



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

HANID DE SOUSA VERSIANI

FREQUÊNCIA DOS ALELOS HLA DQ2 E HLA DQ8 EM CELÍACOS E SEUS PARENTES DE PRIMEIRO GRAU NO DISTRITO FEDERAL

Trabalho de conclusão de curso, apresentado no formato de artigo científico ao UniCEUB como requisito parcial para a conclusão do Curso de Bacharelado de Biomedicina.

Orientadora: Prof. Msc. Vanessa Carvalho Moreira

BRASÍLIA
2016

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por ter me concedido tamanha conquista.

A minha mãe, Dinah Versiani, por sempre estar ao meu lado e me apoiar nessa jornada, e ensinar a importância de ir a conquista dos meus objetivos.

As minhas irmãs, Aryadne e Aryane Versiani que me apoiaram em vários aspectos durante esses anos, com muito amor, mesmo distantes.

Ao meu esposo, João Cordeiro, por estar ao meu lado me apoiando nos momentos de desespero e alegrias. Principalmente ao longo do curso. Sempre ajudando com as provas e trabalhos. Sendo meu amigo e companheiro.

A minha filha, Maysa Versiani, que é meu anjo. É desse rostinho lindo que tiro forças para continuar todos os dias. Você é minha inspiração, minha vida.

A minha orientadora, Prof.^a Vanessa Carvalho Moreira, que foi paciente, sábia, amiga, e exigente na orientação. Obrigada pelo carinho e pelos puxões de orelha, mas tenho mesmo que te agradecer por ser mais que uma orientadora, foi minha “mãe no CEUB”. Foi maravilhosa em todo o processo desse estudo. Esteve comigo desde o começo.

A Dr. Lenora Gandolfi e Dr. Pratesi por me conceder a honra de realizar esse estudo e estagiar no Laboratório de Doença Celíaca. Pelo carinho que fui recebida e tratada todo esse período.

A todos do Laboratório de Doença Celíaca- UnB, por todo carinho, paciência e compreensão.

A minha coorientadora Fernanda Coutinho de Almeida, por me ajudar a desenvolver esse trabalho, e com muita paciência, sabedoria, compreensão e amizade. Por me receber com carinho e ajudar na escolha do tema e no desenvolvimento desse trabalho.

A Nicole Selleski, por me ajudar com o desenvolvimento do trabalho sem distinção de hora ou dia. E mesmo assim atendendo a todos os meus pedidos de ajuda com muita paciência, compreensão e amizade.

A Zita e Isabela pelas horas de risos e conselhos. Pelo carinho de receber todos os dias e me ajudar.

A todos os meus colegas que de forma direta e indireta contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. Em especial a minhas colegas e amigas Ariadne Queiroz e Zilene de Araújo, ajudaram ao longo do curso e no desenvolvimento desse trabalho, entre outros.

Aos professores da Biomedicina do UniCeub, são excelentes profissionais e que esforçam para nos proporcionar o melhor e atual conhecimento. Em especial, minha querida Tania Andrade, Bruno Milagres, Paulo Queiroz e Fabiola Castro, que ao longo do curso se tornaram mais que professores, e sim amigos. Sempre atenciosos e compreensivos, principalmente para tirarem dúvidas pelo corredor. Vocês são maravilhosos!

Frequência dos alelos HLA DQ2 e DQ8 em celíacos e parentes de primeiro grau no Distrito Federal

HANID DE SOUSA VERSIANI¹

VANESSA CARVALHO MOREIRA²

Resumo:

A doença celíaca é uma condição crônica desencadeada pela presença do glúten em indivíduos geneticamente predispostos. O objetivo desse artigo é avaliar a frequência dos alelos predisponentes DQA1*05 e DQB1*02 (HLA DQ2) e DQA1*03 e DQB1*03:02 (HLA DQ8) para a doença celíaca em celíacos e seus parentes de primeiro grau, no Distrito Federal. Foi realizada a genotipagem dos alelos em 208 celíacos e 481 parentes de primeiro grau desses celíacos. As amostras foram amplificadas pelo método de PCR em tempo real. Entre os celíacos, 75,49% apresentaram a variante DQ2, 10,58% tinham o HLA DQ8; 7,69% apresentaram DQ2 e DQ8; 5,28% tinham apenas um dos alelos DQ2 e 0,96% nenhum dos alelos predisponentes. Entre os parentes, 48,02% apresentaram a variante DQ2; 10,81% tinham o DQ8; 24,12% apenas um dos alelos DQ2; 1,25% apresentaram o alelo DQA1*03 e 9,77% nenhum dos alelos. No presente estudo a distribuição das frequências corroboraram com estudos realizados no Distrito Federal, bem como Recife, Paraná, Europa, Estados Unidos e Cuba.

