desenvolvê-la (VAN HEEL *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2005; SOLLID; LIE, 2005).

#### 3.7.1. Glúten – “Gatilho ambiental de desenvolvimento da DC”

O glúten é um termo genérico que engloba a maioria das proteínas que compõem o endosperma de grãos do trigo (gliadinas e gluteninas), centeio (secalinas) e cevada (hordeínas). Proteínas encontradas na aveia têm sido classificadas como não imunogênicas para a maioria dos pacientes com DC (KOSKINEN *et al.*, 2009; RASHID *et al.*, 2007), entretanto ainda há controvérsias se esse cereal deva ou não ser excluído da dieta de pacientes (COMINO *et al.*, 2016). O glúten é rico em resíduos de aminoácidos glutamina e prolina, fato que dificulta sua proteólise completa por meio da ação de enzimas digestivas gástricas, pancreáticas e da borda em escova (tanto em pessoas saudáveis como em pacientes celíacos) (LEBWOHL *et al.*, 2015; DI SABATINO e CORAZZA., 2009; SHAN *et al.*, 2002). Os fragmentos peptídicos gerados pela ação das enzimas digestivas são capazes de atravessar o epitélio intestinal e alcançar a lâmina própria, onde são reconhecidos e desaminados pela enzima transglutaminase tecidual 2 (tTG2) (figura 1), principal auto-antígeno presente na DC

(DIETERICH *et al.*, 1997). Bactérias pertencentes à microbiota intestinal também podem agir na proteólise do glúten aumentando ou reduzindo o potencial imunogênico dos peptídeos desta proteína (CAMINERO *et al.*, 2016).

A minoria desses fragmentos tem potencial de gerar resposta inflamatória em pacientes celíacos (ANDERSON *et al.*, 2000; TYE-DIN *et al.*, 2010). Dentre eles, se destacam as gliadinas (DE RE *et al.*, 2013). Mais de cem peptídeos foram descritos para esta classe de subprodutos do glúten (DI SABATINO e CORAZZA, 2009), dentre as quais se destaca um peptídeo imunodominante de 33 resíduos de aminoácidos chamado de 33-mer (LQLQPFQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF) cujos resíduos de glutamina (Q) são desaminados pela tTG2 a ácido glutâmico (E) em determinadas posições deste peptídeo (Figura 1), atribuindo, assim, carga parcial negativa a estes resíduos (SHAN *et al.*, 2002, QIAO *et al.*, 2004). Alguns fragmentos peptídicos classificados como gluteninas (presentes no trigo) também possuem potencial imunogênico, além das secalinas (centeio) e hordeínas (cevada) (DI SABATINO e CORAZZA, 2009). As modificações químicas geradas pela ação da enzima tTG2 nos peptídeos descritos acima, aumentam a afinidade de ligação destes antígenos com as moléculas de MHC de classe II HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em células apresentadoras de antígenos (APC) (Figura 1).



**Figura 1** – Fragmentos  $\gamma$ -gliadina ligados nas fendas P1, P4 e P9 do HLA-DQ2 e DQ8. Fonte: Adaptado de Abadie *et al.* (2011) e Qiao *et al.*, (2009).

### 3.7.2. Processo Imunopatológico

Os fragmentos gerados pela proteólise do glúten atravessam a membrana epitelial do intestino delgado (SCHUMANN *et al.*, 2008; MATYSIAK-BUDNIK *et al.*, 2008) e alcançam a lâmina própria por dois mecanismos distintos. Via transcelular: anticorpos da classe IgA secretadas no lúmen do intestino, opsonizam peptídeos imunogênicos do glúten (ex: peptídeo 33-mer) e se ligam ao receptor transferrina - CD71. Este complexo anticorpo-peptídeo/glúten-CD71 é carregado por dentro da célula em direção à lâmina própria (MATYSIAK-BUDNIK *et al.*, 2008; HEYMAN e MENARD, 2009). Esse processo é estimulado pela citocina pro-inflamatória interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) (SHUMANN *et al.*, 2008); Via paracelular: os enterócitos, ao entrarem em contato com fragmentos do glúten, tem a expressão do gene *MyD88* ativado promovendo a formação de uma proteína chamada zonulina. Essa proteína induz a perda da junção de adesão celular pelos enterócitos e consequente aumento da permeabilidade não seletiva da

mucosa intestinal. Esse processo favorece a entrada de peptídeos do glúten na lâmina própria (WANG *et al.*, 2000; LAMMERS *et al.*, 2008; FASANO, 2012)

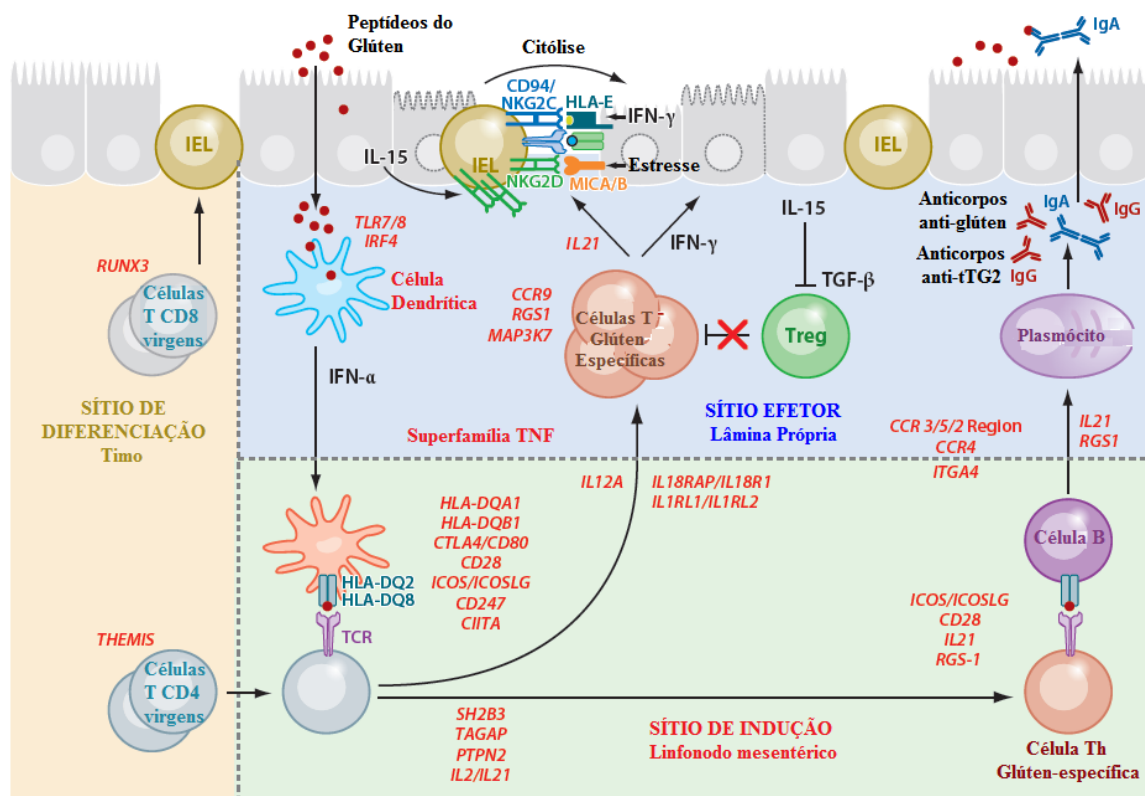
Ao reconhecerem os peptídeos provenientes do glúten e também o complexo tTG2-Glúten, as APCs, na lâmina própria, adquirem fenótipo pró-inflamatório (Abadie *et al.*, 2011). Estes peptídeos são processados em APCs e apresentados como antígenos, via molécula MHC-II (HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8), a linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos linfonodos mesentéricos. A forte associação da DC com alelos HLA-DQ evidenciam o papel central dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> na patogênese da DC (TOLLEFSEN *et al.*, 2006). A presença destes antígenos induz as APCs a produzirem a citocina pró-inflamatória interferon alfa (IFN- $\alpha$ ), que induzirá outras APCs a desenvolverem um perfil pró-inflamatório mantendo os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativos. A citocina IFN- $\alpha$  está presente em grande quantidade na mucosa de pacientes celíacos quando comparada a de controles (DI SABATINO, 2007; MONTELEONE *et al.*, 2001) o que corrobora sua importância na manutenção do processo inflamatório. Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> reconhecem os antígenos provenientes do glúten e aqueles gerados a partir do processamento do complexo tTG2-Glúten pela APC, via molécula de MHC-II (HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8). Esse reconhecimento ativa estes linfócitos induzindo-os à produção de citocinas pró-inflamatórias (ex: IFN- $\gamma$  e interleucina 21 – IL-21 – são produzidas em abundância) (MONTELEONE *et al.*, 2004; BOOD, 2010). Estas citocinas atuarão na ativação de células T *helper* do tipo 1 (TH1) que juntamente com as metaloproteinases de matrix, auxiliam no processo de destruição dos enterócitos no intestino delgado (apoptose e atrofia vilositária). As células TH1 migram para linfonodo mesentérico e induzem a maturação de células T CD4<sup>+</sup> virgens em células T CD4<sup>+</sup> efectoras aumentando assim o processo inflamatório e o dano tecidual observado na mucosa do intestino de pacientes celíacos (Figuras 2 e 4). Essas mudanças histológicas na mucosa do intestino delgado de pacientes celíacos podem levar à síndrome de má-absorção intestinal (SOLLID, 1993).

A DC está associada com resposta imunológica mediada pelas imunoglobulinas de classe A (IgA) e/ou imunoglobulina de classe G (IgG) contra fragmentos protéicos do glúten e contra a enzima tTG2 por células B (GREEN; CELLIER, 2007). APCs e células B podem reconhecer e internalizar o complexo tTG2-glúten e apresentar partes dessas proteínas via moléculas de MHC-II HLA-DQ2 e HLA-DQ8 a células T CD4<sup>+</sup>. Estas liberam citocinas que estimulam as células B à expansão clonal e diferenciação em plasmócitos especializadas na produção de anticorpos contra peptídeos do glúten e contra a enzima tTG2 (CICCOCIOPPO *et al.*, 2005; DI SABATINO E CORAZZA,



2009; ABADIE *et al.*, 2011). Anticorpos da classe IgA se tornam circulantes na corrente sanguínea e podem se depositar na mucosa intestinal subepitelial (KORPONAY-SZABO, 2004), seu a função dos anticorpos anti-glúten e anti-tTG2 na lesão observada na mucosa intestinal de pacientes celíacos ainda precisa ser esclarecida (ABADIE *et al.*, 2011) (Figura 4).

O típico dano tecidual observado em pacientes celíacos (atrofia vilositária) (Figura 4) também é desencadeado por linfócitos T CD8<sup>+</sup> e células *natural killers* (NK) que migram para a mucosa intestinal e induzem os enterócitos à apoptose. Estas células são recrutadas pela ação da interleucina 15 (IL-15) que atua de forma pleiotrópica sobre células do sistema imune inato e adaptativo sendo que sua expressão é influenciada pela sinalização do sistema imune inato (ABADIE e JABRI, 2014). A IL-15 é produzida por células epiteliais ou por macrófagos em resposta a algum estímulo externo e contribui de forma notável no processo imunológico observado na DC (DI SABATINO *et al.*, 2005).



**Figura 2** – Modelo imunopatológico da DC mostrando a integração de células e genes descritos por *Genomic Wide Association* (GWAS) com os passos imunopatológicos descritos para a DC. Genes associados com a DC (GWAS) estão listados em vermelho nas posições onde desempenham sua função no processo inflamatório. Fonte: Adaptado de Abadie *et al.*, 2011.

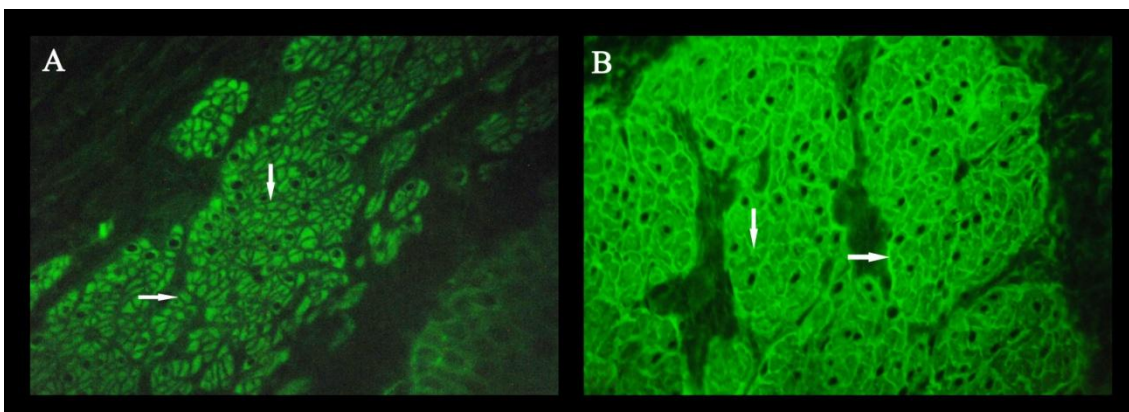
### 3.8. Diagnóstico da DC

Até a década de 1950 o diagnóstico da DC se baseava em sinais clínicos sugestivos de problemas de má-absorção e em sintomatologia clássica. Com o advento de técnicas de biópsia intestinal (cápsula de Crosby; endoscopia) o diagnóstico ficou mais preciso. A Sociedade Europeia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica (*European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* - ESPGHAN) propôs a realização de testes sorológicos para triagem e realização de biópsia intestinal para confirmar o diagnóstico da DC (WALKER-SMITH *et al.*, 1990)

A partir de meados de 2012, Husby *et al.* (2012) estabeleceram novo protocolo para diagnóstico da DC, sugerindo substituição do guia proposto por Walker-Smith *et al.*, (1990). Husby *et al.*, (2012) propuseram que, para diagnóstico da DC, é necessário se basear na sintomatologia do paciente e no resultado do teste IgA anti-transglutaminase, cujo resultado deve ser 10x maior que os valores de referência para o *Kit* utilizado, ter anti-endomísio positivo e possuir os alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8. Caso o paciente preencha esses critérios, o diagnóstico de DC pode ser feito sem a necessidade da biópsia intestinal. Em pacientes assintomáticos, o diagnóstico de DC é baseado em sorologia positiva e biópsia intestinal, além dos testes genéticos. O objetivo é reduzir o desconforto e ansiedade gerado pela biópsia e pela espera do resultado (HUSBY *et al.*, 2012). Alessio e colaboradores (2011) sugerem que, em casos selecionados, uma biópsia intestinal pode ser evitada naqueles pacientes com alta positividade no teste IgA-tTG2 e que tiveram positividade no teste IgA-EMA o que reforça o guia de diagnóstico proposto por Husby e colaboradores (2012).

#### 3.8.1. Sorologia

A presença de anticorpos específicos gerados no processo imunopatológico da DC pode ser detectada por meio de exames sorológicos: anticorpos anti-transglutaminase humana 2 (IgA ou IgG-htTG), anticorpos IgA e IgG anti-endomísio (IgA ou IgG-EMA) (CHORZELSKI *et al.*, 1983) (figura 3) e mais recentemente foi desenvolvido teste sorológico para detectar a presença de anticorpos anti-gliadina desaminada (LUDVIGSSON *et al.*, 2013; VOLTA *et al.*, 2010; LAMMI *et al.*, 2015). A associação de sinais e sintomas do paciente com o resultado destes testes sorológicos, análise genética e biópsia intestinal podem confirmar ou afastar o diagnóstico de DC.



**Figura 3** – Cortes criostáticos transversais de esôfago de macaco *Rhesus* fixados em lâmina (Inova Diagnostics, *Werfen company*) e incubados com soro sanguíneo (diluição 1:5 em tampão PBS) para detecção de anticorpos IgA ou IgG. Anticorpos anti-IgA ou anti-IgG humano marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC) evidenciam os anticorpos do paciente. A lâmina é observada em microscopia de fluorescência, permitindo observar: **A** – Endomísio negativo (setas) evidenciando a ausência de anticorpos IgA anti-endomísio neste paciente. **B** – Endomísio positivo (setas) evidenciando a presença de anticorpos IgA anti-endomísio neste paciente. Aumento: 400x. Fonte: Laboratório Interdisciplinar de Biociências – Faculdade de Medicina – UnB (LABIBC/FM)

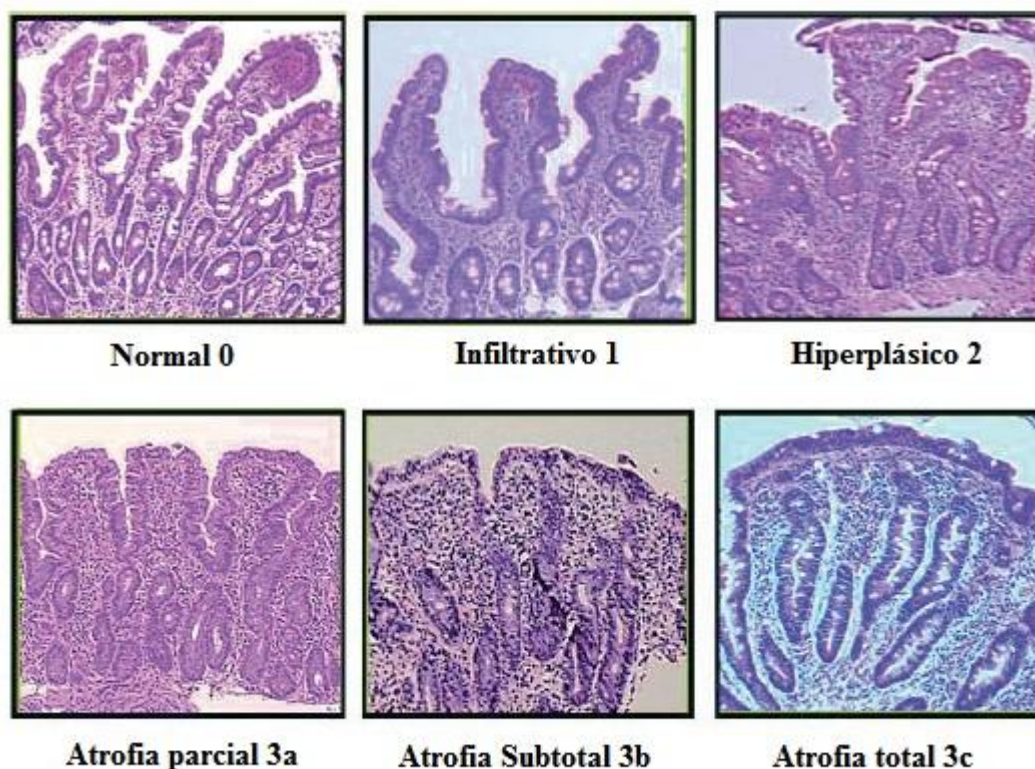
### 3.9. Patologia

Os achados histológicos clássicos da DC são: infiltração linfocitária na mucosa das vilosidades intestinais, hiperplasia de criptas e atrofia vilositária (figura 4). Essas características foram descritas inicialmente pelo médico fisiologista John W. Paulley em 1954. Michael N. Marsh e colaboradores (1992) revisaram e organizaram os achados histológicos compatíveis com a DC promovendo uma classificação para os graus de dano tecidual observado na mucosa intestinal de pacientes celíacos. Classificaram em Marsh 0 (mucosa com vilosidades normais) Marsh 1 (lesões infiltrativas na mucosa intestinal) Marsh 2 (lesões hiperplásicas com infiltração linfocitária) Marsh 3 (a, b e c) (atrofia vilositária parcial ou total). Entretanto essa classificação foi modificada por Oberhuber e colaboradores (1999) e é, ainda hoje, a mais aceita entre médicos clínicos e patologistas (Tabela 2 e Figura 4). Outros autores têm sugerido novas classificações para as lesões intestinais observadas em pacientes celíacos (CORAZZA; VILLANACI, 2005; ENSARI, 2010).

Tabela 2 – Esquema simplificado de classificação histopatológica de biópsias intestinais de pacientes com DC

March, 1992	Oberhuber <i>et al.</i> , 1999	Corazza & Villanaci, 2005	Ensari, 2010
Tipo 0 – Normal	Tipo 0 – Normal	Normal	Normal
Tipo 1 – Infiltração linfocitária	Tipo 1 – Infiltração linfocitária	Grau A- Infiltração linfocitária	Tipo 1 – Infiltração linfocitária
Tipo 2 – Hiperplasia de Criptas	Tipo 2 – Hiperplasia de Criptas	Descartado – Classificação incorporada no grau A	Descartado – Classificação incorporada no Tipo I
Tipo 3 – Atrofia Vilositária	Tipo 3A: Parcial Tipo 3B: Subtotal Tipo 3C: Total	Atrofia Grau B1 Grau B1 Grau B2	Atrofia Tipo 2 Tipo 2 Tipo 3
Tipo 4 – Lesão destrutiva	Tipo 4 – Lesão destrutiva	Obsoleto	Obsoleto

Fonte: Adaptado de Bañares *et al.*, 2014.



**Figura 4** – Biópsias de mucosa intestinal evidenciando a progressão das mudanças que ocorrem nas vilosidades intestinais. De acordo com a classificação Marsh-Oberhuber: Normal 0 = Marsh 0 ou Normal; Infiltrativo 1 – Marsh 1 ou Tipo I; Hiperplásico 2 = Marsh 2 ou Tipo 2; Atrofia 3a, 3b e 3c – Marsh 3 ou Tipo 3, se referem a progressão das lesões mais severas que acometem a mucosa intestinal de pacientes celíacos. Adaptado de Rivera *et al.*, 2013.

### 3.9.1. Tratamento proposto para DC

O tratamento se baseia na dieta isenta de glúten e proteínas relacionadas (TOMMASINI *et al.*, 2011; HUSBY *et al.*, 2012). Entretanto, dificuldades de adesão à dieta e de socialização tem sido relatadas (GUANDALINI; ASSIRI, 2014). Novos tratamentos têm sido sugeridos e ainda estão em fase de testes. Dentre eles está o uso da enzima proil endopeptidase (PEP) extraído da bactéria *Flavobacterium meningosepticum* (SHAN *et al.*, 2002) com potencial de degradar fragmentos imunogênicos do glúten (MATYSIAK-BUDINIK, 2008) e imunização através de vacina (Nexvax2<sup>®</sup>-ImmusanT) que foi desenvolvida para sensibilizar pacientes que possuam o genótipo HLA-DQ2.5 (SOLLIS, 2015).

### 3.10. Genética, Imunogenética e Doença Celíaca

A DC se manifesta em consequência do encontro entre um gatilho ambiental (glúten e proteínas similares) e um perfil genético predisponente à DC (DI SABATINO E CORAZZA, 2009, WOLTERS; WIJIMENGA, 2008). O perfil genético está fortemente associado a genes HLA do MHC-II, evidenciado pela forte concordância da presença de DC entre gêmeos monozigóticos (83% a 86%) quando comparado com gêmeos dizigóticos (17% a 20%) (GRECO *et al.*, 2002; NISTICO *et al.*, 2006).

#### 3.10.1. Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC)

A região do MHC possui mais de 4 megabase (Mb) de extensão, está presente na região 6p21.32 do braço curto do cromossomo 6, e possui mais de 220 genes (HORTON *et al.* 2004). A maioria deles, incluindo os genes do Antígeno Leucocitário Humano (HLA), está relacionada com a síntese de proteínas com função no sistema imunológico. O MHC é uma das regiões mais ricas em genes dentro do genoma humano. Os principais genes de interesse nesta região são os genes HLA, cujas proteínas estão relacionadas com a resposta imunológica contra microorganismos e com o processo de rejeição em transplante de células e órgãos. Estes genes HLA são altamente polimórficos (ROBINSON *et al.*, 2011; SHIINA *et al.*, 2009). A região do MHC é dividida em três classes, MHC de classe I (MHC-I), de classe II (MHC-II) e de classe III (MHC-III) sendo que os genes HLA estão localizados nas regiões de MHC-I e

MHC-II (MARSH *et al.*, 2010). Os genes HLA mais polimórficos estão associados a região de MHC-I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e aqueles associados a região de MHC-II (HLA-DRB1, -DQB1 e DPB1) (MAYOR *et al.*, 2015).

As moléculas de MHC-I são formadas por uma cadeia  $\alpha$ , produzida pela expressão dos genes HLA, em MHC-I, e por uma cadeia  $\beta$ , produzida pela expressão do gene  $\beta_2$ -microglobulina produzida por um gene no cromossomo 15. As moléculas de MHC-II são formadas por uma cadeia  $\alpha$  e por uma  $\beta$ , ambas produzidas pela expressão de genes HLA diferentes na região do MHC-II. Esses genes são nomeados DM, DO, DP, DQ e DR. A primeira letra (D) dos referidos nomes indica que o gene pertence a região MHC-II, a segunda (M, O, P, Q e R) indica a família a que o gene pertence e a terceira letra a cadeia que esse gene codifica, se é a cadeia alfa (A) ou a beta (B) (KLEIN; SATO, 2000). O gene DQB, por exemplo, está na região de MHC-II e codifica a cadeia  $\beta$  de uma molécula de MHC-II.

Para distinguir os alelos de cada gene HLA, nomenclatura de quatro dígitos foi sugerida (BODMER *et al.* 1989). Atualmente, é utilizada quantidade de dígitos que seja necessária para discernir os alelos que têm sido encontrados em determinados genes HLA. Os primeiros dois dígitos indicam a família de alelos, o terceiro e o quarto dígito indicam a ordem em que esses alelos foram descobertos (MARSH *et al.*, 2010).

### **3.10.2. Alelos HLA-DQ predisponentes à DC**

A primeira descrição de associação entre a DC e alelos HLA foi feita em 1972 por Falchuk e colaboradores (1972) quando foi identificado a molécula de MHC-I sorologicamente denominada HLA-B8 como responsável pelo processo imunológico desencadeado na DC. Posteriormente, em 1989, Sollid e colaboradores fizeram a primeira descrição da associação dos alelos HLA-DQA1\*05 e DQB1\*02 que codificam molécula de MHC-II sorologicamente denominada HLA-DQ2. Posteriormente, foi identificado que pacientes celíacos que não possuíam HLA-DQ2 tinham HLA-DQ8 (SPURKLAND *et al.*, 1992; SPURKLAND *et al.*, 1997). A partir de então, foi identificado forte associação entre portadores de DC e a presença de alelos DQA1 e DQB1 que codificam as moléculas de MHC-II sorologicamente denominadas HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (KARELL *et al.*, 2003; MEGIORNI *et al.*, 2009). Para simplificar e tornar mais prático a análise dos alelos predisponentes à DC, foi adotada a nomenclatura sorológica para se referir à presença dos alelos predisponentes à DC (KARELL *et al.*,

2003), sendo elas HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 e HLA-DQ8.

As subunidades proteicas  $\alpha$  e  $\beta$  da molécula de MHC-II HLA-DQ2.5, são codificadas pela expressão dos alelos DQA1\*05 e DQB1\*02, respectivamente, seja em *Cis* ou em *Trans*. HLA-DQ2.5 aparece em aproximadamente 95% da população celíaca européia. Quando os alelos que compõe HLA-DQ2.5 estão agrupados em apenas um dos cromossomos do par 6, chamamos esse arranjo *Cis*. Neste arranjo, tais alelos são comumente encontrados juntos no haplótipo DR3-DQ2.5 que é composto pelos seguintes alelos HLA: DRB1\*03:01-DQA1\*05:01-DQB1\*02:01 (Figura 5). Quando os alelos que compõe HLA-DQ2.5 estão separados, cada um em um dos cromossomos do par 6, chamamos esse arranjo *Trans*. Nestes arranjo, os alelos são comumente encontrados nos haplótipos: DR5-DQ7.5 formado pelos alelos DRB1\*11/12-DQA1\*05:05-DQB1\*03:01 e DR7-DQ2.2 formado pelos alelos DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02 (SOLLID; LIE, 2005) (Figura 5). HLA-DQ2.5 pode ser encontrado em homozigose (HLA-DQ2.5/HLA-DQ2.5) ou em heterozigose (HLA-DQ2.5/X).

Um resíduo de aminoácido no peptídeo líder da cadeia  $\alpha$  (DQA1\*05:01 *versus* DQB1\*05:05) e um resíduo de aminoácido no domínio de membrana da cadeia  $\beta$  (DQB1\*02:01 *versus* DQB1\*02:02) diferenciam HLA-DQ2.5 formado pela expressão de alelos em *Cis* ou em *Trans* (SOLLID, 2002). É sugerido que esta pequena diferença não gere consequências funcionais consideráveis no desenvolvimento da DC (ABADIE *et al.*, 2011).

HLA-DQ8 aparece em aproximadamente 5-10% da população celíaca européia (KARELL, 2003). Devido ao alto desequilíbrio de ligação, os alelos que compõe HLA-DQ8 estão agrupados em um mesmo locus de um cromossomo do par 6, ou seja, em *Cis*. Eles são encontrados no haplótipo DR4-DQ8, composto pelos alelos DRB1\*04-DQA1\*03-DQB1\*03:02 (GREEN; CELLIER, 2007; KARELL *et al.*, 2003; SOLLID; LIE, 2005) (figura 5). HLA-DQ8 pode ser encontrado em homozigose (HLA-DQ8/HLA-DQ8) ou mesmo em heterozigose (HLA-DQ8/X).

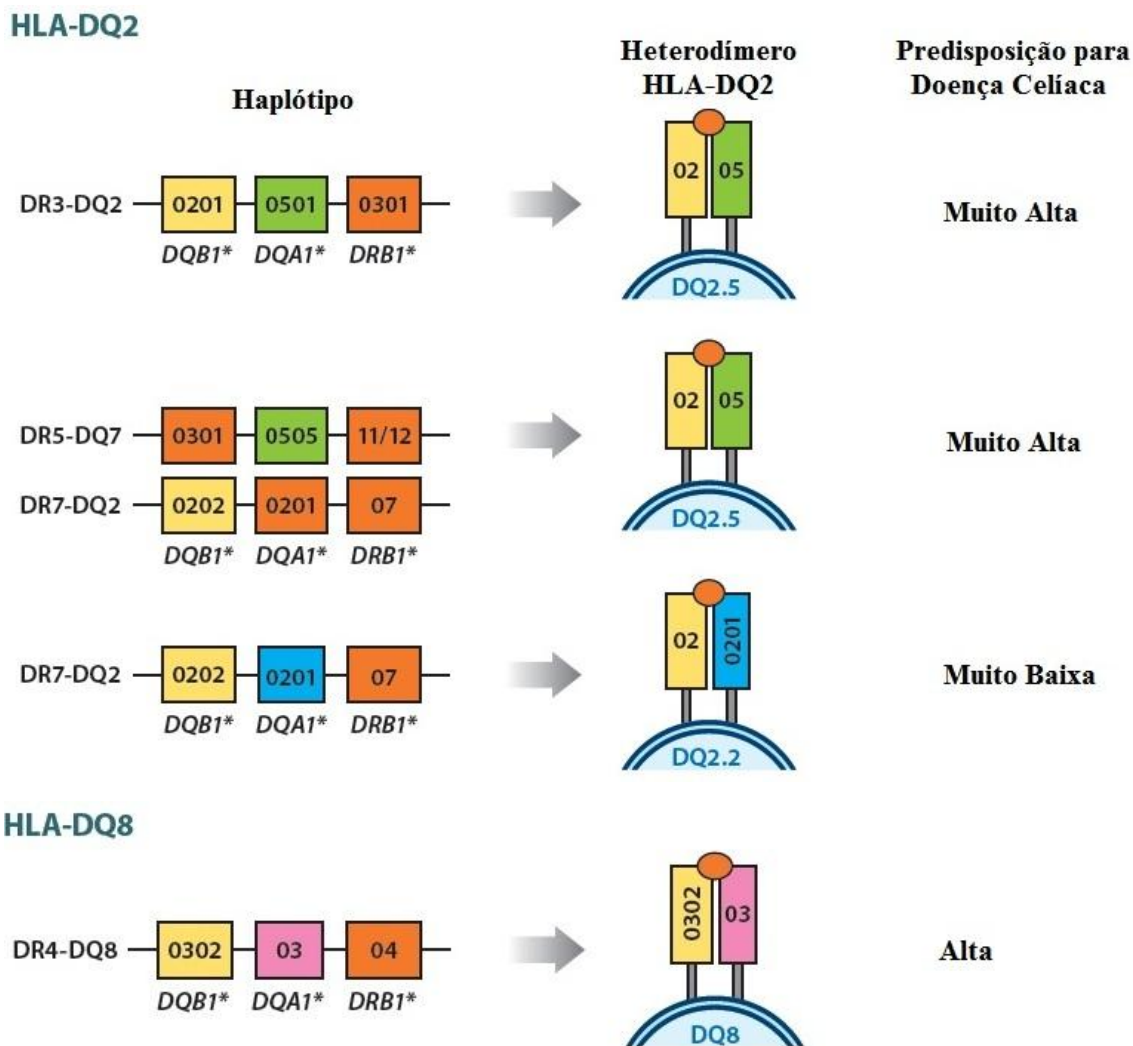
HLA-DQ2.2, em pacientes celíacos, está associado, em sua maioria, a HLA-DQ2.5 e HLA-DQ8. A minoria dos pacientes celíacos possuem HLA-DQ2.2 sem outros alelos HLA predisponentes à DC. HLA-DQ2.2 é formado pelos alelos DRB1\*07-DQA1\*02:01-DQB1\*02:02, os quais estão inseridos no haplótipo DR7-DQ2.2 (figura 5). HLA-DQ2.2 podem ser encontrados em homozigose (HLA-DQ2.2/HLA-DQ2.2) ou em heterozigose (HLA-DQ2.2/X).

A presença isolada de DQA1\*05 como alelo HLA predisponente à DC é comumente encontrada no haplótipo DR5-DQ7.5 formado pelos alelos DRB1\*11/12-DQA1\*05:05-DQB1\*03:01 (SOLLID; LUNDIN, 2009) (figura 5) os quais também conferem risco de desenvolver a DC (MEGIORNI *et al.*, 2009). Embora seja raro, há indivíduos portadores de DC que possuem apenas um dos alelos, DQA1 ou DQB1, que compõe HLA-DQ2 e aqueles que não possuem nenhum dos alelos predisponente à DC (KARELL *et al.*, 2003).

HLA-DQ2 se refere, de forma genérica, a HLA-DQ2.5 e HLA-DQ2.2. Através da genotipagem do alelo DQB1\*02, que pode ser tanto o alelo DQB1\*02:01 quanto o alelo DQB1\*02:02, pode-se inferir a presença do genótipo HLA-DQ2 (GUJRAL *et al.*, 2012) na maioria dos casos de pacientes e controles.

HLA-DQ2 é encontrado em 25 a 30% da população geral da Europa e cerca de 3% destes indivíduos desenvolvem a DC (SOLLID e LIE., 2005). Estes dados corroboram para o fato de que a genotipagem de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 é o melhor método de diagnóstico para avaliar a chance de risco de desenvolvimento da DC, embora não predize em que fase da vida o aparecimento da doença possa ocorrer, como acontece com outras doenças ligadas a apenas um gene (LIU *et al.*, 2005).





**Figura 5** – Antígeno Leucocitário Humano (HLA) associado com a Doença Celíaca. Fonte: Adaptado de Abadie *et al.*, 2011.

### 3.10.3. Determinação de alelos HLA

Inicialmente, as moléculas de MHC-II que causavam rejeição em transplantados ou transfundidos eram determinados por sorologia, através do uso de anticorpos anti-HLA. Nomenclatura foi estabelecida para diferenciar os antígenos que iam sendo descobertos. O desenvolvimento de novas metodologias baseadas em PCR trouxe a possibilidade de analisar quais moléculas HLA podem ser expressas em um indivíduo, com base na sequência dos genes HLA genotipados. Dentre as metodologias podemos citar: PCR sequência-específico (PCR-SSP); PCR com posterior hibridização com oligonucleotídeos sequência-específicos (sondas) (PCR-SSOPH); genotipagem por sequenciamento (SBT), PCR em tempo real (qPCR) (REINTON *et al.*, 2006) e dissociação de alta resolução (HRM), que pode detectar diferenças de um nucleotídeo

entre sequências de DNA submetidas a curva de dissociação. Essas metodologias tornaram-se importantes ferramentas na genotipagem de alelos HLA, diminuindo assim, o laborioso trabalho de identificação de antígenos HLA por sorologia (PICASCIA *et al.*, 2016). Esses testes podem ser empregados na genotipagem de alelos HLA-DQA1 e DQB1 associados com a Doença Celíaca (DC).

Olerup e colaboradores (1993) foram os pioneiros na genotipagem de alelos HLA por meio de PCR-SSP. Esta técnica permitiu que testes de compatibilidade para transplantes e transfusões fossem realizados com mais celeridade, confiabilidade dos resultados e diminuindo as incertezas geradas através da realização de sorologia para detecção de antígenos HLA. As técnicas desenvolvidas por Olerup e colaboradores (1993) também permitiram, através da genotipagem de alelos HLA por PCR-SSP, a identificação de alelos HLA que codificam para as moléculas de MHC-II HLA-DQ2 (SOLLID *et al.*, 1989) e HLA-DQ8 (SPURKLAND *et al.*, 1992; SPURKLAND *et al.*, 1997) as quais estão intimamente relacionados ao desenvolvimento da DC. Até então, a presença das moléculas de MHC-II HLA era sorologicamente definidas por meio de teste laborioso e não tão específico, utilizando anticorpos na detecção destas moléculas na superfície de células (BOZÒN *et al.*, 1996). Além disso, constantes revisões eram feitas nas nomenclaturas das moléculas reconhecidas por esses anticorpos para evitar resultados ambíguos (MARSH *et al.*, 2005). A técnica de PCR-SSP trouxe rapidez para a realização de testes de compatibilidade para transfusões, transplantes e determinação de genes relacionados à doenças, assim como possibilitou a genotipagem de genes polimórficos como são aqueles do MHC.

Entretanto, a técnica PCR-SSP precisa de muitos passos para preparação de material e posterior amplificação do fragmento de DNA de interesse. Além disso, o material amplificado necessita ser aplicado em gel de agarose, corado com brometo de etídio, um intercalante de DNA com alto potencial carcinogênico, e visualizado sob luz ultravioleta (UV). Esta luz UV é uma radiação ionizante que se não manipulada com os devidos cuidados de biossegurança, pode causar desestruturação química em nível de DNA. Sacchetti *et al.* (2001) exploraram a técnica de PCR-SSP na análise da frequência de alelos HLA-DQ em pacientes celíacos e controles. O objetivo principal dos referidos autores era simplificar os passos necessários para amplificação de alelos HLA-DQ predisponentes à DC e garantir a sensibilidade e especificidade do método empregado. Karell e colaboradores (2003) foram os primeiros a realizar extensivo trabalho na determinação da frequência de HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em pacientes celíacos de

população Européia (Finlândia, França, Itália, Noruega, Suécia e Inglaterra) utilizando metodologias que se baseiam na amplificação de DNA por PCR-SSP. Os dados levantados por Karell e colaboradores (2003) ainda servem de referência para análises populacionais relacionados com os genótipos HLA-DQ2 e DQ8 (TINTO *et al.*, 2015).

#### **3.10.4. Risco genético associado à HLA-DQ2 e HLA-DQ8**

Indivíduos que possuem o alelo DQB1\*02 em homozigose estão em grupo de maior risco de desenvolvimento da DC (MEGIORNI *et al.*, 2009) e pode se apresentar em HLA-DQ2.5/DQ2.5 (homozigose), HLA-DQ2.5/DQ2.2 (heterozigose) ou mesmo em HLA-DQ2.2/DQ2.2 (homozigose) (KARELL *et al.*, 2003). O risco aumentado de desenvolvimento da DC baseado na homozigose do alelo DQB1\*02 é explicado pela teoria da dose-dupla do alelo DQB1\*02. Tal teoria se baseia no fato de que as duas cópias deste alelo têm potencial para gerar o dobro de moléculas de MHC-II HLA-DQ2 quando comparado à presença de apenas uma cópia do alelo DQB1\*02 o que poderia intensificar a apresentação antigênica via APC e a resposta imunológica mediada pelos linfócitos T (ABADIE *et al.*, 2011). Quando a homozigose do alelo DQB1\*02 está relacionada com a presença de HLA-DQ2.5, o risco se torna maior do que aquele relacionado com a homozigose do alelo DQB1\*02 em HLA-DQ2.2 (PIETZAK *et al.*, 2009). Tal fato foi observado em população pediátrica (LIONETTI *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014). O risco associado com HLA-DQ2.5 (homozigose) também é maior do que aquele relacionado à presença de HLA-DQ8 (homo ou heterozigose) e HLA-DQ2.2 (homo ou heterozigose) (PIETZAK *et al.*, 2009; LIONETTI *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014).

A genotipagem dos alelos HLA-DQA1 e DQB1 que compõe HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 e HLA-DQ8 tem sido usada na prática clínica. Megiorni e colaboradores (2009) propuseram um modelo de cálculo de risco genético para desenvolvimento da DC baseado em dados levantados sobre a frequência de alelos HLA-DQ predisponentes à DC em pacientes e em controles na população italiana. Os dados levantados foram aplicados em população de risco que inclui, dentre outros, parentes de primeiro grau de celíacos.

Parentes de primeiro grau de celíacos compõem um dos grupos de maior risco de desenvolvimento da DC com prevalência que ultrapassa 4 % (DOGAN *et al.*, 2012), maior do que a registrada para a população mundial que é de 1 % (GUJRAL., 2012). No

Brasil, a prevalência de DC entre parentes de primeiro grau de celíacos varia de 4,2 a 11,5 % (CASTRO-ANTUNES *et al.*, 2011) com incidência no Distrito Federal (DF) estimada em 8 casos por 205 parentes de primeiro grau (UENISHI *et al.*, 2014). Para melhor acompanhamento deste e outros grupos de risco, ferramentas são necessárias para acompanhar, de forma mais efetiva quais deles possuem maior risco de desenvolver a DC.