Palavras-chave: Doença Celíaca. Genética. Polimorfismo. Genotipagem. Diagnóstico.

Frequency of HLA DQ2 and DQ8 in coeliacs and first-degree relatives in the Federal District

Abstract:

Celiac disease is a chronic condition triggered by the presence of gluten in genetically predisposed individuals. The aim was to evaluate the frequency of predisposing alleles DQA1*05 and DQB1*02 (HLA DQ2) and DQA1*03 and DQB1*03:02 (HLA DQ8) for celiac disease in patients and their first-degree relatives in Distrito Federal. Genotyping of alleles in 208 celiac patients and 481 first-degree relatives of these celiacs was done. The samples were amplified by PCR method in real time. Among celiacs, 75.49% had the DQ2 variant, 10.58% had HLA DQ8; 7.69% had DQ2 and DQ8; 5.28% had only one of the alleles DQ2 and 0.96% no predisposing alleles. Among the relatives, 48.02% had the DQ2 variant; 10.81% had DQ8; 24.12% only one of the alleles DQ2; 1.25% had the allele DQA1 * 03 and 9.77% none of the alleles. In the present study the distribution of frequencies corroborate studies conducted in the Distrito Federal, as well as Recife, Paraná, Europe, the United States and Cuba

Keywords: Celiac disease. Genetics. Polymorphism. Genotyping. Diagnostic.

¹Graduanda do curso de Biomedicina no Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

²Biomédica, mestre em Ciências da saúde– UnB, professora de Biomedicina no Centro Universitário de Brasília – UniCEUB.

1. Introdução

A Doença Celíaca (DC) é caracterizada pela inflamação do intestino delgado, em indivíduos geneticamente predispostos, ao ingerir fragmentos proteicos do glúten como glutaminas e prolinas (SCHUPPAN et al., 2009). Esses resíduos proteicos, principalmente os peptídeos abundantes em prolinas, são dificilmente digeridas no trato gastrointestinal e estão presentes no trigo, centeio e cevada. Na cevada e no centeio essas proteínas são denominadas hordeínas e sacalinas e no trigo gliadinas e gluteninas (SOLLID; JABRI, 2013).

O epitélio intestinal contém junções celulares que servem como barreira para essas macromoléculas, que em circunstâncias normais costumam ser impermeáveis a proteínas do glúten. Porém, na DC as estreitas junções celulares (*tight junctions* – TJ) são comprometidas pelo aumento da permeabilidade celular. Os peptídeos do glúten, principalmente a gliadina, estimulam a liberação da proteína zonulina, que é responsável pela regulação das TJ, e em parte pelo aumento da permeabilidade intestinal (característica da DC). A redução da expressão das TJ, permite que esses peptídeos atravessem a barreira epitelial com maior facilidade (LIONETTI; CATASSI, 2011; FASANO, 2011).

Após a digestão incompleta, os peptídeos provenientes do glúten atravessam a barreira epitelial do intestino. Chegando na lâmina própria, são alterados pela enzima Transglutaminase tecidual (tTG ou TG2) pelo processo de deaminação, onde a tTG converte resíduos do glúten, que possuem carga neutra, passam a ter carga negativa. Tendo assim maior afinidade pelas moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC-*Major Histocompatibility Complex*) de classe II DQ2 e/ou DQ8 presente nas membranas das células apresentadoras de antígenos (APCs) (LINDFORS et al., 2010; MERESSE et al., 2012).

Através dessas moléculas, especificamente o HLA DQ2 e DQ8, as APCs apresentam os peptídeos do glúten para os linfócitos TCD4+ específicos do glúten, tornando-os ativados. Logo após essa ativação, as células TCD4+ produzem altos níveis de citocinas do tipo Th1 e Th2. E com a liberação dessas citocinas vão gerar processos imunológicos inflamatórios causando atrofia das vilosidades e hiperplasia de criptas, produção de anticorpos específicos (anti-endomísio ou EMA, anti-glúten, anti- tTG e o complexo glúten-tTG) e apoptose das células do epitélio intestinal (ABADIE et al., 2011; Di SABATINO; CORAZZA, 2009; LIONETTI; CATASSI, 2011).