Dados recentes gerados por *Genomic Wide Association* (GWAS) evidenciaram pelo menos 26 *loci* não HLA que estão relacionados na imunopatologia da DC (TRYNKA *et al.*, 2011; DUBOIS *et al.*, 2010) somando assim mais de 40 *loci*, incluindo aquele relacionado aos alelos HLA, que estão fortemente associados ao desenvolvimento da DC (TRYNKA *et al.*, 2011). A maioria desses *loci* contém genes que estão relacionados com funções do sistema imunológico (DUBOIS *et al.*, 2010) (ver figura 2). Entretanto, esses novos *loci* encontrados por GWAS explicam 13,7% da variação genética da DC (TRYNKA *et al.* 2011), e modificam, de forma sutil, o risco genético associado à presença de genes HLA no desenvolvimento da DC. Sendo assim, a análise de risco genético para desenvolvimento da DC é baseado apenas em HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 e HLA-DQ8 (MEGIORNI *et al.*, 2009).

A ocorrência de DC em indivíduos que não possuem os alelos HLA-DQ predisponentes é incomum (KARELL *et al.*, 2003). Entretanto, apenas a presença de HLA-DQ2 e HLA-DQ8 não é o suficiente para saber se o indivíduo que os possuem irão, ou não, desenvolver a DC, uma vez que estão presentes em 30-50 % da população geral mundial e apenas 3-5 % irão desenvolvê-la (SOLLID; LIE, 2005). A genotipagem de alelos HLA-DQ predisponentes à DC em população de risco (parentes de primeiro grau, DM1, SD dentre outras) é uma ferramenta poderosa para monitorar os indivíduos que estão sobre maior risco desenvolvimento da DC. Esta ferramenta também evidencia aqueles indivíduos com tem probabilidade de desenvolver a DC próximo de zero, visto que seu valor preditivo negativo (VPN) é próximo de 100% (MEGIORNI; PIZZUTI, 2012). A genotipagem de alelos HLA predisponentes à DC também tem sido usada como um fator prognóstico da gravidade da DC (MURRAY *et al.*, 2007; BIAGI *et al.*, 2012) e como elemento acessório no diagnóstico de casos difíceis de diagnosticar (HADITHI *et al.*, 2007).

A genotipagem de alelos HLA-DQ para determinar o risco de desenvolvimento da DC tem sido extensivamente discutida e sua aplicação prática ainda não está clinicamente definida. Estes testes genéticos tornam a probabilidade de desenvolver a

DC próxima de zero em cerca de 60 % da população de risco. Esses testes auxiliam o médico a decidir sobre a realização periódica de exames sorológicos em grupos de risco e a identificar indivíduos com alto risco de desenvolver a DC, os quais necessitarão de seguimento clínico e exames periódicos. Este protocolo diminuirá o período entre o surgimento da doença, diagnóstico e tratamento, o que possibilita intervenção médica mais rápida e diminui a morbidade e mortalidade associadas com a DC.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo Geral**

- Sugerir um gradiente de risco genético, baseado em alelos HLA-DQ predisponentes à DC (HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 e HLA-DQ8) aplicável à população brasileira

### **4.2. Objetivos específicos**

- Identificar HLA-DQ2 e HLA-DQ8 por meio da técnica de qPCR
- Confirmar HLA-DQ2 e HLA-DQ8 obtidos por qPCR utilizando técnica de PCR-SSP e identificar homo e heterozigose do alelo DQB1\*02 ( $\beta$ 2), HLA-DQ2.5 (*Cis* e *Trans*) e HLA-DQ2.2
- Calcular o risco de desenvolver a DC baseados nos genótipos e alelos HLA-DQ predisponentes à DC

## 5. METODOLOGIA

### 5.1. Aprovação da Pesquisa

Esta pesquisa seguiu os princípios éticos propostos na declaração de Helsinki (2008) e na legislação brasileira, e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde (CEP-FS), onde está registrado sob o número CEP 070/06 (Anexo I). Pacientes e controles que concordaram em participar do estudo, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

### 5.2. Pacientes celíacos e controles

Este estudo retrospectivo inclui pacientes celíacos atendidos durante período entre 2006 e 2014 no ambulatório de Doença Celíaca do Hospital Universitário de Brasília (HUB), e diagnosticados no Laboratório de Pesquisas em Doença Celíaca da Universidade de Brasília (UnB) segundo critérios da ESPGHAN (WALKER-SMITH *et al.*, 1990; HUSBY *et al.*, 2012).

Neste trabalho de caso-controle, foram incluídos 237 pacientes celíacos (167 do sexo feminino e 73 do sexo masculino com idade variando entre 1 e 75 anos, média  $21.5 \pm 16.2$  anos no diagnóstico) confirmados pela presença de marcadores sorológicos e biópsia intestinal

O grupo controle foi constituído por 237 indivíduos (167 do sexo feminino e 73 do sexo masculino com idade variando entre 1 e 75 anos, média  $18.5 \pm 16.14$  anos da data de coleta) e pertencem à mesma região geográfica dos pacientes celíacos, com similar condição socioeconômica, são indivíduos presumivelmente saudáveis e sem relatos de doenças autoimunes. Pacientes e controles foram pareados por idade, sexo, condição socioeconômica e região onde habita.

Todos os controles realizaram testes sorológicos, a saber: anticorpos IgA anti-transglutaminase (QUANTA Lite™ h-tTG IgA ELISA, INOVA Diagnostic, Inc, San Diego, CA – USA) e anticorpos IgA anti-endomísio (INOVA Diagnostic *Werfen company*) e tiveram resultado negativo para ambos os testes.

### 5.3. Coleta, processamento e armazenamento de material biológico

Foram coletados 6 mL de sangue de cada paciente em dois tubos distintos de 3 mL, conforme os critérios descritos pela norma técnica H3-A6 do *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI) que estabelece os critérios adequados para a coleta de sangue. O sangue foi coletado em tubo com gel separador e em tubos com anticoagulante EDTA, segundo norma técnica H21-A5 do CLSI, que trata sobre coleta, transporte e processamento de amostras de sangue. Os soros coletados em tubos com gel separador foram centrifugados à 5000 rpm por 5 minutos e posteriormente utilizados para a realização dos testes sorológicos IgA-htTG e IgA-EMA, enquanto o sangue total coletado em tubos com EDTA foram estocados à 8 °C por um período máximo de 7 dias, até a extração de DNA. O DNA extraído foi armazenado a -20 °C até a realização das técnicas de genotipagem dos alelos HLA para Doença Celíaca.

### 5.4. Pesquisa de anticorpos IgA anti-transglutaminase humana (htTG-IgA) - ELISA

A presença de anticorpos IgA-htTG no soro dos pacientes e controles desta pesquisa foi realizada no analisador de imunoensaio totalmente automatizado Best 2000 (Inova Diagnostics, Inc. San Diego, CA - USA), empregando a metodologia de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA), usando o *Kit* comercial (IgA-htTG QUANTA Lite™, Inova Diagnostics, Inc. San Diego, CA - USA), e seguindo as recomendações do fabricante.

No início do ensaio, 100 µL de tampão fosfato (PBS) pH 7,0 foram adicionados em cada um dos dois primeiros poços destinados ao branco da amostra e 100 µL por poço de controle positivo alto, positivo baixo e controle negativo foram adicionados em duplicata nos poços subsequentes da placa sem diluição prévia. Em seguida as amostras de pacientes a serem analisadas foram diluídas na razão de 1:100 em solução de tampão fosfato (PBS), e foram pipetadas 100 µL nos poços subsequentes da placa sensibilizada com htTG e incubada à temperatura 37 °C por 30 minutos.

Em seguida, a placa foi lavada por 3 vezes com 300 µL/poço de tampão de lavagem (tampão fosfato com 0,05 % de *tween* 20). Na etapa subsequente, 100µL de conjugado (anticorpos anti-IgA de cabra marcados com peroxidase) foram adicionados à placa e incubado à temperatura de 37 °C por 30 minutos; outro ciclo de lavagens foi

aplicado à placa, como descrito anteriormente, para remover conjugado não ligado. Para revelar indiretamente a presença ou ausência de anticorpos IgA anti-htTG na placa de ELISA, 100µL de substrato (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina - TMB) foi adicionado à placa que novamente foi incubada por 30 minutos à temperatura 37 °C e ao abrigo da luz.

Finalmente, 100µL de solução de parada (ácido sulfúrico 1 N) foram adicionados a cada poço da placa. Logo em seguida, foi realizada leitura em espectrofotômetro empregando filtro com comprimento de onda de 450 nm e filtro de referência de 620 nm. Para o cálculo dos resultados o equipamento plotou uma regressão não linear considerando para obtenção do resultado, a D.O. da amostra dividido pela D.O. do controle positivo baixo, e este valor foi multiplicado pelo valor do controle positivo baixo e expresso em unidades (U). Resultados com valores inferiores a 20 U foram considerados negativos e resultados superiores a 21 U foram considerados positivos.

### **5.5. Pesquisa de anticorpos IgA anti-endomísio (EMA-IgA) – Imunofluorescência Indireta**

As amostras de soro dos pacientes e controles foram submetidas ao teste IgA-EMA (IgA-EMA Inova Diagnostics, *Werfen company*) que tem sensibilidade e especificidade maior que o teste IgA-htTG para o diagnóstico da DC. O teste foi realizado seguindo as recomendações do fabricante. O soro de cada paciente foi diluído (1:10) em tampão fosfato (PBS pH 7,2) e 50 µL de cada diluição foi incubada sobre uma secção criostática de esôfago de primata, fixada em lâmina, por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente (18-28°C). Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3x com tampão PBS.

Após a lavagem, as lâminas foram incubadas nesse mesmo tampão por 5 minutos, e 30 µL do anticorpo de detecção ou conjugado (anticorpo anti-IgA humano marcado com Isotiocianato de Fluoresceína - FITC) foram adicionados a cada secção criostática de esôfago de primata previamente incubadas com soro de cada paciente. Nova incubação foi realizada em câmara úmida e escura por mais 30 minutos à temperatura ambiente.

Após incubação, novas lavagens com tampão PBS foram realizadas, como descrito anteriormente. As lâminas foram secas e montadas com meio de montagem e



lamínula. As mesmas foram analisadas por microscopia de fluorescência no microscópio Carl Zeiss *Microscopy* Axiophot 2 (Jena, Alemanha) com filtro de excitação 495 nm e emissão 515 nm, e observadas em aumento de 400 x. Os resultados foram analisados por dois examinadores independentes.

Foram considerados EMA positivos os testes que apresentaram fluorescência de coloração verde-maçã observada nos espaços entre as fibras de musculatura lisa (endomísio), a ausência desta fluorescência foi considerada como teste negativo de EMA (figura 3).

## 5.6. Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de leucócitos presentes no sangue total coletado em EDTA através de *Kit* comercial (Illustra™ Blood genomicPrep Mini Spin, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) seguindo as recomendações do fabricante.

As amostras de sangue coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA e armazenadas a 8 °C foram colocadas a temperatura ambiente. Em seguida, 1 mL de sangue total foi transferido para tubo cônico de 15 mL e a ele foi adicionado 3 mL de tampão *Red Blood Cell lysis* (RBC). As amostras foram homogeneizadas por 30 s em agitador mecânico e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente a essa etapa, as amostras foram centrifugadas a 4500 rpm por 2 minutos.

Após a centrifugação duas fases foram obtidas, um *pellet* no fundo do tubo onde encontra-se o material genético e o sobrenadante, composto de restos celulares, proteínas e plasma sanguíneo. O sobrenadante foi descartado por meio de inversão do tubo e o *pellet* foi ressuspendido por meio de agitação mecânica sendo posteriormente transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo 400 µL de tampão de lise e 25 µL de proteinase K (20mg/ml), e homogeneizados em agitador mecânico por 15 segundos.

Estas amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos com intermitente agitação mecânica e o lisado celular foi transferido para coluna com membrana de sílica e centrifugado à 12,000 x g por 1 minuto. Em seguida foi adicionado 500 µL de tampão de lise à coluna e uma nova centrifugação foi realizada como na etapa anterior.

A purificação do DNA foi seguida pela adição de 500 µL de tampão de lavagem contendo álcool etílico (80%) e centrifugação à 12,000 x g por 3 minutos. Cada coluna de sílica, agora com DNA purificado, foi transferida para microtubo de 2 mL estéril e

foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de tampão Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) pré-aquecido à 70 °C, em seguida as amostras foram centrifugadas à 12,000 x g por 1 minuto.

### **5.7. Análise do DNA extraído**

A concentração de DNA genômico foi determinada através do equipamento *Nanovue Plus* (GE Healthcare, UK) por meio de leitura espectrofotométrica nas densidades óticas (DO) 260 e 280 nm. A pureza do material genômico foi considerada adequada quando a razão destas densidades óticas ( $A_{260}/A_{280}$ ) estava entre 1,8 e 2,0. Foi feita uma alíquota do DNA genômico de cada paciente e de cada controle e ajustada para a concentração final de 20 ng/ $\mu\text{L}$ . O restante do DNA foi armazenado em criotubos e congelado à - 20 °C.

### **5.8. Genotipagem de alelos HLA-DQ predisponentes à DC**

#### **5.8.1. Pesquisa de alelos HLA-DQ por qPCR**

*Primers* desenhados e validados para PCR-SSP por Olerup *et al.* (1993) foram utilizados em qPCR (Applied Biosystems-Life Technologies<sup>TM</sup>, Carlsbad, CA, USA), método sensível, específico e rápido, que não exige eletroforese em gel de agarose para se determinar a presença ou ausência de sequências de DNA. A tabela 3 mostra a sequência dos *primers* usados e suas principais características.

**Tabela 3** - *Primers* para alelos HLA-DQ e do gene HGH, suas sequências, conteúdo das bases GC, tamanho do fragmento em pares de base (pb) e respectivas temperatura de dissociação

Alelos/ Gene	<i>Primer</i>	Sequência (5' → 3')	GC (%)	Temperatura de dissociação (°C)	Fragmento (pb)
HLA-DQ2	<sup>1</sup> DQA1*05 – F	ACGGTCCCTCTGGCCAGTA	63,1	60,6	186
	<sup>1</sup> DQA1*05 – R	AGTTGGAGCGTTTAATCAGAC	42,8	52,8	
	<sup>1</sup> DQB1*02 – F	GTGCGTCTTGTGAGCAGAAG	55,0	56,4	205
	<sup>1</sup> DQB1*02 – R	GCAAGGTCGTGCGGAGCT	66,6	61,1	
HLA-DQ8	<sup>1</sup> DQA1*03 – F	TTCACTCGTCAGCTGACCAT	50,0	56,1	183
	<sup>1</sup> DQA1*03 – R	CAAATTGCGGGTCAAATCTTCT	40,9	54	
	<sup>2</sup> DQB1*03:02 – F	GCGCGTGCCTTGTGACC	68,4	62,4	127
	<sup>2</sup> DQB1*03:02 – R	CTGTTCCAGTACTCGGCGGCA	61,9	61,7	
HGH	<sup>2</sup> HGH – F	5'GCCTTCCCAACCATTCCCTTA	52,4	57,3	439
	<sup>2</sup> HGH – R	5'TCACGGATTTCTGTTGTGTTT	38,0	52,7	

GC (%) – Conteúdo de guanine (G) e citosina (C), em porcentagem; HGH – Hormônio do crescimento; F – *Forward*; R – *Reverse*; pb – pares de base. 1 – Olerup *et al.*, 1993. 2 – Profaizer *et al.*, 2011.

*Primers*, DNA e *MasterMix* foram misturados na seguinte proporção: 1 µL do *primer forward* (10 nM), 1 µL do *primer reverse* (10 nM), 10 µL de SYBR Green I *MasterMix* (2x), e adicionados de 6 µL de água ultra-pura e 2 µL de DNA (20 ng/µL) totalizando 20 µL de reação. As reações foram realizadas em placa de 48 poços (*Applied Biosystems*). Tanto o alelo de interesse quanto o controle interno (HGH) foram testados em triplicata para cada paciente. Amostra de água (controle de contaminação) e um controle positivo (amostra de DNA de paciente positivo para o alelo testado) também foram incluídos na placa para observar o correto funcionamento da reação e da máquina de qPCR. Cada placa de qPCR foi centrifugada a 1500 rpm por 1 minuto e colocada no *StepOne Applied Biosystems* nas condições descritas na tabela 4 e naquelas descritas por Profaizer e colaboradores (2011) para o alelo DQB1\*03:02.

**Tabela 4** - Condições de temperatura, tempo e quantidade de ciclos programados em qPCR para amplificação de alelos HLA-DQ associados com a Doença Celíaca e do gene HGH

DQA1*05, DQB1*02, DQA1*03 e HGH			
Parâmetro	Temperatura	Tempo	Ciclos
Aquecimento	95°C	10min	1
Desnaturação	95°C	15 segundos	32
Anelamento e extensão	60°C	60 segundos	
Curva de dissociação	*60 à 95°C (~0,3°C)	-	1

\* Na curva de dissociação a temperatura aumenta de 60 a 95°C através do aumento gradual de 0,3°C e concomitante leitura da intensidade do sinal emitido pelo corante SYBR *Green*. Adaptado de Selleski *et al.*, 2015.

O resultado foi gerado e visualizado no programa *StepOne™ and StepOnePlus™ Software* através da análise das curvas de dissociação dos produtos de PCR gerados. O corante SYBR Green I liga-se aos produtos de PCR gerados em cada poço da placa, quando estão na forma de dupla fita. Estes produtos vão desnaturando à medida que a temperatura aumenta (de 60 °C até 95 °C com aumentos sucessivos de 0,3 °C) com consequente desligamento do corante SYBR Green I. Com o aumento da temperatura a dupla fita separa-se e o corante desliga-se do DNA diminuindo, assim, a intensidade do seu sinal luminoso. A máquina coleta estas informações e as transforma em um gráfico. Os picos, pontos de inflexão de cada gráfico, mostram a temperatura de dissociação dos fragmentos gerados para cada alelo testado (figura 6).

A amplificação do alelo DQB1\*03:02 (cadeia  $\beta$  do DQ8) (tabela 3 e figura 5) foi realizada por meio da técnica de *touchdown-PCR* (KORBIE e MATTICK, 2008) utilizando *primers* e condições de ciclagem desenvolvidos por Prof. Faizer e colaboradores (2011) (tabela 5). *Primer* descrito por Olerup *et al.* (1993) para amplificar o alelo DQB1\*03:02 não foi utilizado neste trabalho, pois amplificava também o alelo DQB1\*03:03 (sorologicamente denominado DQ9). O alelo DQB1\*03:03 não está relacionado com a DC e pode ser encontrado na população brasileira. Hauache e colaboradores (2005) encontraram o referido alelo em 7 % de grupo controle saudável brasileiro (n = 75) (HAUACHE *et al.*, 2005). A utilização de *primer* para amplificação de DQB1\*03:02 (OLERUP *et al.*, 1993) pode trazer possíveis vieses na determinação real da frequência deste alelo em pacientes celíacos e controles do Distrito Federal - DF.

**Tabela 5** - Condições de temperatura, tempo e quantidade de ciclos programados em qPCR para amplificação do alelo DQB1\*03:02 que codifica a cadeia  $\beta$  da molécula de MHC-II DQ8

DQB1*03:02			
Parâmetro	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Aquecimento	95	10 min	1
Desnaturação	95	20 segundos	
Anelamento	71	60 segundos	2
Extensão	72	10 segundos	
Desnaturação	95	20 segundos	
Anelamento	70	45 segundos	10
Extensão	72	10 segundos	
Desnaturação	95	20 segundos	
Anelamento	69	45 segundos	5
Extensão	72	10 segundos	
Desnaturação	95	20 segundos	
Anelamento	67	45 segundos	5
Extensão	72	10 segundos	
Desnaturação	95	20 segundos	
Anelamento	66	45 segundos	10
Extensão	72	10 segundos	
Desnaturação	95	20 segundos	
Anelamento	65	45 segundos	2
Extensão	72	10 segundos	
Curva de dissociação	*60 à 95°C (~0,3°C)	-	1

\* Na curva de dissociação a temperatura aumenta de 60 a 95°C através do aumento gradual de 0,3°C e concomitante leitura da intensidade do sinal emitido pelo corante SYBR *Green*. Adaptado de Profaizer *et al.*, 2011.

### 5.8.2. Pesquisa de alelos HLA-DQ por Reação em Cadeia de Polimerase sequência específico (PCR-SSP)

A amplificação dos alelos DQA1\*05, DQA1\*02:01, DQB1\*02, DQA1\*03 e DQB1\*03:02 foi realizada em *Kit* comercial DQ-CD *Typing plus* (BioDiagene® Palermo, Italy) e seguiu as recomendações do fabricante. O *Kit* determina a homozigose do alelo DQB1\*02 além das combinações alélicas em haplótipos relacionados com a

DC. O *kit* utiliza a técnica de PCR-SSP (*sequence specific primers*) em condições próprias de temperatura e tempo de ciclagem de acordo com as instruções do fabricante.

As reações foram realizadas em Termociclador Gradiente MyGenie 96 (BiONEER, Alameda, CA, EUA). Os produtos de PCR gerados foram misturados com tampão de amostra e aplicados em gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). As amostras foram submetidas a corrente elétrica de 100 Volts (V) por 1 hora em cuba de eletroforese utilizando tampão Tris, Borato e EDTA (TBE) 1x. Posteriormente à corrida, o gel de agarose foi exposto à luz ultravioleta (UV) em transiluminador (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EUA) para visualização e registro. Todas as amostras foram documentadas por meio de foto digital através do programa Alpha Proview (Alpha Innotech, San Leandro, CA, EUA) para registro e análise.