As proteínas do MHC e classe II em humanos são codificadas por um conjunto de genes chamados Antígenos Leucocitários Humanos (HLA- *Human Leukocyte Antigen*) de classe II e estão localizados no braço curto cromossomo seis (6p21.3). Esse conjunto genes codificam os heterodímeros DQ2 e DQ8, e cada um é formado por duas cadeias (cadeia α e β) e constituindo assim, a molécula MHC de classe II. Essas cadeias são produzidas de forma independentes. Sendo assim, é necessária a presença de dois genes, HLA DQA (GenBank ID: 3117) e DQB (GenBank ID: 3119), para formar cada heterodímero. (KLEIN; SATO, 2000).

Os heterodímeros HLA DQ2 e HLA DQ8 estão associados a susceptibilidade para DC. Os alelos DQA1*05 (cadeia α) e o DQB1*02 (cadeia β) codificam o heterodímero DQ2. E esses podem ser herdados em cromossomos diferentes, denomina-se configuração *trans*, ou no mesmo cromossomo, configuração *cis*. O heterodímero DQ8 é codificado pelos alelos DQA1*03 (cadeia α) e o DQB1*03:02 (cadeia β). No entanto, normalmente são herdados no mesmo cromossomo, ou seja, em configuração *cis*. Cada combinação desses alelos predisponentes confere um risco diferente para o desenvolvimento da DC (KUPFER; JABRI, 2012; MEDRANO et al., 2012).

O agravo da doença depende de um conjunto de manifestações clínicas associadas a fatores genéticos, imunológicos e ambientais (ABADIE et al., 2011). A DC possui quatro formas clínicas, e podem ser classificadas como clássica, atípica, assintomática e potencial. A forma clássica ou típica é mais frequente em crianças, e suas manifestações mais relevantes são diarreia e má absorção. A atípica ou não-clássica pode apresentar em qualquer idade, mais frequente em adolescentes e adultos, com manifestações clínicas como anemia ferropriva, osteoporose, dermatite herpetiforme, complicações neurológicas, abortos de repetição, infertilidade e também anormalidades na menarca e na menopausa. As manifestações gastrointestinais são mínimas ou inexistentes. Na forma silenciosa ou assintomática, a biopsia e sorologia são positivas para DC, porém as manifestações clínicas associadas a DC são ausentes. Esses indivíduos são ocasionalmente diagnosticados por programas de rastreio por pertencerem ao grupo de risco, como parentes de primeiro grau de celíacos ou como portadores de doença autoimune associada a DC. Porém, identificam-se algumas características como: distúrbio no comportamento, redução na densidade mineral óssea, cansaço físico, fadiga crônica, tendências a depressão e irritabilidade. Na forma potencial, a sorologia e a tipagem do HLA são positivas para a patologia. O indivíduo pode ou não apresentar manifestações (FASANO; CATASSI, 2001; LIONETTE; CATASSI, 2011;

LUDVIGSSON et al., 2013; HUSBY et al., 2012; KANEEPKENS; VON BLOMBERG, 2012; SAPONE et al., 2012).

A DC é uma doença autoimune e um exemplo de enfermidade de etiologia multifatorial. Pode afetar qualquer órgão, não apenas o trato gastrointestinal. Manifesta-se em qualquer idade, variando consideravelmente entre indivíduos, e no mesmo indivíduo independente da fase da doença, o que dificulta seu diagnóstico. No entanto, dificilmente progride sem a presença dos alelos HLA específicos. Sendo assim, pacientes que apresentarem resultados HLA negativo raramente vão desenvolver a DC, porém o resultado positivo apresenta baixo valor preditivo. A análise do perfil genético, avaliando em geral parentes de celíacos, tem demonstrado um gradiente de risco para o desenvolvimento da DC que varia de 1:7, para indivíduos que apresentam ambas variantes HLA-DQ2 e DQ8, e até 1:2518 para indivíduos sem os alelos HLA predisponentes para a doença (MEGIORNI et al., 2009; LOUKA; SOLLID, 2003; PRATESI; GANDOLF, 2005).

Cerca de 90-95% dos pacientes celíacos são portadores das variantes que codificam HLA-DQ2 e outros 5%-10% das que codificam para HLA-DQ8 (KARREL et al., 2003). Esses alelos estão presentes em aproximadamente um terço da população normal, e são responsáveis por 40% do risco de desenvolver a doença (BEVAN et al., 1999; VAN BELZEN et al., 2004). Os outros 60% da suscetibilidade genética para DC são divididos em genes não associados ao HLA, ainda pouco conhecidos, e individualmente contribuem com pequeno efeito no risco total de desenvolvimento da patologia (TRYNCA et al., 2011).