### 5.9. Análise Estatística

Celíacos e controles foram categorizados de acordo com seu genótipo HLA-DQ. Para comparar a frequência de indivíduos dentro dessas categorias e entre elas, foi usado o teste do qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e o teste exato de Fisher. Os resultados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ . O modelo de cálculo de risco utilizado neste trabalho foi baseado em estudo publicado por Megiorni *et al.* (2009), os quais representaram o grau de risco como 1:N. Essa relação é interpretada como o número de indivíduos saudáveis (N) dentre os quais há risco de um indivíduo afetado estar presente. A análise foi realizada considerando prevalência presumida de 1:100 na população geral brasileira. Para cada categoria de HLA-DQ aqui descrita, N foi calculado como a porcentagem de controles encontrada em uma categoria HLA-DQ multiplicado por 100 e dividido pela porcentagem de pacientes encontrada na mesma categoria HLA-DQ.

**Fórmula para cálculo de risco genético:** 
$$N = \frac{\% \text{ de controles} \times 100}{\% \text{ de pacientes celíacos}}$$

### 5.10. Nomenclatura

Nomenclatura de alelos do gene HLA-DQ foi simplificada neste trabalho para melhor adequação à interpretação, análise e apresentação dos resultados gerados, assim como para facilitar o entendimento da aplicação dos dados apresentados aqui na prática

clínica. Neste estudo classificamos os pacientes celíacos e controles quanto ao número de cópias do alelo DQB1\*02. Aqueles com apenas uma cópia desse alelo foram classificados como  $\beta 2/x$ . E aqueles com a presença de duas cópias do alelo DQB1\*02 foram classificados como  $\beta 2/\beta 2$ .

Quando HLA-DQ2.5 estava em homozigose foi nomeado como DQ2.5/DQ2.5 ( $\beta 2/\beta 2$ ). Quando HLA-DQ2.5 estava em heterozigose, foi nomeado DQ2.5/DQ2.2 ( $\beta 2/\beta 2$ ) se associado com HLA-DQ2.2, DQ2.5/DQ8 ( $\beta 2/x$ ) se associado com HLA-DQ8 e foi nomeado DQ2.5 ( $\beta 2/x$ ) *Cis* quando associado a alelos HLA-DQ não predisponente à DC. Quando os alelos DQA1\*05 e DQB1\*02 estavam, respectivamente, em HLA-DQ7.5 e em HLA-DQ2.2, nomeamos esse arranjo DQ2.5 ( $\beta 2/x$ ) *Trans*. Quando HLA-DQ2.2 estava em homozigose foi nomeado como DQ2.2/DQ2.2 ( $\beta 2/\beta 2$ ) e quando em heterozigose com HLA-DQ diferente de HLA-DQ2.5 e HLA-DQ8 foi nomeado HLA-DQ2.2/X ( $\beta 2/x$ ).

Quando HLA-DQ8 estava em heterozigose com HLA-DQ diferente de HLA-DQ2.5 e HLA-DQ2.2 foi nomeado DQ8/X. Quando o alelo DQA1\*05 estava associado com HLA-DQ8 foi nomeado DQ8/ $\alpha 5$ . Quando apenas os alelos DQA1\*05, ou DQA1\*03 ou DQB\*02 estavam presentes foram nomeados como  $\alpha 5$ ,  $\alpha 8$  e  $\beta 2$ , respectivamente.

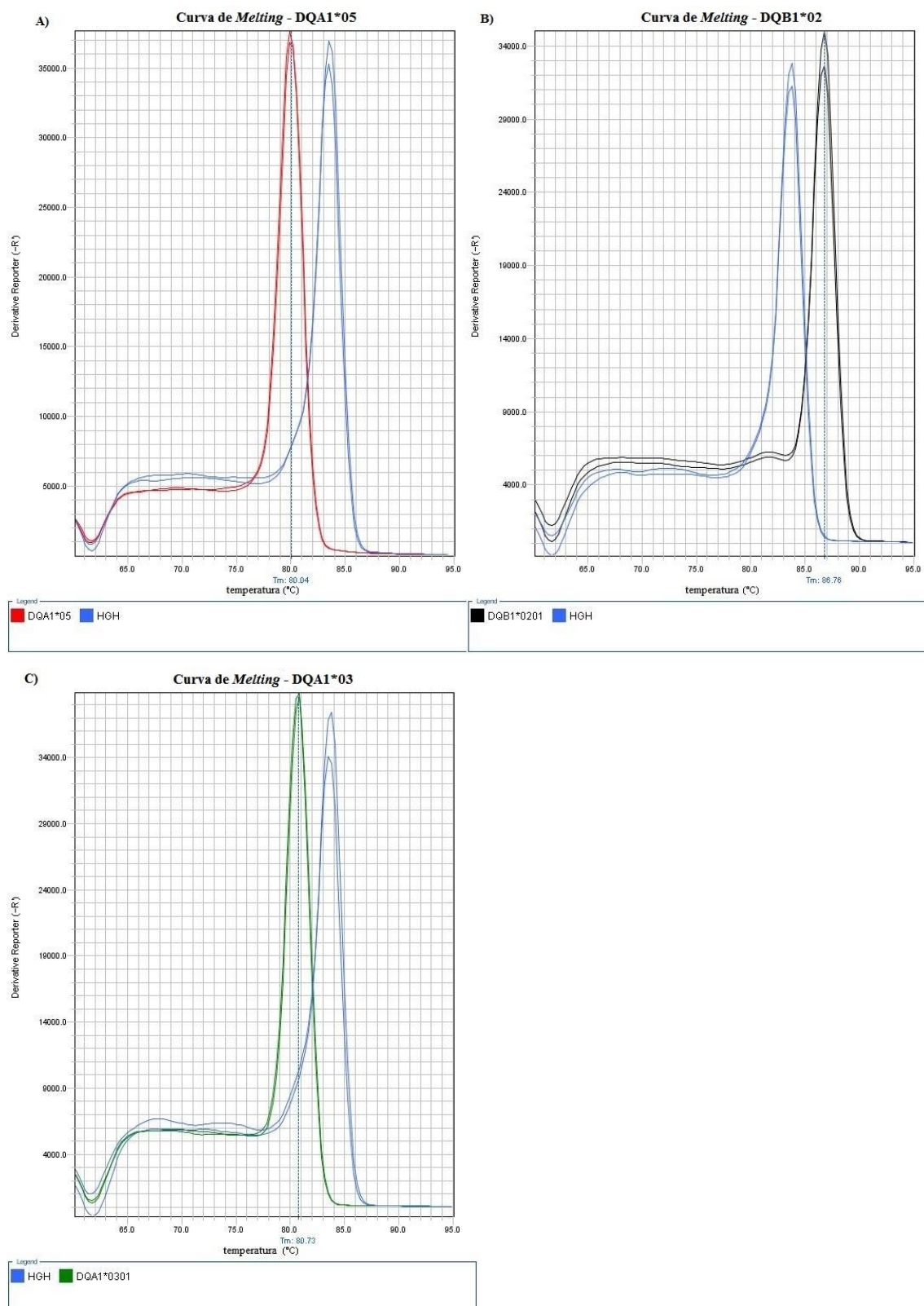
Se nenhum alelo predisponente à DC fosse encontrado em pacientes celíacos e controles, eram nomeados como “ausente”. A nomenclatura “X” e “x” referem-se respectivamente, a haplótipos HLA e alelos HLA-DQ não determinados.

## 6. RESULTADOS

Pacientes diagnosticados como celíacos tiveram níveis de anticorpos anti-transglutaminase IgA (IgA-htTG) acima do valor de *cut-off* ( $> 20$  U) estabelecido pelo *Kit*. A pesquisa de anticorpos EMA-IgA foi feita em todos esses pacientes e mostrou positivo para o teste. Biópsia intestinal foi realizada em todos os pacientes celíacos que apresentaram anticorpos anti-endomísio IgA e evidenciou padrão histológico compatível com aquele esperado para a DC (figura 4). A pesquisa de anticorpos anti-transglutaminase IgA e anti-endomísio IgA foi realizada nos controles, e todos apresentaram níveis de anticorpos IgA-htTG abaixo do valor de *cut-off* ( $< 20$  U) e resultado negativo para imunofluorescência.

Todos os pacientes e controles foram submetidos à genotipagem por qPCR de alelos dos genes HLA-DQA1 e DQB1 predisponentes à DC de acordo com o protocolo estabelecido por Selleski *et al.*, (2015). Os resultados foram avaliados de acordo com a análise da curva de dissociação para cada alelo HLA-DQ analisado (Figura 6).

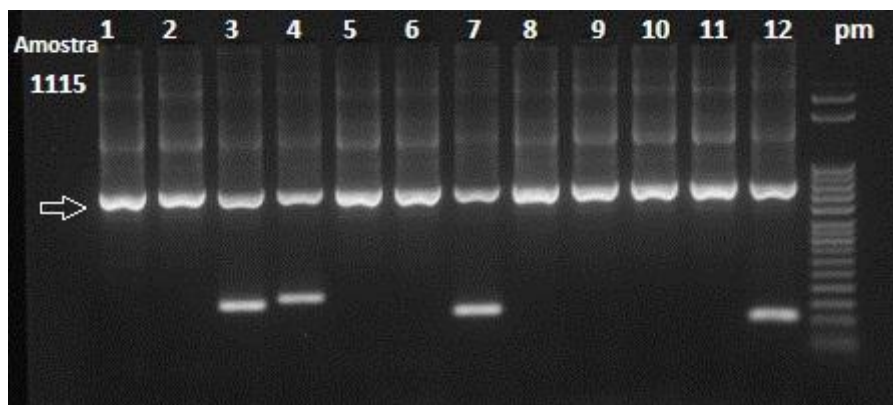




**Figura 6** – Curva de dissociação de produtos de qPCR gerados a partir de *primers* usados na pesquisa. A) alelo DQA1\*05, temperatura de dissociação  $80,04 \pm 0,1$  °C, B) DQB1\*02, temperatura de dissociação  $86,76 \pm 0,13$  °C e C) DQA1\*03, temperatura de dissociação  $80,73 \pm 0,11$  °C. Produtos gerados por *primers* para o gene HGH (Hormônio do crescimento humano) são vistos em A, B e C no pico de cor azul (temperatura de dissociação  $83,5 \pm 0,1$ °C).

Para obtermos informações detalhadas sobre a presença, arranjo e distribuição dos alelos HLA-DQ predisponentes à DC, utilizamos o *kit* comercial DQ-CD Typing Plus (BioDiagene<sup>®</sup>, Palermo, Italy) nos pacientes e controles. As seguintes informações foram obtidas com o *kit* citado, a saber: homozigose do alelo DQB1\*02 (haplótipos DR3-DQ2.5/DR3-DQ2.5, DR3-DQ2.5/DR7-DQ2.2 e DR7-DQ2.2/DR7-DQ2.2); disposição dos alelos que compõem HLA-DQ2.5 seja em *cis*, no haplótipo DR3-DQ2.5/X, ou em *trans*, no haplótipo DR5-DQ7.5/DR7-DQ2.2; e para evidenciar a presença de HLA-DQ2.2. As informações obtidas por meio da técnica de qPCR foram confirmadas por meio dos resultados gerados no *kit* comercial. Os resultados de ambas as técnicas foram 100 % compatíveis.

A figura 7 mostra exemplo de resultado do teste genético (DQ-CD Typing plus, BioDiagene<sup>®</sup> Palermo, Italy) obtido a partir da amostra de paciente celíaco. A presença de duas bandas nas colunas 3, 4 e 7 da figura 7, indica a presença do controle interno da reação (fragmento de 796 pb) e dos alelos DQA1\*05, DQB1\*02 e DRB1\*03, respectivamente, indicando o haplótipo DR3-DQ2.5, comumente encontrado entre pacientes celíacos. A presença de duas bandas na coluna 12 (figura 7) indica a presença de controle interno da reação (fragmento de 796 pb) e a presença da outra banda (fragmento de 111 pb) indica que o indivíduo genotipado não é homozigoto para o alelo DQB1\*02.



**Figura 7** – Resultado da análise de DNA genômico humano quanto à presença ou ausência de alelos HLA-DQ e HLA-DR predisponentes à DC e quanto à homozigose do alelo DQB1\*02. Seta - banda única de 796 pares de base (pb) representando controle interno; PM – peso molecular (50 pb); coluna 1 – DQA1\*02 (170 pb), coluna 2 - DQA1\*03 (183 pb), coluna 3 - DQA1\*05 (186 pb), coluna 4 – DQB1\*02 (205 pb), coluna 5 – DQB1\*03:01/04 (250 pb), coluna 6 – DQB1\*03:02 (119 pb), coluna 7 – DRB1\*03 (151 pb), coluna 8 – DRB1\*04 (260 pb), coluna 9 – DRB1\*07 (237 pb), coluna 10 – DRB1\*11 (176 pb), coluna 11 – DRB1\*12 (248 pb), coluna 12 – primer que identifica homozigose do alelo DQB1\*02 (111 pb). A presença de duas bandas na coluna 12, controle interno mais banda de 111 pb, indica amostra não homozigota para o alelo DQB1\*02. A presença de apenas uma banda, referente ao controle interno, indica amostra homozigota para o alelo DQB1\*02.

### 6.1. Resultados gerados PCR em tempo real (qPCR)

A técnica de qPCR permitiu identificar a presença de HLA-DQ2.5 e HLA-DQ8 e alelos  $\alpha 5$ ,  $\alpha 8$  e  $\beta 2$  em paciente e controles (Tabela 6). Entre os celíacos, aqueles que apresentaram HLA-DQ2.5 e/ou HLA-DQ8 somaram 94,52 % (n=224) e entre os controles 35,44 % (n=84). O alelo  $\beta 2$  estava presente em 3,38 % dos pacientes (n=8) e em 16,03 % dos controles (n=38).

A concomitância de HLA-DQ2.5/DQ8 foi relatada em 8,86 % dos pacientes (n=21) e em 1,69 % dos controles (n=4). Já a combinação  $\beta 2$ /DQ8 foi encontrada em 6,33 % (n=15) dos pacientes e em 2,53 % dos controles (n=6). HLA-DQ2,5, sem o HLA-DQ8, estava presente em 75,10 % dos pacientes (n=178) e em 16,03 % dos controles (n=38) (tabela 6).

HLA-DQ8 (HLA-DQ8 e HLA-DQ8/ $\alpha 5$ , ver tabela 6), sem estar associado com HLA-DQ2.5 ou com o alelo  $\beta 2$ , foi encontrada em 4,22 % (n=10) dos pacientes e 15,19 % (n=36) dos controles. Dentre os pacientes e controles que não possuíam os heterodímeros citados acima, estão, respectivamente: 1,27 % (n=3) *versus* 20,25 % (n=48) apenas com  $\alpha 5$ ; 0,42 % (n=1) *versus* 1,27 % (n=3) com  $\alpha 5/\alpha 8$  o qual foi incluído

no grupo  $\alpha 5$  (Tabela 6); 0,00 % (n=0) *versus* 2,95 % (n=7) apenas com  $\alpha 8$ . Indivíduos que não possuíam nenhum dos alelos predisponentes à DC eram 0,84 % dos pacientes (n=2) e 25,32 % dos controles (n=60).

**Tabela 6** – Frequência e porcentagem de genótipos HLA-DQ associados com a Doença Celíaca em pacientes e controles

HLA-	Frequência		Porcentagem (%)	
	Pacientes	Controles	Pacientes	Controles
DQ2.5	178	38	75,10	16,03
DQ2.5/DQ8	21	4	8,86	1,69
$\beta 2$ /DQ8	15	6	6,33	2,53
$\beta 2$	8	38	3,37	16,03
DQ8	9	26	3,80	10,97
DQ8/ $\alpha 5$	1	10	0,42	4,22
$\alpha 5$	3	48	1,27	20,25
$\alpha 8$	0	7	0,00	2,95
Ausente	2	60	0,84	25,32
<b>Total</b>	<b>237</b>	<b>237</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

**Legenda:**  $\alpha 5$  – DQA1\*05 sem o alelo DQB1\*02;  $\beta 2$  – DQB1\*02 sem o alelo DQA1\*05;  $\alpha 8$  – DQA1\*03 sem o alelo DQB1\*03:02; **DQ2.5** – DQA1\*05 com o alelo DQB1\*02; **DQ8** – DQA1\*03 com o alelo DQB1\*03:02; Ausente – ausência dos alelos predisponentes à DC.

## 6.2. Resultados gerados por meio do *Kit* DQ-CD Typing Plus (BioDiagene<sup>®</sup>, Palermo, Italy)

O *Kit* DQ-CD Typing plus permitiu verificar as combinações mais frequentes dos alelos HLA-DQ predisponentes à DC, assim como seus haplótipos e a homozigose do alelo DQB1\*02.

A presença de HLA-DQ2.5/DQ2.2/DQ8 foi avaliada em pacientes e controles. Pacientes e controles que partilhavam da mesma categoria HLA-DQ predisponente à DC foram separados em grupos específicos de acordo com o disposto na tabela 7. A presença de HLA-DQ2.5 e/ou HLA-DQ8 foi de 94,52 % (n=224) entre os pacientes e de 35,44 % entre os controles (n=84). HLA-DQ2.2, seja em homozigose ou em heterozigose e sem estar associado com HLA-DQ2.5 ou HLA-DQ8, estava presente em 3,37 % dos pacientes (n=8) e em 16,03 % dos controles (n=38). A concomitância HLA-

DQ2.5/DQ8 foi relatada em 8,86 % dos pacientes (n=21) e em 1,69 % dos controles (n=4). Já a concomitância de HLA-DQ2.2/DQ8 foi encontrada em 6,33 % (n=15) dos pacientes e em 2,53 % dos controles (n=6). HLA-DQ2.5 sem HLA-DQ8 estava presente em 75,11 % dos pacientes (n=178) e em 16,03 % dos controles (n=38) (tabela 7).

A homozigose do alelo DQB1\*02, que confere maior risco de desenvolvimento da DC, pode ser observada em dois genótipos distintos: em HLA-DQ2.5/DQ2.5 ( $\beta 2/\beta 2$ ), foram encontrados 6,33 % de celíacos (n=15) e apenas um controle 0,42 % (n=1); HLA-DQ2.5/DQ2.2 ( $\beta 2/\beta 2$ ) foram encontrados 25,32 % de celíacos (n=60) e 2,53 % de controles (n=6) (tabela 7). HLA-DQ2.2/DQ2.2 ( $\beta 2/\beta 2$ ), foi encontrado em 0,84 % de celíacos (n=2) e 2,11 % de controles (n=5) (tabela 7).

HLA-DQ8 (que inclui DQ8/ $\alpha 5$ ), sem a presença de HLA-DQ2.5 e HLA-DQ2.2, somavam 4,22 % dos celíacos (n=10) e 15,19 % dos controles (n=36). Dentre os pacientes e controles que não possuíam os alelos HLA de risco (HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 e/ou HLA-DQ8) encontramos, respectivamente: 1,27 % (n=3) *versus* 20,25 % (n=48) apenas com  $\alpha 5$ ; 0,00 % (n=0) *versus* 2,95 % (n=7) apenas com  $\alpha 8$ . Indivíduos que não possuíam nenhum dos alelos predisponentes à DC eram 0,84 % dos pacientes (n=2) e 25,32 % dos controles (n=60) (tabela 7).

**Tabela 7** – Frequências HLA-DQ predisponentes à DC em pacientes e controles, valor de  $p$  e risco geral de desenvolvimento da DC baseado em prevalência presumida de 1:100

<b>Genótipo</b>	<b>Status</b>	<b>DC</b>	<b>Controle</b>	$P_{DC/controlado}$	<b>Risco Geral</b>	
<b>HLA</b>	<b>DQB1*02</b>	<b>(n = 237)</b>	<b>(n = 237)</b>		<b>1:100</b>	
DQ2.5/DQ2.5	( $\beta 2/\beta 2$ )	6,33% (15)	0,42% (1)	0,0004	1:7	
DQ2.5/DQ2.2	( $\beta 2/\beta 2$ )	25,31% (60)	2,53% (6)	<0.0001	1:10	
DQ2.5/DQ8	( $\beta 2/x$ )	8,86% (21)	1,69% (4)	0.0007	1:19	
DQ2.5	( $\beta 2/x$ )	<i>Trans</i>	10,55% (25)	2.11% (5)	0.0002	1:20
		<i>Cis</i>	32,91% (78)	10,97% (26)	<0.0001	1:30
DQ2.2/DQ8	( $\beta 2/x$ )	6,33% (15)	2,53% (6)	0.0718	1:40	
DQ2.2/DQ2.2	( $\beta 2/\beta 2$ )	0,84% (2)	2,11% (5)	0.4496	1:251	
DQ8/X	-	3,80% (9)	10,97% (26)	0.0043	1:289	
DQ2.2/X	( $\beta 2/x$ )	2,53% (6)	13,92% (33)	0.0001	1:550	
DQ8/ $\alpha 5$	-	0,42% (1)	4,22% (10)	0.0108	1:1005	
$\alpha 5$	-	1,27% (3)	20,25% (48)	<0.0001	1:1594	
Ausente	-	0,84% (2)	25,32% (60)	<0.0001	1:3014	
$\alpha 8$	-	0,00% (0)	2,95% (7)	0.0149	ND	

ND – risco não determinado; DC – Doença Celíaca;  $\beta 2$  se refere a DQB1\*02;  $\alpha 5$  se refere a DQA1\*05;  $\alpha 8$  se refere a DQA1\*03:01; x representa alelo do gene DQB1 não determinado em cromossomo homólogo;  $\beta 2/\beta 2$  se refere a homozigose de DQB1\*02;  $\beta 2/x$  se refere a heterozigose do alelo DQB1\*02; valor de  $P$ .

Todos os paciente identificados como  $\beta 2/DQ8$  em qPCR (tabela 6) foram genotipados em *Kit* comercial como HLA-DQ2.2/DQ8 ( $\beta 2/x$ ) (tabela 7). A maioria dos pacientes e controles identificados como  $\beta 2$  (DQB1\*02) em qPCR (tabela 6) foram genotipados como HLA-DQ2.2 ( $\beta 2/x$  ou  $\beta 2/\beta 2$ ) (tabela 7) em *kit* comercial, com excessão de dois controles e um paciente (6,52 % do total de sujeitos da pesquisa – pacientes celíacos e controles) (tabela 6) que apresentaram, em ambas as técnicas, apenas o alelo  $\beta 2$ . Estes três pacientes foram novamente genotipados em *kit* comercial e obtivemos o mesmo resultado, presença exclusiva de DQB1\*02 ( $\beta 2$ ) dentre os alelos HLA-DQ testados. Para fins de cálculo de risco, tais indivíduos foram incluídas na categoria DQ2.2 ( $\beta 2/x$ ) (tabela 7).

### 6.3. Combinações alélicas não esperadas dentro de haplótipos e suas inclusões em categorias HLA-DQ

Em virtude de forte desequilíbrio de ligação encontrado entre alelos DQA1, DQB1 e DRB1, espera-se encontrar estes alelos em haplótipos já associados com a DC (figura 5). Entretanto, foram encontradas combinações não esperadas desses alelos em determinados haplótipos. Os indivíduos com tais combinações foram incluídos nas categorias HLA-DQ listadas na tabela 7, de acordo com a presença de alelos em comum que codificam mesmo molécula de MHC-II, seja HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 ou HLA-DQ8 e de acordo com a presença ou ausência de homozigose do alelo DQB1\*02. Na categoria DQ2.5 ( $\beta 2/x$ ) *Cis* (Tabela 7), cinco pacientes e dois controles DR3-DQ2.5/X possuíam, também, o alelo DQB1\*03:01/04. Na categoria DQ2.5 ( $\beta 2/x$ ) *Trans* (Tabela 7), foram incluídos seis pacientes e dois controles X/DR7-DQ2.2 onde este X representa haplótipo composto pelos alelos DRB1\*xx-DQA1\*05-DQB1\*03:01/04 sem o alelo DRB1\*11/12 frequentemente encontrado com o haplótipo DR5-DQ7.5. Por terem os alelos que codificam HLA-DQ2.5 e por estes alelos estarem na posição *Trans* (um alelo em cada cromossomo do par 6), foram incluídos na referida categoria. Várias combinações alélicas foram incluídas na categoria DQ2.5 ( $\beta 2/x$ ) *Cis*: haplótipo X/X e respectivos alelos DRB1\*xx-DQA1\*05-DQB1\*02/DRB1\*xx-DQA1\*03:01-DQB1\*03:01/04 (n=1 paciente *versus* n=1 controle); DR3-DQ2.5/X com DQA1\*03 (n=2 pacientes *versus* n=1 controle); DR3-DQ2.5/DR4-DQ7.3 sendo que este DR4 foi genotipado como DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:01/04 e é sorologicamente denominado DR4-DQ7.3 (n=3 controles); DR5-DQ7.5/DR7-DQ2.3 sendo este DR7 genotipado como DRB1\*07-DQA1\*03:01-DQB1\*02 (n=1 controle) e é sorologicamente denominado DR7-DQ2.3; DR5-DQ7.5/DR4-DQ2.3 sendo que este DR4 foi genotipado como DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*02 (n=1 controle) e é sorologicamente denominado DR4-DQ2.3; e DR5-DQ7.5/X-DQ2.3 onde X representa o haplótipo DRB1\*xx-DQA1\*03:01-DQB1\*02. Na categoria DQ2.2 ( $\beta 2/x$ ) (Tabela 7), foram incluídos um paciente e dois controles com apenas o alelo DQB1\*02 sem nenhum outro alelo HLA-DQ predisponente.

As seguintes combinações alélicas foram incluídas na categoria  $\alpha 5$  (Tabela 7): DR5-DQ7.5/X (n=1 paciente); um paciente DRB1\*xx-DQA1\*05-DQB1\*03:01/04 (DR5-DQ7.5 sem DRB1\*11/12); DR5-DQ7.5/X com DQA1\*03 (n=1 paciente) e DR5-DQ7.5/DR4-DQ7.3 (n=3 controles). Este DR4 foi genotipado como DRB1\*04-

DQA1\*03:01-DQB1\*03:01/04 (DR4-DQ7.3). As seguintes combinações alélicas foram incluídas na categoria DQ2.2 ( $\beta$ 2/x) (Tabela 7): X/X sendo que foi encontrado apenas um alelo HLA-DQ predisponente a DC, a saber DQB1\*02 (n=1 paciente *versus* n=2 controles); DR7-DQ2.2/X (n=2 controles) e DR7-DQ2.2/DR4-DQ7.3 (n=1 paciente *versus* n=4 controles). Este DR4 foi genotipado como DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*03:01/04 (DR4-DQ7.3), com exceção de um controle genotipado como DRB1\*04-DQA1\*03:01-DQB1\*02 (DR4-DQ2.3). Foram incluídas na categoria DQ8 ( $\alpha$ 5) (Tabela 7): DR5-DQ7.5/DR4-DQ8 (n=1 paciente *versus* n=4 controles) e X/DR4-DQ8 (n=6 controles) onde este X representa DRB1\*xx-DQA1\*05-DQB1\*03:01/04 (DQ7.5 sem DRB1\*11/12). Foram incluídas no grupo DQ2.2/DQ8 ( $\beta$ 2/x) (Tabela 7): DR4-DQ8/X com o alelo DQB1\*02 (n=1 paciente *versus* n= 2 controles).

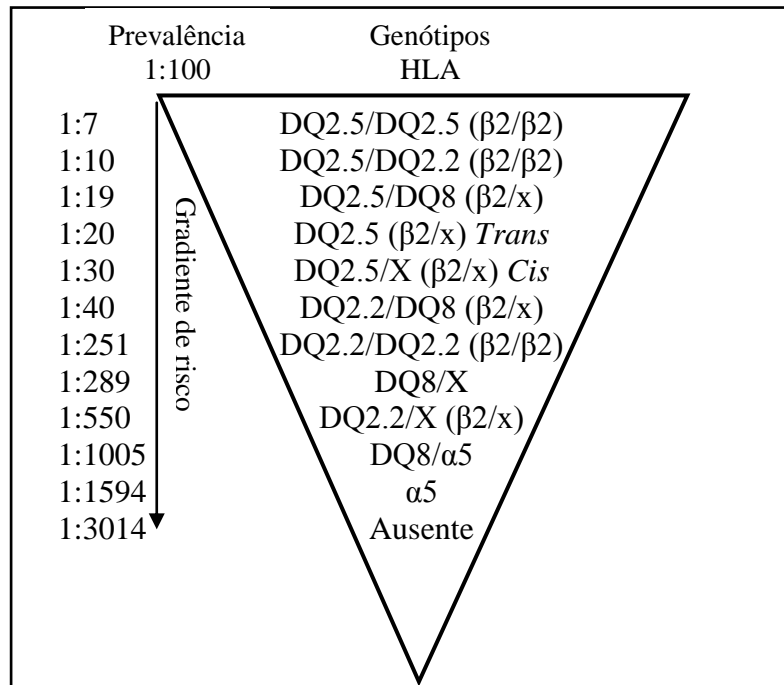
#### 6.4. Risco genético baseado em alelos HLA-DQ predisponentes à DC

A comparação entre as frequências dos alelos HLA-DQ predisponentes à DC entre celíacos e controles permitiu estabelecer um gradiente de risco para várias categorias HLA listadas aqui (Figura 8). Os maiores riscos estão associados com a homozigose do alelo DQB1\*02 em HLA-DQ2.5/DQ2.5 e HLA-DQ2.5/DQ2.2 (Figura 8). HLA-DQ2.5/DQ2.5 ( $\beta$ 2/ $\beta$ 2) demonstrou o maior risco de desenvolvimento da DC sendo 1:7 ( $p < 0.0001$ , OR 15,95 95%, CI 2,08-121,8). HLA-DQ2.5/DQ2.2 apresentou o segundo maior risco sendo 1:10 ( $p < 0,0001$ , OR 13,05 95%, CI 5,51-30,9). O risco associado à presença concomitante de HLA-DQ2.5/DQ8 foi de 1:19 ( $p=0.0007$ ; OR 5.66 95%, CI 1.91-16.77). As configurações *trans* (haplótipo DR5-DQ7.5/DR7-DQ2.2) e *cis* (haplótipo DR3-DQ2.5/X) referentes a HLA-DQ2.5 ( $\beta$ 2/x) (Tabela 7) mostraram riscos diferentes, sendo 1:20 ( $p=0.0002$ ; OR 5.47 95%, CI 2.05-14.55) e 1:30 ( $p < 0.0001$ ; OR 4.35 95%, CI 2.59-7.30), respectivamente.

HLA-DQ2.2/DQ8 possui risco de 1:40 ( $p=0.0718$ ; OR 2.60 95%, CI 0.9913-6.826). O risco associado com HLA-DQ2.2/DQ2.2 ( $\beta$ 2/ $\beta$ 2), homozigoto, foi 1:251 ( $p=0,4496$ ; OR 0,39 95%, CI 0.075-2.06) mas sem diferença estatisticamente significativa. Já HLA-DQ2.2 ( $\beta$ 2/x), heterozigoto, mostrou risco de 1:550 ( $p < 0.0001$ ; OR 0,16 95%, CI 0.066-0.39). O risco associado com a presença isolada de HLA-DQ8, sem nenhum outro alelo HLA-DQ predisponente à DC, foi de 1:289 ( $p=0.0043$ ; OR 0.32 95% 0.146-0.699). Entretanto, quando HLA-DQ8 estava associado com DQA1\*05 (DQ8 ( $\alpha$ 5)), o risco diminuiu significativamente para 1:1005 ( $p=0.0108$ ; OR 0,096 95%



0.0122-0.758). As demais categorias mostraram risco de 1:1594 para  $\alpha 5$  ( $p < 0.0001$ ; OR 0,0504 95%, CI 0.0154-0.1647), 1:3014 na ausência de alelos HLA-DQ susceptíveis à DC ( $p = < 0.0001$ ; OR 0,024 95%, CI 0.005922-0.1018) e não determinado para  $\alpha 8$ .



**Figura 8** – Gráfico de risco baseado em combinação haplotípica de alelos HLA-DQ predisponentes à DC considerando prevalência presumida de 1:100.  $\beta 2$  se refere ao alelo DQB1\*02;  $\alpha 5$  se refere ao alelo DQA1\*05; “x” se refere a alelo não determinado pelos primers aqui utilizadas; indivíduos com apenas uma cópia do alelo DQB1\*02 foram classificadas como  $\beta 2/x$  (heterozigoto); indivíduos com duas cópias do alelo DQB1\*02 foram classificados como  $\beta 2/\beta 2$  (homozigoto); *Trans* e *Cis* indicam, respectivamente, a posição dos alelos  $\alpha 5$  e  $\beta 2$  em cromossomos diferentes ou no mesmo cromossomo dentro do par 6.

## 7. Discussão

Com o advento de técnicas mais sensíveis, específicas e rápidas para amplificação e detecção de DNA (Reação em cadeia de polimerase em Tempo Real - qPCR), a técnica de PCR-SSP tem se tornado laboriosa e pouco prática para análises de genótipos, polimorfismos (SNP – *Single-Nucleotide Polymorphism*) e identificação de novos locos associados com doenças (TRYNKA *et al.*, 2011) em grande número de amostras. A técnica de qPCR é vantajosa pois a amplificação do DNA e a análise do resultado desta amplificação ocorre em ambiente herméticamente fechado, sem a necessidade posterior de manipulação dos produtos amplificados por PCR (REINTON *et al.*, 2006). Assim, a técnica de qPCR para amplificação de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 descrita neste trabalho foi utilizada para otimizar os trabalhos de genotipagem desses alelos e para atender a uma demanda em expansão no Laboratório Interdisciplinar de Biociências da Faculdade de Medicina (LABIBC/FM – Universidade de Brasília).

Nossos dados demonstram que a técnica de qPCR descrita aqui pode ser usada para fins de genotipagem de pacientes, grupos de risco e população geral. Por meio da comparação entre os resultados gerados por qPCR e aqueles gerados por meio de *kit* comercial, foi possível observar que 100 % dos pacientes e controles triados como HLA-β2/DQ8 (tabela 6) foram genotipados como HLA-DQ2.2/DQ8 (β2/x) em *kit* comercial (tabela 7) e que 93,48 % daqueles genotipados apenas como β2 em qPCR (tabela 6) também o foram como HLA-DQ2.2 (β2/x) ou HLA-DQ2.2 (β2/β2) em *kit* comercial (tabela 7). Entretanto, algumas limitações têm surgido ao uso desta técnica: não foi possível detectar a homozigose do alelo DQB1\*02, importante fator na análise do risco genético para desenvolver a DC, e nem diferenciar os arranjos possíveis para HLA-DQ2.5, que pode ser herdado em *Cis* ou em *Trans* (figura 5). A análise do risco genético associado a cada um desses dois arranjos mostrou diferença estatisticamente significativa (tabela 7 e figura 8), sendo assim os dados gerados por qPCR não seriam suficientes para diferenciar os riscos associados nestas duas categorias.

Embora essas limitações sejam consideráveis a fim de determinar o risco genético de desenvolver a DC, os resultados mostrados (tabela 6) nos permitem, com segurança, utilizar a técnica de qPCR para genotipagem de pacientes celíacos, grupos de risco e população geral em larga escala. Os resultados gerados podem ser analisados e uma triagem pode ser feita. Aqueles indivíduos cujos genótipos/alelos detectados por

qPCR não são suficientes para classificá-los dentro de um grupo de risco genético (tabela 7), devem ser genotipados em *kit* comercial para obter detalhes como homozigose do alelo  $\beta 2$  e arranjo *Cis* e *Trans* de HLA-DQ2.5 ( $\beta 2/x$ ).

Outros trabalhos baseados na técnica de qPCR também simplificaram a genotipagem dos alelos predisponentes à DC (REINTON *et al.*, 2006; PROFAIZER *et al.*, 2011). Reinton e colaboradores (2006), por meio da combinação de *primers* e sondas TaqMan<sup>®</sup> em linhagens celulares, validaram técnica de amplificação dos alelos DQA1\*05 ( $\alpha 5$ ), DQB1\*02 ( $\beta 2$ ) e DQB1\*03:02 em alta resolução, comparando os resultados gerados em qPCR com aqueles em *kit* comercial. Entretanto, muitos *primers* e sondas são requeridos para diminuir a ambiguidade de resultados entre alelos HLA com poucas ou mesmo uma diferença na sequência de nucleotídeos. Profaizer e colaboradores (2011), utilizando qPCR e análise de curva de dissociação, também avaliaram a presença dos alelos DQA1\*05 ( $\alpha 5$ ) em 111 amostras, DQB1\*02 ( $\beta 2$ ) em 109 amostras e DQB1\*03:02 em 131 amostras de indivíduos previamente genotipados por meio da técnica PCR-SSOPH para alelos HLA-DQA1 e DQB1, e validaram a técnica de amplificação de alelos HLA-DQ susceptíveis à DC. *Primer* para amplificação do alelo DQB1\*03:02 descrito por Profaizer e colaboradores (2011) foi utilizado em nosso estudo e validado por *kit* comercial em amostras de DNA de pacientes e controles.

Para disponibilizar dados mais completos sobre a frequência de HLA-DQ2.5/DQ8/DQ2.2 em pacientes celíacos e controles brasileiros, utilizamos *kit* comercial DQ-CD Typing Plus (BioDiagene<sup>®</sup>, Palermo, Italy) (tabela 7). Este *kit* fornece informações como: homozigose do alelo DQB1\*02 (haplótipos DR3-DQ2.5/DR3-DQ2.5, DR3-DQ2.5/DR7-DQ2.2 e DR7-DQ2.2/DR7-DQ2.2); disposição dos alelos que compõem HLA-DQ2.5 seja em *cis*, no haplótipo DR3-DQ2.5/X, ou em *trans*, no haplótipo DR5-DQ7.5/DR7-DQ2.2; e presença de HLA-DQ2.2 em homozigose (haplótipo DR7-DQ2.2/DR7-DQ2.2) ou em heterozigose (haplótipo DR3-DQ2.5/DR7-DQ2.2, DR7-DQ2.2/DR4-DQ8 ou DR7-DQ2.2/X). O *kit* utilizado também permitiu evidenciar combinações de alelos não esperadas para os haplótipos estudados. Este grupo soma pequena parcela do tamanho amostral deste trabalho e são coerentes com os achados em outros trabalhos de frequência de HLA-DQ2.5/DQ2.2/DQ8 (MEGIORNI *et al.*, 2009; TINTO *et al.*, 2015). Estas combinações não comuns foram incluídas nas categorias HLA-DQ relacionadas na tabela 7, de acordo com a similariedade de alelos que possuíam com a respectiva categoria em que foram inseridas.

A distribuição de HLA-DQ2 (que inclui HLA-DQ2.5 e HLA-DQ2.2) e HLA-DQ8 e respectivos alelos elencados neste trabalho mostra dados robustos em amostra representativa da população celíaca e controles brasileiros. Apesar da grande diversidade étnica entre as distintas macro-regiões do Brasil, a frequência dos diferentes genótipos que predisõem a DC, de maneira geral, foi relativamente estável. HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8 estão presentes em 93,1 % dos pacientes celíacos em região do nordeste do Brasil, onde a miscigenação de europeus com Africanos e Ameríndios foi mais intensa (CASTRO-ANTUNES *et al.*, 2011). No sul do Brasil, 91,1 % da população auto-declarada de descendência europeia possui estes genótipos (KOTZE *et al.*, 2014). No Centro-oeste (Distrito Federal), onde este estudo foi conduzido, 94,52 % da população de Brasília apresentava estes genótipos. Tais dados evidenciam a importância destes genótipos para o desenvolvimento da DC e mostram padrão de frequência comparável aos dados gerais da Europa (KARELL *et al.*, 2003). Informações sobre a frequência destes genótipos em população celíaca e em controles nos permitem, dentre outras possibilidades, calcular o risco genético de desenvolver a DC.

A prevalência de HLA-DQ2 dentre pacientes celíacos foi estabelecido para a região sul (65,3 %) (KOTZE *et al.*, 2014), nordeste (68,5 %) (CASTRO-ANTUNES *et al.*, 2011) e centro-oeste brasileiro (DF) (75,11 %). É interessante notar que há uma prevalência consideravelmente maior de HLA-DQ2 no centro oeste do que aquela registrada para população de descendência europeia do sul do Brasil. A população do DF é considerada representativa da população brasileira devido à forte migração dos vários estados brasileiros para a capital, tornando sua população geneticamente heterogênea (LINS *et al.*, 2010). O sul do Brasil é marcado por forte descendência italiana e alemã (ALVES-SILVA *et al.*, 2000; PENA *et al.*, 2011). A prevalência de HLA-DQ2 em DC italianos chega a 78,2 % (MEGIORNI *et al.*, 2009) o que não justificaria frequência encontrada no sul do Brasil menor do que a do DF. Entretanto, a região sul do Brasil possui forte descendência alemã e HLA-DQ2 possui frequência menor na Alemanha do que na Itália (TEUFEL *et al.*, 2006). Visto que a prevalência do genótipo HLA-DQ2 na população alemã é menor do que a registrada para a Itália (MUSTALAHTI, *et al.*, 2010; MEGIORNI *et al.*, 2009), é possível que a frequência desse genótipo na região sul do Brasil seja realmente menor do que a registrada para o centro-oeste.

A baixa frequência de HLA-DQ2 corrobora para a baixa prevalência de DC encontrada na população alemã (0,3 %) (MUSTALAHTI *et al.*, 2010) quando

comparado àquela da população geral dos países europeus e Estados Unidos (1 %) (FASANO *et al.*, 2003; LIONETTI; CATASSI., 2014). Entretanto, países como Finlândia e Suécia que tem prevalências de DC de 2-3 % possuem frequência de HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e consumo de glúten similar aos registrados na Alemanha, evidenciando que outros fatores estão relacionados com a baixa prevalência de DC dentre alemães (MUSTALAHTI., 2010; IVARSSON *et al.*, 2013). A miscigenação registrada para o sul do Brasil, entre europeus e seus descendentes, ameríndios e afrodescendentes poderia ter diminuído a prevalência de HLA-DQ2 dentre os celíacos do sul do Brasil. Embora a prevalência de DC pareça ser maior entre europeus, em decorrência da alta frequência de HLA-DQ2 e HLA-DQ8 registrada para esta população (KARELL *et al.*, 2003), a prevalência de DC na região sul do Brasil, onde predomina população descendente de europeus, é menor do que a registrada para o centro-oeste (DF) (PEREIRA *et al.*, 2006; PRATESI *et al.*, 2003). Dados mais robustos sobre prevalência de DC e HLA-DQ2 e HLA-DQ8 ainda precisam ser levantados para a região sul do Brasil.