Os familiares de primeiro grau de celíacos tem maior probabilidade de apresentarem DC, em torno de 10 a 20 vezes maior que a população geral. Em virtude disso, é aconselhável a realizar a pesquisa de anticorpos específicos (IgA-anti-tTG e IgA-EMA) e tipagem dos alelos, mesmo em indivíduos que se dizem assintomáticos (CASTRO-ANTUNES et al., 2010).

O diagnóstico sorológico da DC deve ser feito antes da retirada de alimentos contendo glúten, no caso a dieta restritiva, principal tratamento da patologia. Essa restrição pode mascarar os resultados dos exames, podendo minimizar as alterações histológicas e negatizar os exames sorológicos (ROSTON et al., 2006). A identificação dos alelos HLA predisponentes, para traçar o perfil genético dos pacientes celíacos, é importante para o diagnóstico da DC, principalmente em situações nas quais a biopsia ou a sorologia apresentam resultados indefinidos, segundo afirmam alguns pesquisadores (CHANG; GREEN, 2009; HILL et al., 2005).

A frequência das variantes DQ2 e DQ8 já foi bem estabelecida pelos estudos europeus. Espera-se que essa mesma frequência seja encontrada nos celíacos do Brasil, porém a diversidade étnica e a miscigenação encontrada nessa população podem gerar resultados diferentes em estudos futuros (ALMEIDA, 2014).

O objetivo do presente estudo foi determinar e avaliar a frequência dos alelos predisponentes para DC em indivíduos celíacos e seus parentes de primeiro grau.

2. Materiais e Métodos

2.1 População estudada

Este é um estudo da frequência dos alelos HLA predisponentes para DC (DQ2 e DQ8) em celíacos e seus parentes de primeiro grau (pai, mãe, irmão, irmã, filho e filha), com delineamento transversal.

No presente estudo foram analisadas 689 amostras de pacientes celíacos e seus parentes de primeiro grau, das quais 264 eram do sexo masculino e 425 eram do sexo feminino. Desse total, 208 são pacientes celíacos e que apresentam os alelos HLA predisponentes para DC, desse grupo 148 são do sexo feminino e 60 são do sexo masculino. Dos 481 parentes de primeiro grau de celíacos, 277 são do feminino e 204 do sexo masculino, todos foram atendidos no Ambulatório de Doença Celíaca do HUB entre 2004 e 2014. Todos os participantes ou responsáveis pelos participantes da pesquisa receberam amplo esclarecimento verbal sobre os objetivos, riscos e benefícios do estudo. Após concordância da participação no trabalho, foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido (anexo 1 e 2) em duas vias, uma das vias ficando em poder do participante ou responsável do participante da pesquisa.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília com os números 070/06 14/04/2010.

Os critérios de inclusão adotados para o grupo de celíacos foram: ter diagnóstico confirmado de doença celíaca realizado no ambulatório de Doença Celíaca do Hospital Universitário de Brasília (HUB) de acordo com os critérios estabelecidos pela Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN) (HUSBY et al., 2012); ter parentes de primeiro grau.

Os critérios de inclusão adotados para parentes: ter parentesco de primeiro grau (pai, mãe, irmão, irmã, filho e filha) com indivíduo celíaco de acordo com os critérios de inclusão citados acima.

Os parentes de primeiro grau que apresentaram sorologia positiva (EMA, anti-gliadina, anti-tTG e contra o complexo gliadina-tTG) foram excluídos do estudo.

2.2 Coleta de Amostras

Foram coletados de 3 a 5mL de sangue venoso periférico de pacientes celíacos e parentes de primeiro grau de celíacos, em tubos contendo anticoagulante EDTA. Essas amostras de sangue foram armazenadas a uma temperatura de 4°C por um período máximo de 72 horas antes da extração do material genético.

2.3 Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada pelo método de coluna de sílica, usando *kit* comercial *Illustra™ Blood genomicPrep Mini Spin* (GE HealthCare, Buckinghamshire, UK) seguindo as recomendações do fabricante.

A concentração final de cada amostra de DNA variou de 10 ng/μL a 100 ng/μL e foram armazenadas a uma temperatura de -20° C. Após a extração do DNA, as amostras de sangue foram devidamente tratadas e descartadas como resíduos biológicos.