Alta prevalência de DC foi registrada para a região nordeste do Brasil (Recife) (TREVISIOL *et al.*, 2004) de 1,92 %. Entretanto, esse dado parece estar superestimado, visto que a prevalência de HLA-DQ2 (principal fator de risco genético) na região é menor do que a registrada para o centro-oeste (DF) e sul do Brasil e principalmente porque a região tem forte descendência afrodescendente e ameríndia (PENA *et al.*, 2011; CASTRO-ANTUNES *et al.*, 2011). Muito embora dados sobre a frequência de HLA-DQ2 e HLA-DQ8 não tenham sido levantados em afrodescendentes e ameríndios brasileiros, estudos tem demonstrado que a DC não foi registrada em população ameríndia do sul do Brasil (UTIYAMA *et al.*, 2010) e nem tampouco em afrodescendentes brasileiros oriundos de remanescentes de quilombolas (ALMEIDA *et al.*, 2012).

A frequência de HLA-DQ8, dentre os pacientes celíacos, foi estabelecida para o centro-oeste (DF) (10,55 %), para a região sul (11,9 %) (KOTZE *et al.*, 2014), e para o nordeste brasileiro (17,8%) (CASTRO-ANTUNES *et al.*, 2011). A frequência de HLA-DQ8 no DF foi considerado somando-se HLA-DQ8, HLA-DQ8/α5 e HLA-DQ2.2/DQ8 (tabela 7), visto que os trabalhos de frequência de HLA-DQ2 e DQ8, no Brasil, carecem de informações mais precisas sobre a frequência de HLA-DQ2.2 e possíveis combinações com outros genótipos HLA-DQ. A concomitância de HLA-DQ2 e HLA-

DQ8, em população celíaca, foi encontrada em 6,8 % no nordeste, 8,86 % no centro-oeste (DF) e em 13,9 % no sul do Brasil.

A prevalência de HLA-DQ8 em pacientes celíacos do nordeste brasileiro é maior do que aquela das regiões sul e centro-oeste (DF). A provável explicação é a origem diferenciada desta região em relação ao sul e centro-oeste do Brasil, cuja miscigenação entre afrodescendentes, ameríndios e Europeus foi mais intensa (PENA *et al.*, 2011). Os dados levantados sobre a prevalência do HLA-DQ8 dentre pacientes celíacos para a região centro-oeste e sul do Brasil são similares com os dados gerados no Chile (ARAYA *et al.*, 2015), em torno de 11 % de prevalência deste genótipo. Já em população de forte descendência ameríndia, como a população *Chaco* registrada na Argentina, alta prevalência de HLA-DQ8 foi relatada entre pacientes celíacos (MOTTA *et al.*, 2014). Esses dados corroboram que a alta prevalência de HLA-DQ8 dentre pacientes celíacos no nordeste brasileiro, possa estar relacionado com a contribuição ameríndia na formação de sua população, que foi maior do que a registrada para as regiões sul e centro-oeste (DF) (PENA *et al.*, 2011). 4,22% dos pacientes celíacos (n=10) *versus* 15,2% dos controles (n=36), na população de Brasília, possuem HLA-DQ8 sem HLA-DQ2.5 ou HLA-DQ2.2 (Tabela 7), levemente diferente da registrada para pacientes celíacos do norte e sul da Europa que foi de 5,25% (KARELL *et al.*, 2003).

Tinto e colaboradores (2015), em análise retrospectiva de genótipos HLA-DQ predisponentes à DC em 5535 italianos que compunham grupo de risco (parentes de primeiro grau de celíacos e indivíduos com sintomas sugestivos de DC), relataram 666 casos de DC (12 %). Neste grupo de pacientes, foi encontrado 0,3 % com HLA-DQ8 em homozigose e 7 % em heterozigose, um pouco maior do que a registrada para a Europa (KARELL *et al.*, 2003). O baixo índice de homozigotos para HLA-DQ8/DQ8 registrado na Itália está de acordo com trabalhos anteriores (MEGIORNI *et al.*, 2009) e evidenciam que essa combinação haplotípica é rara entre descendentes de europeus. Visto que a composição genética do Brasil é, em sua maioria, de origem europeia (excessão Norte e Nordeste – ALVES-SILVA *et al.*, 2000; PENA *et al.*, 2011), consideramos que a impossibilidade metodológica de genotipagem da homozigose do HLA-DQ8 neste trabalho não tenha prejudicado os resultados observados.

HLA-DQ8, estando ele associado ou não com outros haplótipos e alelos HLA (tabela 7), está presente em 19,41 % (n=46) dos celíacos e em 19,41 % (n=46) dos controles, exatamente a mesma quantidade em ambos os grupos (Tabela 7). O que os

diferença é a frequência de suas combinações entre celíacos e controles. Quando associado com o alelo  $\beta 2$  (DQB1\*02) (DQ2.5/DQ8 ( $\beta 2/x$ ) ou DQ2.2/DQ8 ( $\beta 2/x$ ), tabela 7) é mais frequente entre celíacos e quando não está (DQ8 ou DQ8/ $\alpha 5$ , tabela 7), é mais frequente entre controles. A presença do alelo  $\beta 2$  juntamente com HLA-DQ8 aumentou de 7 a 15 vezes o risco de desenvolver a DC quando comparado com HLA-DQ8 sem o alelo  $\beta 2$  (tabela 7 e figura 8). Tal observação é coerente com o fato de que o alelo  $\beta 2$  confere maior risco de desenvolvimento da DC em virtude do maior repertório de antígenos passíveis de serem apresentados quando comparado com a presença única de HLA-DQ8 (KARELL *et al.*, 2003; MEGIORNI *et al.*, 2009; KARINEN *et al.*, 2006; TOLLEFSEN *et al.*, 2006).

Pacientes e controles genotipados como HLA-DQ2.2 eram 3,37 % celíacos (n=8) *versus* 16,03 % controles (n=38) (Tabela 7). Esta é a primeira descrição deste haplótipo em pacientes celíacos e controles de 1 a 75 anos na população brasileira. Este haplótipo, embora predisponha à DC, não é, sozinho, fator de risco importante na prática clínica devido à baixa estabilidade de ligação a antígenos imunogênicos do glúten, diminuindo, assim a resposta imunológica (BODD *et al.*, 2012; FALLANG *et al.*, 2009), como pode ser observado pela baixa frequência de pacientes celíacos com HLA-DQ2.2 quando comparado com os respectivos controles (tabela 7). Entretanto, quando HLA-DQ2.2 está associado com HLA-DQ2.5 (Tabela 7 e figura 8), constitui importante fator de risco, visto que a homozigose do alelo  $\beta 2$  confere maior risco de desenvolvimento da DC (van BELZEN *et al.*, 2004). Assim, recomenda-se a genotipagem de HLA-DQ2.2 em pacientes e grupos de risco (MUBARAK *et al.*, 2013), pois é considerado, tanto em homozigose quanto em heterozigose, como importante modulador do risco genético associado a DC (ROMANOS *et al.*, 2009). Não há diferença estatisticamente significativa entre pacientes celíacos e controles quanto a frequência e importância clínica da homozigose de HLA-DQ2.2 (tabela 7), evidenciado pelo baixo número de pacientes celíacos dentro desse grupo.

A frequência observada de HLA-DQ2.5 e/ou DQ8 de 35,45 % em grupo controle do DF está de acordo com o esperado para a população geral mundial de 30 % (MEGIORNI; PIZZUTI, 2012). Estes são necessários mas não suficientes para o desenvolvimento da doença, visto que ao menos 3 % da população geral que possui alelos HLA-DQ predisponentes desenvolvam a DC (MEGIORNI; PIZZUTI, 2012). Não há dados robustos sobre a frequência de HLA-DQ2.5/DQ2.2/DQ8 em população geral

brasileira mas sim naqueles relacionados com grupos com maior risco de desenvolver a DC (MARTINS *et al.*, 2010, CASTRO-ANTUNES *et al.*, 2011).

Dentre os pacientes celíacos negativos para HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8, 2,1 % (n=5) apresentaram apenas  $\alpha 5$  ou nenhum genótipo ou alelo HLA predisponente (tabela 7), 20,25 % (n=48) dos controles possuíam apenas  $\alpha 5$  como alelo predisponente e 28.69 % de controles (n=68) não possuíam nenhum alelo predisponente ou apenas  $\alpha 8$  (tabela 7). Ou seja, 48,94 % da população geral do Distrito Federal possui muito baixa probabilidade de desenvolvimento da DC. É relatado que os alelos  $\alpha 5$  e  $\alpha 8$  possuem associação negativa com a o surgimento dessa da DC (KARELL *et al*, 2003; MEGIORNI *et al*, 2009).

Também foi observado na população do DF que 0,84 % dos pacientes celíacos (n=2) e 25,32 % dos controles (n=60) não possuíam nenhum alelo HLA predisponente à DC. Estes dados estão coerentes com literatura internacional. Em população italiana, Megiorni e colaboradores relataram 0,9 % dos pacientes celíacos *versus* 23 % dos controles como desprovidos de alelos HLA-DQ predisponentes à DC (MEGIORNI *et al.*, 2009). Na população do sul da Espanha, Fernández-Cavada-Pollo e colaboradores (2013) relataram 0,8 % celíacos *versus* 24,3 % dos controles sem nenhum dos alelos predisponentes à DC. Embora haja relatos na literatura nacional e internacional sobre celíacos confirmados por biópsia que não possuem nenhum dos genótipos de risco e nem tampouco seus alelos (KOTZE *et al.*, 2014; MARTINS *et al.*, 2010; FERNÁNDEZ-CAVADA-POLLO *et al.*, 2013) é pouco provável que indivíduos, mesmo em grupos de risco, que não possuam HLA-DQ2.5/DQ8/DQ2.2 ou seus alelos venham a desenvolver a DC (KARELL *et al.*, 2003).

É interessante notar que dentro da população brasileira, a frequência de genótipos tão comuns (HLA-DQ2 e HLA-DQ8) sofrem variações consideráveis entre as diferentes regiões do Brasil. A população brasileira é considerada bem heterogênea do ponto de vista genético, resultado do processo de imigração e miscigenação entre três principais etnias que compõe o Brasil: Europeus, Ameríndios e Africanos. Além disso, processos migratórios da Itália, Espanha, Alemanha, Japão, Líbano e Síria também influenciaram o processo de miscigenação racial observado no Brasil. A análise de marcadores genéticos para ancestralidade de uma amostra representativa da população brasileira identificou que a contribuição europeia é a mais intensa na maior parte do país (0,771 %), seguida pela contribuição africana (0,143 %) e ameríndia (0,085 %) (LINS *et al.*, 2010).



Os dados sobre frequência de genótipos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 levantados no Distrito Federal (DF) podem, de maneira geral, representar aqueles dados reais para a população brasileira como um todo, visto que, processos migratórios ocorreram das diversas regiões do Brasil em direção à Brasília durante mais de 50 anos de sua fundação. Atualmente o DF apresenta mais de 2,5 milhões de habitantes (IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística).

A frequência de HLA-DQ2.5/DQ2.2/DQ8, suas combinações e alelos que os compõe, tanto em pacientes celíacos quanto grupo controle, permitiu traçar um gradiente de risco de desenvolver a DC baseado na presença destes genótipos. O modelo utilizado aqui foi o proposto por Megiorni *et al.* (2009) (tabela 7 e figura 8), e que também foi utilizado em trabalho espanhol para determinação de risco genético de desenvolver a DC na Espanha (FERNÁNDEZ-CAVADA-POLLO *et al.*, 2013). A partir deste gradiente de risco é possível monitorar indivíduos que estão em grupos com maior probabilidade de desenvolver a DC (grupos de risco), principalmente, e permite uma avaliação clínica sobre a necessidade da realização periódica de testes sorológicos, a fim de evitar exposição prolongada ao processo autoimune desencadeado pelo glúten, e as possíveis morbidades associadas. Por outro lado, a ausência de alelos HLA-DQ predisponentes à DC em grupos de risco, assim como em população geral, torna a probabilidade de desenvolvimento da DC próxima de zero, o que diminui a necessidade da realização periódica de testes sorológicos para a DC. Os dados gerados neste trabalho nos permitiu categorizar as combinações HLA-DQ com maior risco de desencadear resposta imune contra o glúten (tabela 7, figura 8).

Cálculo de risco genético para DC baseado em genótipos e alelos HLA tem sido usado para dar suporte à prática clínica e evidenciar aqueles indivíduos que possuem maior probabilidade de desenvolver a DC (MEGIORNI *et al.*, 2009). Essa seleção de pessoas com maior risco de desenvolver a DC pode auxiliar na diminuição do tempo entre o surgimento da doença, seu diagnóstico e tratamento, diminuindo assim a morbidade e mortalidade associada. Essa ferramenta tem valor preditivo negativo próximo a 100 %. A presença dos alelos HLA predisponentes à DC explicam 35 % da variação genética associada a DC (KARELL *et al.*, 2003; MEGIORNI *et al.*, 2009), e os mais de 39 alelos não HLA descobertos por GWAS (TRYNKA *et al.*, 2011; DUBOIS *et al.*, 2010) explicam 13,7% da variação genética da DC (TRYNKA *et al.* 2011), modificando sutilmente o risco associado ao seu desenvolvimento (ROMANOS *et al.*,

2009). Outras variantes ainda precisam ser elucidadas para explicar o processo autoimune associado com esta doença.

Considerando a prevalência presumida no DF de 1:100, a presença de HLA-DQ2.5/DQ2.5 ( $\beta 2/\beta 2$ ) se mostrou como a principal combinação HLA-DQ que predispõe à DC (OR: 15,95) com risco de 1:7 (tabela 7 e figura 8). A presença de HLA-DQ2.5/DQ2.2 ( $\beta 2/\beta 2$ ) apresentou o segundo maior risco 1:10 (OR: 15,95) (tabela 7 e figura 8). Megiorni *et al.* (2009) encontraram, em população italiana, alto risco de desenvolver a DC entre aqueles que possuíam HLA-DQ2.5/DQ8 ( $\beta 2/x$ ), com risco 1:7 e, em segundo lugar como genótipo HLA que mais predispõe à DC, HLA-DQ2.5/DQ2.5 ( $\beta 2/\beta 2$ ) com risco 1:10. A dose dupla do alelo  $\beta 2$  é associada com maior risco de desenvolvimento da DC e com maior severidade da doença, principalmente em jovens (KARINEN *et al.*, 2006, PLOSKI *et al.*, 1993). Também foi relatado que a presença de HLA-DQ2.5/DQ2.5 ( $\beta 2/\beta 2$ ) está associada a altas concentrações de anticorpos anti-transglutaminase em crianças, quando comparadas com aquelas HLA-DQ2.5/DQ8 ( $\beta 2/x$ ) (LIU *et al.*, 2014). Em trabalho espanhol, HLA-DQ2.5/DQ2.5 ( $\beta 2/\beta 2$ ) possui o mais elevado risco de desenvolvimento da DC (FERNÁNDEZ-CAVADA-POLLO *et al.*, 2013). Outros trabalhos também têm evidenciado que a homozigose do alelo  $\beta 2$  (DQB1\*02), quando em HLA-DQ2.5/DQ2.5 ( $\beta 2/\beta 2$ ), constitui o mais alto risco de desencadear a DC (LIONETTI *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2014). Os dados apresentados corroboram com os achados sobre risco genético associados a genótipos HLA-DQ para o desenvolvimento da DC em população do DF, Brasil.

Lionetti e colaboradores (2014) estudaram grupo de 832 recém-natos que possuíam pelo menos um parente de primeiro grau com DC, sendo, então, considerados grupo de risco. Os genótipos HLA desses recém-natos foram determinados e exames sorológicos foram realizados, periodicamente, até os dez anos de idade. Após este período, foi demonstrado que 26 % do grupo de sujeitos com genótipo de maior risco (HLA-DQ2.5/DQ2.5 ( $\beta 2/\beta 2$ ) e HLA-DQ2.5/DQ2.2 ( $\beta 2/\beta 2$ ) – tabela 7 e LIONETTI *et al.*, 2014) desenvolveram a DC, ao passo que 16 % do grupo de sujeitos com genótipos considerados de risco médio (HLA-DQ2.5 ( $\beta 2/x$ ), HLA-DQ2.5/DQ8, HLA-DQ8, HLA-DQ2.2 ( $\beta 2/\beta 2$ ) e HLA-DQ2.2 ( $\beta 2/x$ ) – tabela 7 e LIONETTI *et al.*, 2014) desenvolveram a DC. Este estudo evidenciou que HLA-DQ2.5/DQ2.5 ( $\beta 2/\beta 2$ ) e HLA-DQ2.5/DQ2.2 ( $\beta 2/\beta 2$ ) aumentam as chances de desenvolvimento da DC.

Questões são levantadas quanto às razões para que alelos HLA predisponentes à DC ainda se mantenham tão frequentes em população que consome glúten a pelo menos

10,000 anos, visto que a presença desta proteína na alimentação das populações poderia ter exercido pressão negativa na manutenção de alelos HLA predisponentes à DC (CATASSI, 2011). De fato, alelos HLA-DQ estão presentes em 30-40 % da população geral (MEGIORNI; PIZZUTI, 2012) se mostrando frequente nas mais diversas populações (ABADIE *et al.*, 2011).

O cultivo de trigo e outros cereais tem 10,000 anos de história, tendo surgido na região do Oriente Médio (“crescente-fértil”) em região de rápido desenvolvimento socioeconômico. Importantes rios como Tigre e Eufrates permitiram que a agricultura se desenvolvesse na região. Os componentes genéticos de alto risco para desencadear a DC, HLA-DQ2.5/DQ2.5 ( $\beta 2/\beta 2$ ), HLA-DQ2.5/DQ2.2 ( $\beta 2/\beta 2$ ), HLA-DQ2.5/DQ8 ( $\beta 2/x$ ) co-evoluíram juntamente com o consumo de glúten e não sofreram seleção negativa ao longo da história do consumo de grãos contendo glúten esta proteína (LIONETTI; CATASSI, 2014). Lionetti e Catassi (2014) encontraram forte associação entre consumo de glúten e a presença de HLA-DQ predisponentes à DC, além de alta prevalência da DC em regiões do oriente médio, e chamaram a observação feita de “paradoxo evolucionário”.

A DC tem tido rápido aumento de sua prevalência nas várias regiões do mundo (GUANDALINI *et al.*, 2014). É sugerido que a DC tinha baixa prevalência no início do consumo de glúten pelas sociedades, e que esta prevalência tenha aumentado em decorrência de mudanças na quantidade e qualidade do glúten ingerido ao longo desses 10,000 anos de cultivo de cereais, ao processo de fermentação utilizado em massa feita de cereais moídos, mudanças na microbiota intestinal humana e aos padrões de nutrição característicos de cada época da sociedade (CATASSI, 2011; CATASSI *et al.*, 2012), fato que manteve a alta frequência de alelos HLA-DQ predisponentes à DC nas mais diversas populações que consomem glúten.

É sugerido, também, que a manutenção de alelos HLA-DQ predisponentes à DC em populações que consomem glúten a 10,000 anos, não tenham sofrido seleção negativa em detrimento da vantagem seletiva que estes alelos exercem na proteção contra microorganismos. Valarini e colaboradores (2012) avaliaram a associação entre a frequência de alelos HLA-DR e HLA-DQ e a presença de cáries em 164 adolescentes (16-19 anos). Foi observado que adolescentes que possuíam HLA-DQ2 eram menos susceptíveis à cárie do que aqueles que não o possuíam. Os referidos autores não encontraram associação significativa entre a susceptibilidade de desenvolver cáries e o alelo HLA-DR4.

Quando comparamos nossos dados da análise de risco (tabela 7 e figura 8) com aqueles produzidos em população italiana (MEGIORNI *et al.*, 2009), percebemos riscos diferentes para genótipos iguais. Este fato pode ser atribuído à variabilidade genética entre a população brasileira (PENA *et al.*, 2000) e a italiana (TINTO *et al.*, 2015), além de fatores ambientais que possam estar envolvidos na eclosão da DC. O consumo de glúten pode ser um importante fator na determinação do risco de desenvolver a DC, visto que Lionetti e Catassi (2014) encontraram uma tendência para correlação positiva entre consumo de glúten e desenvolvimento da DC.

Riscos diferentes foram calculados para as categorias *Cis* e *Trans* de HLA-DQ2.5 ( $\beta 2/x$ ) e alcançaram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Este genótipo em *Trans* mostrou risco 1:20 e em *Cis* 1:30 (tabela 7). A molécula de MHC-II codificada por HLA-DQ2.5 é composta por uma cadeia proteica  $\alpha$  e outra  $\beta$ . Dois resíduos de aminoácidos diferenciam esta molécula quando sintetizado por alelos em *Cis* ou em *Trans*. Um localiza-se no peptídeo líder da cadeia  $\alpha$  (DQA1\*05:01 vs DQA1\*05:05) e o outro resíduo no domínio de membrana da cadeia  $\beta$  (DQB1\*02:01 vs DQB1\*02:02). É postulado que essas pequenas mudanças de resíduos de aminoácidos não gerem diferenças no potencial de apresentação de antígenos pelas APCs (WIJMENGA; ZHERNAKOVA, 2008).

Geralmente, as categorias *Cis* e *Trans* são consideradas juntas nos cálculos de risco devido à similaridade de risco que produzem (MEGIORNI *et al.*, 2009; FERNÁNDEZ-CAVADA-POLLO *et al.*, 2013). Se considerarmos as categorias *Cis* e *Trans* juntas o risco para HLA-DQ2.5 ( $\beta 2/x$ ) será de 1:30 (dado não mostrado), ocupando ainda a 4<sup>o</sup> posição de haplótipos de maior risco (Tabela 7 e Figura 8). A diferença de risco encontrada neste trabalho para as categorias *Cis* e *Trans* de HLA-DQ2.5 (tabela 7 e figura 8) pode ser justificada pela presença de alguma variante de risco genética no haplótipo ancestral AH 8.1. Medrano e colaboradores (2012), compararam os riscos de desenvolver a DC em pacientes HLA-DQ2.5 ( $\beta 2/x$ ) em *Cis* e em *Trans* com e sem o haplótipo ancestral AH 8.1. Eles observaram que HLA-DQ2.5 *Trans* tinha risco similar aquele registrado para HLA-DQ2.5 ( $\beta 2/x$ ) *Cis* quando este estava associado ao AH 8.1 e risco aumentado quando comparado HLA-DQ2.5 ( $\beta 2/x$ ) *Cis* sem a presença do haplótipo ancestral AH 8.1. Sugeriram que algum fator adicional de susceptibilidade à DC está presente em indivíduos com o haplótipo ancestral AH 8.1.

A presença isolada de HLA-DQ8 mostrou risco de 1:289 (figura 8). Este genótipo, sem a presença de  $\beta 2$  (HLA-DQ8 e HLA-DQ8/ $\alpha 5$  – tabela 7), está presente

em 4,22% dos celíacos e 15,2% dos controles (tabela 7). Apesar de ser um genótipo importante para o desenvolvimento da DC, possui risco menor do que aqueles genótipos relacionados com a presença do alelo  $\beta 2$  (Tabela 7). Entretanto, quando HLA-DQ8 está associado com a presença de  $\beta 2$  o risco aumenta entre 7 e 15 vezes, sendo 1:19, quando HLA-DQ2.5/DQ8 ( $\beta 2/x$ ) e 1:40, quando HLA-DQ2.2/DQ8 ( $\beta 2/x$ ) (tabela 7). Esse resultado era esperado, visto que a presença do alelo DQB1\*02:01 e DQB1\*02:02 (codificam a cadeia  $\beta$  do HLA-DQ2.5 e HLA-DQ2.2, respectivamente) estão associados com maior predisposição à DC e modificam, consideravelmente, o risco de desenvolvimento desta doença (KARELL *et al.*, 2003; MEGIORNI *et al.*, 2009; KARINEN *et al.*, 2006). Isso demonstra o potencial das moléculas de MHC-II, compostas por uma cadeia  $\beta$  codificada pelo alelo DQB1\*02, na efetivação da resposta imunológica observada em pacientes celíacos. Essas duas combinações, HLA-DQ2.5/DQ8 ( $\beta 2/x$ ) e HLA-DQ2.2/DQ8 ( $\beta 2/x$ ) estão entre as três genótipos que mais predisponem à DC entre italianos (MEGIORNI *et al.*, 2009). Os dados apresentados neste trabalho estão coerentes com aqueles encontrados por LIONETTI e colaboradores (2014).

HLA-DQ8/ $\alpha 5$  mostrou risco de desenvolvimento da DC de 1:1005 (tabela 7), 3,5x menor do que a relatada para HLA-DQ8 (Tabela 7 e Figura 8). Em população do sul da Espanha também foi registrada um menor risco de desenvolvimento de DC para indivíduos HLA-DQ8/ $\alpha 5$  quando comparado com HLA-DQ8 (FERNÁNDEZ-CAVADA-POLLO *et al.*, 2013). Todos os pacientes e controles descritos aqui como HLA-DQ8/ $\alpha 5$  possuíam a configuração de haplótipos DR5-DQ7.5/DR4-DQ8 (ver item 1.6.6 e figura 5). É possível que moléculas de MHC-II de apresentação antigênica, formados pela expressão em *Trans* dos genes DQA1 e DQB1 que compõe esses haplótipos (DQA1\*05/DQB1\*03:02 e DQA1\*03/DQB1\*03:01) formem moléculas  $\alpha\beta$  não muito eficiente na ligação e apresentação de importantes peptídeos imunogênicos do glúten. Não há evidência de que estas moléculas de apresentação antigênica consigam se ligar com afinidade em peptídeos imunogênicos do glúten e desencadear uma resposta inflamatória mediada por células T (TOLLEFSEN *et al.*, 2006). Assim, sugerimos que as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  que formarão uma molécula de MHC-II, sejam sintetizadas a partir da expressão em *Trans* (DQA1\*05/DQB1\*03:02 e DQA1\*03/DQB1\*03:01) dos alelos que compõe os haplótipos DR5-DQ7.5/DR4-DQ8. Sugerimos, ainda, que as moléculas de MHC-II formadas sejam preferencialmente montadas pela expressão em *Trans* dos alelos que compõe os referidos haplótipos, o que

diminuiria a possibilidade de um processo autoimune desencadeado por fragmentos do glúten. Outra possibilidade para o decréscimo do risco observado entre a presença dos genótipos HLA-DQ8 e HLA-DQ8/ $\alpha$ 5 (figura 8) é a existência de fatores genéticos de proteção nos indivíduos que são HLA-DQ8/ $\alpha$ 5 (ZHERNAKOVA., 2010).

Dentre o grupo de celíacos analisados, apenas 1,27 % deles (n=3) possuem apenas  $\alpha$ 5 como alelo predisponentes, ao passo que 20,25 % dos controles (n=48) possuem apenas este alelo (Tabela 7). Embora três pacientes celíacos tenham desenvolvido a DC e possuam apenas  $\alpha$ 5 como alelo HLA predisponente, e que há alto número de controles nesta categoria, concordamos que a presença única de  $\alpha$ 5 não é determinante para o desenvolvimento da DC (KARELL *et al.*, 2003; MEGIORNI *et al.*, 2009) e possui associação negativa com o surgimento dela (MEGIORNI *et al.*, 2009). Indivíduos em grupo de risco e na população geral que possuem apenas  $\alpha$ 5 tem baixíssima probabilidade de desenvolvimento da DC e podem, virtualmente, ser excluídos de grupo de risco (OR 0,0504 95%, CI 0.0154-0.1647). De fato, outros fatores genéticos e ambientais contribuem para que indivíduos com baixa probabilidade de desenvolvimento de DC, baseado apenas em alelos HLA, desenvolvam esta doença.

Sabe-se que a minoria dos sujeitos que estão em grupos de risco (parentes de primeiro grau de celíacos, DMI, SD, ST) e na população geral e que possuam apenas  $\alpha$ 5 como alelo HLA predisponente à DC desenvolverão esta doença (KARELL *et al.*, 2003). Kotze e colaboradores (2014) sugerem que a presença única de  $\alpha$ 5 não pode ser motivo suficiente para excluir a possibilidade de desenvolvimento da DC, mesmo que este evento seja raro. Eles se baseiam no fato de que 8,9 % dos celíacos confirmados por biópsia do sul do Brasil, autodeclarados de descendência européia, não possuem nem os genótipos HLA-DQ2 e nem HLA-DQ8. De fato, Martins e colaboradores, ao estudar 90 pacientes celíacos no DF relataram ausência dos genótipos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em 6,8 % (n = 5) de pacientes celíacos confirmados por testes sorológicos e por biópsia. Na Itália 3,0 a 4,2 % dos pacientes celíacos foram registrados como tendo apenas  $\alpha$ 5 (alelo DQA1\*05) ou não possuem nenhum alelo predisponente (MEGIORNI *et al.*, 2009; TINTO *et al.*, 2015). Marcadores genéticos mais específicos ainda precisam ser estabelecidos, já que os mais de 40 *loci* identificados por meio do GWAS pouco modificam o risco genético associado ao desenvolvimento da DC (TRYNKA *et al.*, 2011).

O menor risco relatado se encontra na categoria ausente (nenhuma alelo HLA predisponente) cujo valor calculado é de 1:3014. 0,84 % dos celíacos (n=2) e 25,32 %

dos controles (n=60) foram incluídos neste grupo (tabela 7), dados estes que são similares àqueles dados descritos em população italiana e espanhola (MEGIORNI *et al.*, 2009; FERNÁNDEZ-CAVADA-POLLO *et al.*, 2013).

Os dois pacientes celíacos relatados neste trabalho na categoria “ausente” (tabela 7) são do sexo feminino. Ambas possuíam um ou mais dos sintomas clássicos da DC (diarreia, distensão abdominal, dor abdominal, flatulência e irritabilidade) e foram diagnosticadas segundo critérios da ESPGHAN (WALKER-SMITH *et al.*, 1990). Uma delas foi diagnosticada com 1 ano e três meses de idade e a outra com 46 anos de idade, sendo que esta também possuía tireoidite de Hashimoto, uma autoimunidade muito comum entre os celíacos.

A Doença Celíaca é marcadamente relacionada com a presença dos genótipos HLA-DQ2.5/DQ8/DQ2.2 sendo que a presença deles e de suas possíveis combinações modificam o risco de desenvolvimento da DC (MEGIORNI *et al.*, 2009; FERNÁNDEZ-CAVADA-POLLO *et al.*, 2013). Embora Castro-Antunes *et al.* (2011) tenha relatado a presença de um indivíduo DQA1\*02:01/DQB1\*02 (DQ2.2) dentre 73 pacientes celíacos do nordeste brasileiro, mostramos aqui a real prevalência de DR7-DQ2.2 dentre celíacos e controles em população de Brasília (Centro-Oeste brasileiro). Considerando a prevalência presumida de 1:100, encontramos alto risco de desenvolvimento da DC associado com HLA-DQ2.5/DQ2.5 ( $\beta 2/\beta 2$ ), fato coerente com outros trabalhos que evidenciam maior risco associado com a homozigose do genótipo HLA-DQ2.5 (LIU *et al.*, 2014), diferentemente daquele encontrado por Megiorni *et al.* (2011), cujo maior risco, em população italiana, estava relacionada com a presença de HLA-DQ2.5/DQ8. Diferenças genéticas e ambientais podem justificar diferentes riscos para genótipos HLA-DQ iguais.

As configurações *Cis* e *Trans* do DQ2.5 ( $\beta 2/x$ ) costumam ser mescladas em apenas uma categoria e um único risco é estabelecido (MEGIORNI *et al.*, 2009; FERNÁNDEZ-CAVADA-POLLO *et al.*, 2013), entretanto encontramos riscos diferentes para tais configurações (Tabela 7, figura 8) e sugerimos que a ausência do haplótipo ancestral AH 8.1 com DQ2.5 ( $\beta 2/x$ ) *Cis* diminua o risco genético desta categoria (MEDRANO *et al.*, 2012). Alelos HLA-DQ associados à Doença Celíaca respondem por cerca de 40% do risco genético associado ao desenvolvimento desta doença. Por isso, a determinação da presença destes alelos torna-se importante para auxiliar no diagnóstico de indivíduos que tem testes sorológicos e histológicos

discordantes e para afastar a possibilidade de um indivíduo vir a desenvolver esta doença.

## 8. CONCLUSÕES

Dados sobre a frequência destes genótipos na população brasileira permitiram-nos calcular o risco genético associado ao desenvolvimento da DC no Brasil. O gráfico sugerido (figura 8) pode auxiliar médicos na prática clínica e ser usado em trabalhos prospectivos de seguimento de pessoas que possuem risco genético de desenvolvimento da DC. O risco calculado varia entre 1:7 a 1:3014 e tem, como genótipos de maior risco, HLA-DQ2.5/DQ2.5 ( $\beta 2/\beta 2$ ), HLA-DQ2.5/DQ2.2 ( $\beta 2/\beta 2$ ) e HLA-DQ2.5/DQ8 ( $\beta 2/x$ ).

Embora a metodologia empregada em qPCR tenha limitações, ela pode ser utilizada na triagem de pacientes celíacos, grupos de risco e população geral a fim de identificar os indivíduos cujas informações HLA precisam ser mais detalhadas. A obtenção dessas informações pode ser feita em *kit* comercial. O uso deste fluxo de trabalho traz economicidade financeira ao processo de genotipagem de alelos HLA-DQ predisponentes à DC e rapidez, visto que muitos indivíduos não precisarão ser genotipados através de *kit* comercial, o qual utiliza metodologia baseada em PCR-SSP e que depende de eletroforese em gel de agarose para obtenção de resultados.

HLA-DQ2.5 e/ou HLA-DQ8 se mostraram presentes em 94,52 % (n=224) dos pacientes celíacos e em 35,44 % dos controles. Foi realizada a primeira descrição do genótipo HLA-DQ2.2 (homo ou heterozigose) em grupo representativo de pacientes celíacos (3,37 %) e em grupo controles (16,03 %) da população brasileira, sendo que todos os pacientes célicos e controles genotipados como HLA- $\beta 2$ /DQ8 (tabela 6) em qPCR foram genotipados como HLA-DQ2.2/DQ8 (tabela 7) em *kit* comercial. Aqueles identificados como  $\beta 2$  em qPCR foram, em sua maioria, genotipados como HLA-DQ2.2 em *kit* comercial. A frequência do genótipo HLA-DQ2.5 em *Cis* ou em *Trans* foi estabelecida para a população aqui estudada.

Este trabalho trouxe informações robustas sobre a frequência dos genótipos HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 e HLA-DQ8 em população celíaca e controles, permitiu padronizar e validar técnica que trará rapidez e confiabilidade à genotipagem de alelos HLA e delineou um gradiente de risco genético aplicável à população brasileira.



## 9. PERSPECTIVAS

Este trabalho possibilitou a aplicação de informações genéticas à prática clínica em grupos de risco e em população geral do Centro-Oeste - DF. Estas informações enfatizam a necessidade pela busca por novos marcadores genéticos que possam aumentar o Valor Preditivo Positivo (VPP) e o Valor Preditivo Negativo (VPN) dos testes genéticos aplicáveis a doenças com forte componente genético. A busca por genes que possam explicar a DC tem se intensificado, e outros locos diferentes daqueles relacionados com a região de MHC foram evidenciados e estão sendo aplicados à prática clínica. O risco genético associado à DC pode estar relacionado a forma como os genes se expressam e às regiões de DNA que possuem função no controle da expressão gênica. Este trabalho também enfatiza a necessidade pelo levantamento de informações sobre a frequência de HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 e HLA-DQ8 em grupos de pacientes celíacos, grupos de risco e em população geral descendentes de europeus, afrodescendente e ameríndios na população brasileira.

## 10 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABADIE, V. et al. Integrations of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. **The Annual Review of Immunology**, v.29, p.493-526, 2011.

ABADIE, V; JABRI B. IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. **Immunol Rev.** v.260, n.1, p. 221–234.

ABU-ZEKRY, M. et al. Prevalence of celiac disease in Egyptian children disputes the east-west agriculture-dependent spread of the disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.47, n.2, p.136-140, 2008.

AGGARWAL S.; LEBWOHL B.; GREEN P. H. R. Screening for celiac disease in average-risk and high-risk populations. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v.5, n1, p.37–47, 2012.

ALMEIDA, R.C. et al. Does celiac disease occur in Afro-derived Brazilian populations? **American Journal of Human Biology**, v.24, p.710–712, 2012.

ALVES-SILVA, J. et al. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. **The American Journal of Human Genetics**, v.67, p.444–461, 2000.

ANDERSON, R.P. et al. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminasemodified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. **Nature Medicine**, v.6, p.337–342, 2000.

ARAYA, M. et al. DQ2, DQ7 and DQ8 Distribution and Clinical Manifestations in Celiac Cases and Their First-Degree Relatives. **Nutrients**, v.7, n.6, p.4955–4965, 2015.

AURICCHIO S; TRONCONE R. History of coeliac disease. **Eur J Pediatr**, v.155: p.427-428, 1996.

BARADA, K. et al. Celiac Disease in Middle Eastern and North African Countries: A new burden? **World Journal of Gastroenterology**, v.16, n.12, p.1449-1457, 2010.

BIAGI, F. et al. Influence of HLA-DQ2 and DQ8 on severity in celiac Disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.46, n.1, p.46-50, 2012.

BODD, M. et al. HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. **Mucosal Immunology**. v.3, n.6, p.594-601, 2010.

Bodmer W.F. et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1987. Em: Dupont B, ed. *Immunobiology of HLA*. New York: *Springer-Verlag*, p.72-79, 1989.

BONAMICO, M. et al. Italian Society Of Pediatric Gastroenterology Hepatology (SIGEP); Italian Study Group for Turner Syndrom (ISGTS). Prevalence and clinical picture of celiac disease in Turner syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.87, n.12, p.5495-5498, 2002.

BOZÓN, M.V. et al. Comparison of HLA-A antigen typing by serology with two polymerase chain reaction based DNA typing methods: implications for proficiency testing. **Tissue Antigens**. V.47, n.6, p.512-518, 1996.

CAMARCA, M.E. et al. Celiac disease in type 1 diabetes mellitus. **Italian Journal of Pediatrics**, v.38, n.10, p.1-10, 2012.

CAMINERO A. et al. Duodenal bacteria from patients with celiac disease and healthy subjects distinctly affect gluten breakdown and immunogenicity. **Gastroenterology**, v. S0016-5085, n.16, p. 34713-8, 2016.

CASTRO ANTUNES, M.M. et al. Frequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 in celiac patients and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil. **Clinics**, v.66, n.2, p.227-231, 2011.

CATALDO, F.; MONTALTO, G. Celiac disease in the developing countries: A new and challenging public health problem. **World Journal of Gastroenterology**, v.13, n.15, p.2153– 2159, 2007.

CATASSI C. Celiac Disease in Turkey: Lessons From the Fertile Crescent. **The American Journal of Gastroenterology**, v.106, p.1518 – 1520, 2011.

CATASSI C. et al. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara. **Lancet**, v.354, p.647–648, 1999.

CATASSI, C. et al. World Perspective on Celiac Disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition**, v.55, n.5, p.494–499, 2012.

CATASSI, C.; GATTI, S.; FASANO, A. The new epidemiology of celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.59, supplement 1: S7-S8, 2014.

CARCINER et al. Prevalence of coeliac disease in Down's syndrome. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 13, p. 263-267.

CH'NG C.L. et al. Celiac Disease and Autoimmune Thyroid Disease. **Clinical Medicine & Research**, v.5, n.3, p. 184-192.

CHORZELSKI T.P. et al. IgA Class Endomysium Antibodies in Dermatitis Herpetiformis and Coeliac Disease. **Annals New York Academy of Sciences**, v.420, p.325-334, 1983.

CICCOCIOPPO, R.; Di SABATINO, A.; CORAZZA, G.R. The immune recognition of gluten in coeliac disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v.140, p.408-16, 2005.

CILLERUELO, M.L. et al. Spanish national registry of celiac disease: incidence and clinical presentation. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.59, n.4, p.522-526, 2014.

COLLIN, P.; REUNALA, T. Recognition and management of the cutaneous manifestations of celiac disease: a guide for dermatologists. **American Journal of Clinical Dermatology**, v.4, n.1, p.13-20, 2003.

COMINO I. et al. Identification and molecular characterization of oat peptides implicated on coeliac immune response. **Food and Nutrition Research**, v.60, n.30324, 2016.

CORAZZA, G.R.; VILLANACCI, V. Coeliac disease. **Journal of Clinical Pathology**. v.58, p.573-574, 2005.

CUMMINS, A.G.; ROBERTS-THOMSON, I.C. Prevalence of celiac disease in the Asia-Pacific region. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.24, n.8, p.1347-1351, 2009.

DALGIC B. et al. Turkish Celiac Study Group. Prevalence of celiac disease in healthy Turkish school children. **The American Journal of Gastroenterology**, v.106, n.8, p.1512-1517, 2011.

De Re, V. et al. The versatile role of gliadin peptides in celiac disease. **Clinical Biochemistry**. v.46, n.6, p.552-560, 2013.

Di SABATINO, A. et al. Epithelium-derived interleukin- 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity and survival in coeliac disease. **Gut**, v.55, n.4, p.469-477, 2005.

Di SABATINO, A. et al. Evidence for the role of interferon-alfa production by dendritic cells in the Th1 response in celiac disease. **Gastroenterology**, v.53, n.8, p.1090-1095, 2007.

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

DIAS, M.C.S. et al. Screening for celiac disease among patients with Turner syndrome in Brasília, DF, midwest region of Brazil. **Arquivos de Gastroenterologia**, v.47, n.3, p.246-249, 2010.

DIETERICH, W. et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. **Nature Medicine**, v.3, p.797-801, 1997.

DUBOIS, P.C. et al. Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. **Nature Genetics**, v.42, n.4, p.295-302, 2010.

DOGAN Y. et al. Prevalence of celiac disease among first-degree relatives of patients with celiac disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v.55, n.2, p. 205-208, 2012.

EMAMI, M.H. et al. Prevalence of celiac disease in patients with irritable bowel syndrome. **Govaresh**. v.13, p.192-197, 2008.

- ENSARI, A. Gluten-sensitive enteropathy (celiac disease): controversies in diagnosis and classification. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. v.134, p.826-36, 2010.
- FALCHUK, Z.M.; ROSENTINE, G.N.; STROBER, W. Predominance of histocompatibility antigen HL-A8 in patients with gluten-sensitive enteropathy. **Journal of Clinical Investigation** v.51, p.1602-1605, 1972.
- FALLANG, A.E. et al. Differences in the risk of celiac disease associated with HLA-DQ2.5 or HLA-DQ2.2 are related to sustained gluten antigen presentation. **Nature Immunology**, v.10, p.1096–1101, 2009.
- FASANO, A. et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. **Archives of Internal Medicine**, v.163, p.286–92, 2003.
- FASANO, A. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1258, n.1, p.25–33, 2012.
- FEDORAK, R.N. et al. Canadian Digestive Health Foundation Public Impact Series 4: Celiac disease in Canada. Incidence, prevalence, and direct and indirect economic impact. **Canadian Journal of Gastroenterology**, v.26, n.6, p.350–352, 2012.
- FERNANDEZ BANARES, F. et al. Type 1 Marsh Celiac Disease: Diagnosis and Response. In Rodrigo L and Pena AS, editors. Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity. **OmniaScience**, Capítulo 13, p.289-302, 2014.
- FERNÁNDEZ-CAVADA-POLLO, M.J. et al. Celiac disease and HLA-DQ genotype: diagnosis of different genetic risk profiles related to the age in Badajoz, southwestern Spain. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**, v.105, n.8, p.469-476, 2013.
- FREEMAN, H.J. Adult celiac disease in the elderly. **World Journal of Gastroenterology**, v.14, n.45, p.6911-6914, 2008.
- GANDOLFI, L. et al. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. **The American Journal of Gastroenterology**. v.95, p.689–692, 2000.
- GOMEZ, J.C. et al. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. **The American Journal of Gastroenterology**, v.96, n.9, p.2700-4, 2001.
- GRECO, L. et al. The first large population based twin study of coeliac disease. **Gut**, v.50, p.624-648, 2002.
- GREEN, P.H.R. et al. Characteristics of adult celiac disease in the USA: results of a national survey. **The American Journal of Gastroenterology**, v.96, n.1, p.126-131, 2001.
- GREEN, P.H.R.; CELLIER, C. Celiac disease. **New England Journal of Medicine**, v.357, p.1731-1743, 2007.

GUANDALINI, S.; ASSIRI, A. Celiac Disease: a review. **JAMA Pediatrics**, v.168, n.3, p.272-278, 2014.

GUJRAL, N.; FREEMAN, H.J.; THOMSON, A.B.R. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. **World Journal of Gastroenterology**, v.18, n.42, p.6036- 6059, 2012.

HADITHI, M. et al. Accuracy of serologic tests and HLA-DQ typing for diagnosing celiac disease. **Annals of Internal Medicine**, v.147, n.5, p.294-302, 2007.

HARIZ, M.B. et al. Celiac disease in Tunisian children: a second screening study using a "new generation" rapid test. **Immunological Investigations**, v.42, n.4, p.356-368, 2013.

HARIZ, M.B. et al. Prevalence of celiac disease in Tunisia: mass-screening study in schoolchildren. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v.19, n.8, p.687-694, 2007.

HAUACHE, O.M. et al. Estimation of diabetes risk in Brazilian population by typing for polymorphisms in HLA-DR-DQ, INS and CTLA-4 genes. **Disease Markers**, v.21, n.3, p.139–145, 2005.

HEYMAN, M.; MENARD, S. Pathways of gliadin transport in celiacdisease. *Ann N Y Acad Sci*, v.1165, p.274-278, 2009. HILL, I.D. What Are the Sensitivity and Specificity of Serologic Tests for Celiac Disease? Do Sensitivity and Specificity Vary in Different Populations? **Gastroenterology**, v.128, n.4, p.25-32, 2005.

Hill ID. What Are the Sensitivity and Specificity of Serologic Tests for Celiac Disease? Do Sensitivity and Specificity Vary in Different Populations? **Gastroenterology**, v.128, n.4, p. 25-32, 2005.

HUNT, K.A. et al. A common CTLA4 haplotype associated with coeliac disease. **European Journal of Human Genetics**, v.13, n.4, p.440-444, 2005.

HUSBY, S. et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.54, p.125–135, 2012.

HOPPER, A.D. et al. Adult coeliac disease. **Brit Med J**, v.335, p.558-562, 2007.

HORTON R. et al. Gene map of the extended human MHC. **Nature Reviews Genetics**. v. 5, p. 889–899, 2004.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/>. Acesso em 2 de fevereiro de 2016.

IVARSSON, A. et al. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. **Acta Paediatrica**, v.89 v.2, p.165-171, 2000.

IVARSSON, A. et al. Prevalence of childhood celiac disease and changes in infant feeding. **Pediatrics**, v.131, p. e687–694, 2013. .

KARELL, 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.469-477, 2003.

KARINEN, H. et al. Gene dose effect of the DQB1\*0201 allele contributes to severity of coeliac disease. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.41, n.2, p.191-199, 2006.

KLEIN J. SATO A. The HLA System. **New England Journal of Medicine**, v.343, p.702-709, 2000.

KORBIE, D.J.; MATTICK, J.S. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. **Nature Protocols**, v.3, n.9, p.1452-1456, 2008.

KORPONAY-SZABO, I.R. et al. In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by celiac autoantibodies. **Gut**. v.53, p.641-648, 2004.

KOSKINEN, O. et al. Oats do not induce systemic or mucosal autoantibody response in children with coeliac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.48, p.559–65, 2009.

KOTZE L.M.S. et al. Absence of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 does not exclude celiac disease in Brazilian patients. **Revista Española de Enfermedades Digestivas**. v.106, n. 8, p.561-562, 2014.

LAMMERS, K.M. et al. Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. **Gastroenterology**, v.135, p.194-204.e3, 2008.

LAMMI, A. et al. Antibodies to Deamidated Gliadin Peptide in Diagnosis of Celiac Disease in Children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.60, n.5, p.626-631, 2015.

LINS, T.C. et al. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. **American Journal of Human Biology**, v.22, n.2, p.187-192, 2010.

LIONETTI, E. et al. M.P.H. for the SIGENP (Italian Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition) Working Group on Weaning and CD Risk. Introduction of Gluten, HLA Status, and the Risk of Celiac Disease in Children. **The New England Journal of Medicine**, 371, p.1295-1303, 2014.

LIONETTI, E.; CATASSI, C. Co-localization of gluten consumption and HLA-DQ2 and -DQ8 genotypes, a clue to the history of celiac disease. **Digestive and Liver Disease**, v.46, n.12, p.1057–1063, 2014.

LIU EDWIN; REWERS, M.; EISENBARTH. Genetic testing: who should do the testing and what is the role of genetic testing in the setting of celiac disease. **Gastroenterology**, v.128, n.4, p.S33-S34, 2005.

LIU, E. et al. Risk of Pediatric Celiac Disease According to HLA Haplotype and Country. **The New England Journal of Medicine**, v.371, p.42-49, 2014.

LIU, E.; REWERS, M.; EISENBARTH, G.S. Genetic testing: who should do the testing and what is the role of genetic testing in the setting of celiac disease? **Gastroenterology**, v.128, p.S33–S37, 2005.

LÓPEZ-VÁZQUEZ, A. et al. MHC class I region plays a role in the development of diverse clinical forms of celiac disease in a Saharawi population. **The American Journal of Gastroenterology**. v.99, n.4, p.662-667, 2004.

LOSOWSKY M.S. A history of coeliac disease. **Digestive Diseases**, v.26, p. 112-120, 2008.

LUDVIGSSON, J.F. et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. **Gut**, v.62, n.1, 43-52, 2013.

MAKHARIA, G.K. Celiac disease screening in southern and East Asia. **Digestive Diseases**, v.33, n.2, p.167-174, 2015.

MÅRILD K. et al. Turner Syndrome and Celiac Disease: A Case-Control Study. **Pediatrics**, v.137, n.2, p. e20152232, 2016.

MARSH, M.N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). **Gastroenterology**, v.102, p.330-354, 1992.

MARSH, S.G. et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2004. **Tissue Antigens**, v.65, n.4, p.301–369, 2005.

MARSH, S.G.E. et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. **Tissue Antigens**, v.75, p.291–455, 2010.

MARTINS, R.C.A. et al. Serologic screening and genetic testing among Brazilian patients with celiac disease and their first degree relatives. **Arquivos de Gastroenterologia**. v.47, n.3, 2010.

MATYSIAK-BUDNIK, T. et al. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. **The Journal of Experimental Medicine**, v.205, p.143- 154, 2008.

MAYOR N.P. et al. HLA Typing for the Next Generation. **PLoS ONE** v.10, n.5, e0127153, 2015.



MEDRANO, L.M. et al. HLA and Celiac Disease Susceptibility: New Genetic Factors Bring Open Questions about the HLA Influence and Gene-Dosage Effects. **Plos One**, v.7, n.10, 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-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. **Journal of Biomedical Science**, v.19, n.88, 2012.

Melo SBC, Fernandes MI, Peres LC, Troncon LE, Galvao LC, et al. Prevalence and demographic characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirao Preto, São Paulo State, Brazil. **Digestive Disease and Sciences**, v.51, p.1020–25.

MONTELEONE, G. et al. Role of interferon alpha in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. **Gut**, v.48, n.3, p.425-429, 2001.

MONTELEONE, I. et al. Regulation of the T helper cell type 1 transcription factor Tbet in coeliac disease mucosa. **Gut**, v.53, n.8, p.1090-1095, 2004.

MOTTA, P.M. et al. High frequency of DQ8 in the celiac population of Chaco province, Argentina. **Acta Gastroenterológica Latinoamerica**, v.44, n.1, p.16-21, 2014.

MUBARAK, A. et al. Human leukocyte antigen DQ2.2 and celiac disease. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.56, n.4, p.428-430, 2013.

MURRAY, J.A. et al. HLA DQ gene dosage and risk and severity of celiac disease. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.5, p.1406–1412, 2007.

MUSTALAHTI, K. et al. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. **Annals of Medicine**, v.42, p.587–595, 2010.

MYLEUS, A. et al. Celiac disease revealed in 3% of Swedish 12-year-olds born during an epidemic. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.49, p.170–176, 2009.

NISTICO, L. et al. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. **Gut**, v.55, p.803–8, 2006.

OBERHUBER, G.; GRANDITSCH, G.; VOGELSANG, H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v.11, p.1185-1194, 1999.

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**, v.41, p.119-134, 1993.

Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA, Cortez AJP, Carvalho FO, Bordin JO, Soares MAdeC, Patrício FR da S, Kawakami E, Morais MB de and Fagundes-Neto U. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. **Eur J Gastroen Hepat**, v.19, p.43-49, 2007.

PARRA-MEDINA, R. et al. Prevalence of Celiac Disease in Latin America: A Systematic Review and Meta-Regression. **Plos One**, v.10, n.5, p.e0124040, 2015.

PEÑA, A.S.; CRUSIUS, J.B.A. Central America in Transition: From Maize to Wheat. Challenges and Opportunities. **Nutrients**. v.7, n.9, p.7163–7171, 2015.

PENA, S.D.J. et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. **PLoS ONE**, v.6, n.2, e17063, 2011

PEREIRA, M.A. et al. Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. **World Journal of Gastroenterology**, v.12, p.6546–6550, 2006.

PICASCIA A. et al. From HLA Typing to anti-HLA antibody detection and beyond: the road ahead. **Transplantation Reviews**, 2016.

PIETZAK M.M. et al. Stratifying Risk for Celiac Disease in a Large At-Risk United States Population by Using HLA Alleles. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.7, p.966–971, 2009.

PRATESI, R. et al. Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.38, p.747-750, 2003.

PROFAIZER, T.; ECKELS, D.; DELGADO, J.C. Celiac Disease and HLA typing using real-time PCR with melting curve analysis. **Tissue Antigens**, v.78, p.31-37, 2011.

QIAO, S.W. et al. Antigen presentation to celiac lesion-derived T-cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. **The Journal of Immunology**, v.173, p.1757–1762, 2004.

RASHID, M. et al. Consumption of pure oats by individuals with celiac disease: A position statement by the Canadian Celiac Association. **Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.21, n.10, p.649–651, 2007.

RÄTSCH, I.M.; CATASSI, C. Coeliac disease: a potentially treatable health problem of Saharawi refugee children. **Bull World Health Organ**. v.79, p.541–545, 2001.

REILLY N.R.; FASANO A.; GREEN P.H.R. Presentations of Celiac Disease. Gastrointest Endoscopy. **Medical Clinics of North America**, v.22, p.613–621, 2012.

REINTON, N. et al. A one-step real-time PCR assay for detection of DQA1\*05, DQB1\*02 and DQB1\*0302 to aid diagnosis of celiac disease. **Journal of Immunological Methods**. v. 316, p.125–132, 2006.

REMES-TROCHE, J.M. et al. Celiac disease could be a frequent disease in Mexico: prevalence of tissue transglutaminase antibody in healthy blood donors. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.40, n.8, p.697-700, 2006.

RIESTRA, S. et al. Prevalence of Coeliac disease in the general population of northern Spain. Strategies of serologic screening. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v.35, p.398–402, 2000.

RIVERA, E.; ASSIRI, A.; GUANDALINI, S. Celiac disease. **Oral Diseases**, v.19, p.635–641, 2013.

ROBINSON, J. et al. The IMGT/HLA database. **Nucleic Acids Research**, vol. 39, p. D1171–D1176, 2011.

ROMANOS, J. et al. Analysis of HLA and non-HLA alleles can identify individuals at high risk for celiac disease. **Gastroenterology**, v.137, n.3, p.834-840, 840.e1-3, 2009.

RUBIO-TAPIA, A. et al. Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. **Gastroenterology**, v.137, n.1, p.88-93, 2009.

SACCHETTI, L. et al. Multiplex PCR typing of the three most frequent HLA alleles in celiac disease. **Clinica Chimica Acta**, p.205–207, 2001.

SALARDI S. et al. Prevalence of celiac disease in children with type 1 diabetes mellitus increased in themid-1990s: an 18-year longitudinal study based on anti-endomysial antibodies. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.46, n.5, p.612-614, 2008.

SANDERS, D.S. et al. Changing face of adult coeliac disease: experience of a single university hospital in South Yorkshire. **Postgraduate Medical Journal**, v.78, p.31-33, 2002.

SCHUMANN, M. et al. Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. **Gut** v.57, p.747-754, 2008.

SELLESKI N. et al. Simplifying celiac disease presisposing HLA-DQ alleles determination by the real time PCR method. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 52, n. 2, p.143-146.

SHAN, L. et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, v.297, p.2275–2279, 2002.

SHIINA, T. et al. The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease. **Journal of Human Genetics**, v.54, p.15-39, 2009.

SHEWRY P.R. Wheat. **J Exp Bot**, v.60, n.6, p.1537-1553, 2001.

SINGH, P. et al. Prevalence of celiac disease in Asia: A systematic review and metaanalysis. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v.31, n.6, p.1095-1101, 2016.

SOLLID, L.M, THORSBY, E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. **Gastroenterology**, v.105, p.910-922, 1993.

SOLLID, L.M. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. **Nature Reviews Immunology** v.2, p.647–655, 2002.

SOLLID, L.M. et al. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. **The Journal of Experimental Medicine**. v.169, n.1, p.345-50, 1989.

SOLLID, L.M.; LIE, B.A. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v.3, p.843–851, 2005.

SOLLID, L.M.; LUNDIN, K. Diagnosis and treatment of celiac disease. **Mucosal Immunology**, v.2, n.1, p.3-7, 2009.

SOLLIS, M. Coeliac disease: getting the measure of new drug treatments. **The Pharmaceutical Journal**, 2015.

SPURKLAND, A. et al. Dermatitis herpetiformis and celiac disease are both primarily associated with the HLA-DQ( $\alpha$ 1\*0501,  $\beta$ 1\*02) or the HLA-DQ( $\alpha$ 1\*03,  $\beta$ 1\*0302) heterodimers. **Tissue Antigens**, v.49, n.29, 1997.

SPURKLAND, A. et al. HLA-DR and -DQ genotypes of celiac disease patients serologically typed to be non-DR3 and non-DR-5/7. **Human Immunology**, v.35, n.188, 1992.

TACK G.J. et al. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. **Nature reviews Gastroenterol Hepatol**, v.7, p.204-213, 2010.

TEKINER, H. Aretaeus of Cappadocia and His Treatises on Diseases. **Turk Neurosurg**, v.25, n.3, p.508-512, 2015.

TEUFEL, A. et al. Genetic association of autoimmune hepatitis and human leucocyte antigen in German patients. **World Journal of Gastroenterology**, v.12, n.34, p.5513–5516, 2006.

TINTO N. et al. High Frequency of Haplotype HLA-DQ7 in Celiac Disease Patients from South Italy: Retrospective Evaluation of 5,535 Subjects at Risk of Celiac Disease. **PLoS ONE**, v.10, n.9, e0138324, 2015.

TOLLEFSEN, S. et al. Sollid1 HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v.116, n.8, p.2226–2236, 2006.

TOMMASINI A. et al. Ages of celiac disease: from changing environment to improved diagnostics. **World Journal of Gastroenterology**, v.17, n.32, p.3665-3671, 2011.

TREVISIOL, C. et al. High prevalence of unrecognized celiac disease in an unselected hospital population in north-eastern Brasil (Recife, Pernambuco). **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.39, p.214–215, 2004.

TRYNKA, G. et al. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. **Nature Genetics**, v.43, n.12, p.1193-1201, 2011.

TYE-DIN, J.A. et al. Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. **Science Translational Medicine**, v.2, p.41–51, 2010.

UENISHI R.H. et al. Screening for celiac disease in 1st degree relatives: a 10-year follow-up study. **BMC Gastroenterology** v.20, p.14:36, 2014.

UTIYAMA, S.R.daR. et al. Celiac Disease in native Indians from Brazil: a clinical and epidemiological survey. **North American Journal of Medicine Science**, v.2, p.138-142, 2010.

VALARINI, et al. Association of Dental Caries with HLA Class II Allele in Brazilian Adolescents. **Caries Research**, v.46, p.530–535, 2012.

van BELZEN, M.J. et al. Defining the contribution of the HLA region to cis DQ2-positive coeliac disease patients. **Genes and Immunity**, v.5, n.3, p.215-220, 2004.

van HEEL, D.A. et al. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. **Nature Genetics**, v.39, n.7, p.827-829, 2007.

van HEEL, D.A.; WEST, J. Recent advances in coeliac disease. **Gut**, v.55, p.1037-1046, 2006.

VERECKEI, E. et al. Genetic and immunological processes in the pathomechanism of gluten-sensitivity enteropathy and associated metabolic bone disorders. **Autoimmunity Reviews**, v.10, p.336-340, 2011.

VOLTA, U. et al. Deamidated gliadin peptide antibodies as a routine test for celiac disease: a prospective analysis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v.44, n.3, p.186-190, 2010.

Walker-Smith J.A. et al. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. **Arch Dis Child**, v.65, p. 909-911, 1990.

WANG, W. et al. Human zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. **Journal of Cell Science**, v.113, p.4435-4440, 2000.

West J. et al. Seroprevalence, correlates and characteristics of undetected celiac disease in England. **Gut**, v.52, p.960-965, 2003.

WIJMENGA, C.; ZHERNAKOVA, A. HLA and non-HLA genes in celiac disease. In: *Frontiers in Celiac Disease*. Fasano A, Troncone R e Branski D. **Pediatrics and Adolescent Medicine**. Basel, Karger, v.12, p.32-45, 2008.

WOLTERS, V.M.; WIJIMENGA, C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. **The American Journal of Gastroenterology**, v.103, p.190-195, 2008.

ZACHOR, D.A.; MROCZEK-MUSULMAN, E.; BROWN, P. Prevalence of celiac disease in Down syndrome in the United States. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.31, n.3, p.275-279, 2000.

ZHERNAKOVA, A. et al. Evolutionary and Functional Analysis of Celiac Risk Loci Reveals SH2B3 as a Protective Factor against Bacterial Infection. **The American Journal of Human Genetics**. v.86, n.6, p.970–977, 2010.

## ANEXO I – Aprovação do Projeto de 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 no CEP: **070/06**

Título do Projeto: “Estudo da Frequência do HLA-DQ2 (DQA 0501,B1 0201) e DRB1 04 entre celíacos e parentes de celíacos no Distrito Federal, Brasil”

Pesquisadora Responsável: Rita de Cássia Azevedo Martins

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com 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 **070/06** com o título: “Estudo da Frequência do HLA-DQ2 (DQA 0501,B1 0201) e DRB1 04 entre celíacos e parentes de celíacos no Distrito Federal, Brasil”, analisado na 7ª Reunião Ordinária, realizada no dia 1º de agosto de 2006.

A pesquisadora responsável fica notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto. Este prazo já expirou um ano após a aprovação do projeto (01/08/2007 - item VII.13 da resolução 196/06 CNS). Assim, o pesquisador deverá enviar imediatamente o relatório resumido do desenvolvimento do projeto, que não enviou na data exigida.

Brasília, 14 de abril de 2010.

Prof. Volnei Garrafa  
Coordenador do CEP-FS/UnB