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

2.4 Tipagem dos genes HLA DQ2 e DQ8

De posse das amostras de DNA realizou-se amplificação dos alelos DQ2 (DQA1*05 e DQB1*02), e DQ8 (DQA1*03 e DQB1*03:02) A amplificação desses alelos foi realizada pelo método de PCR em tempo real (q-PCR ou *real time* PCR), utilizando o aparelho *Step-One Instrument* (Applied BioSystems – Life Technologies™, Carlsbad, USA). Foram utilizadas sequencias específicas de *primers* para os alelos DQA1*05, DQB1*02 e

DQA1*03:01 como descrito por Olerup et al (1993), e as sequencias dos *primers* para o alelo DQB1*03:02 foram utilizadas de acordo como descrito por Profaizer et al (2011) (Tabela 1). Como controle da reação de PCR foi usado um par de *primers* de uma região conservada do gene HGH, o Hormônio do Crescimento (*Human Growth Hormone*) conforme Profaizer et al (2011) descreveu (ALMEIDA, 2014). Todos os *primers* foram usados em uma concentração de 10 μ M (Tabela 1)

Tabela 1 - Sequência dos *primers* utilizados para q-PCR

Alelo	Primer		Referências
	Forward (5'-3')	Reverse (3'-5')	
DQA1*05 (1993)	5'-ACG GTC CCT CTG GCC AGT	5'-AGT TGG AGC GTT TAA TCA	Olerup <i>et al.</i>
	A-3'	GAC-3'	
DQB1*02 (1993)	5'-GTG CGT CTT GTG AGC AGA	5'-GCA AGG TCG TGC CGA GCT-	Olerup <i>et al.</i>
	AG-3'	3'	
DQA1*03 (1993)	5'-TTC ACT CGT CAG CTG ACC	5'-CAA ATT GCG GGT CAA ATC	Olerup <i>et al.</i>
	AT-3'	TTC T-3'	
DQB1*03:02 (2011)	5'-GCG CGT GCG TCT TGT GAC	5'-CTG TTC CAG TAC TCG GCG	Profaizer <i>et al.</i>
	C-3'	GCA-3'	
HGH (1993)	5'-GCC TTC CCA ACC ATT CCC	5'-TCA CGG ATT TCT GTT GTG	Olerup <i>et al.</i>
	TTA-3'	TTT-3'	

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

Os alelos DQA1*05, DQB1*02 e DQA1*03 foram amplificados sob as seguintes condições: uma etapa inicial de desnaturação de 10 minutos a 95°C, seguida de uma sequência de 32 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 60 segundos a 60°C (anelamento e extensão); após a amplificação dos alelos segue-se a etapa da curva de

melting (essa etapa é realizada em 3 passos: 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e novamente 95°C por 15 segundos).

O alelo DQB1*03:02 foi amplificado de acordo com as condições descritas por Profazer et al (2011): uma etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguida de 6 etapas de amplificação. A primeira etapa de amplificação foi seguida de 2 ciclos de 20 segundos a 95°C, 45 segundos a 71°C e 10 segundos a 72°C. A segunda etapa de amplificação foi seguida de 10 ciclos de 20 segundos a 95°C, 45 segundos a 70°C e 10 segundos a 72°C. A terceira etapa de amplificação seguida de uma sequência de 10 ciclos de 20 segundos a 95°C, 45 segundos a 69°C e 10 segundos a 72°C. A quarta etapa de amplificação foi seguida de 5 ciclos de 20 segundos a 95°C, 45 segundos a 67°C e 10 segundos a 72°C. A quinta etapa de amplificação foi seguida de 5 ciclos de 20 segundos a 95°C, 45 segundos a 66°C e 10 segundos a 72°C. A sexta e última etapa de amplificação foi seguida de uma sequência de 2 ciclos de 20 segundos a 95°C, 45 segundos a 65°C e 10 segundos a 72°C. Após a amplificação dos alelos segue a etapa da curva de *melting*, seguida de 1 ciclo de 5 segundos a 95°C, 1 minuto a 50°C e etapa final com aumento de temperatura e contínuo por 1 minuto a 97°C.

Para garantir a qualidade do produto amplificado pela técnica de PCR em tempo real, em todas as reações foram analisados as curvas de desnaturação e os produtos da amplificação dos alelos no final de cada reação.

A figura 1 representa exemplos de picos de desnaturação dos alelos, que são gerados a partir da derivada da intensidade de fluorescência da curva de desnaturação (-R), onde observa um único pico de *Temperature melting* (T_m), que é única para cada alelo estudado, o que demonstra a presença de um único produto amplificado para cada alelo individualmente. A T_m média correspondente a cada alelo alvo foi de $80,12 \pm 0,1^\circ\text{C}$ para o alelo DQA1*05; $86,49 \pm 0,13^\circ\text{C}$ para DQB1*02; $80,69 \pm 0,11^\circ\text{C}$ para DQA1*03; $86,15 \pm 0,23^\circ\text{C}$ para DQB1*03:02 e $83,53 \pm 0,07^\circ\text{C}$ para o gene HGH.

3. Resultados

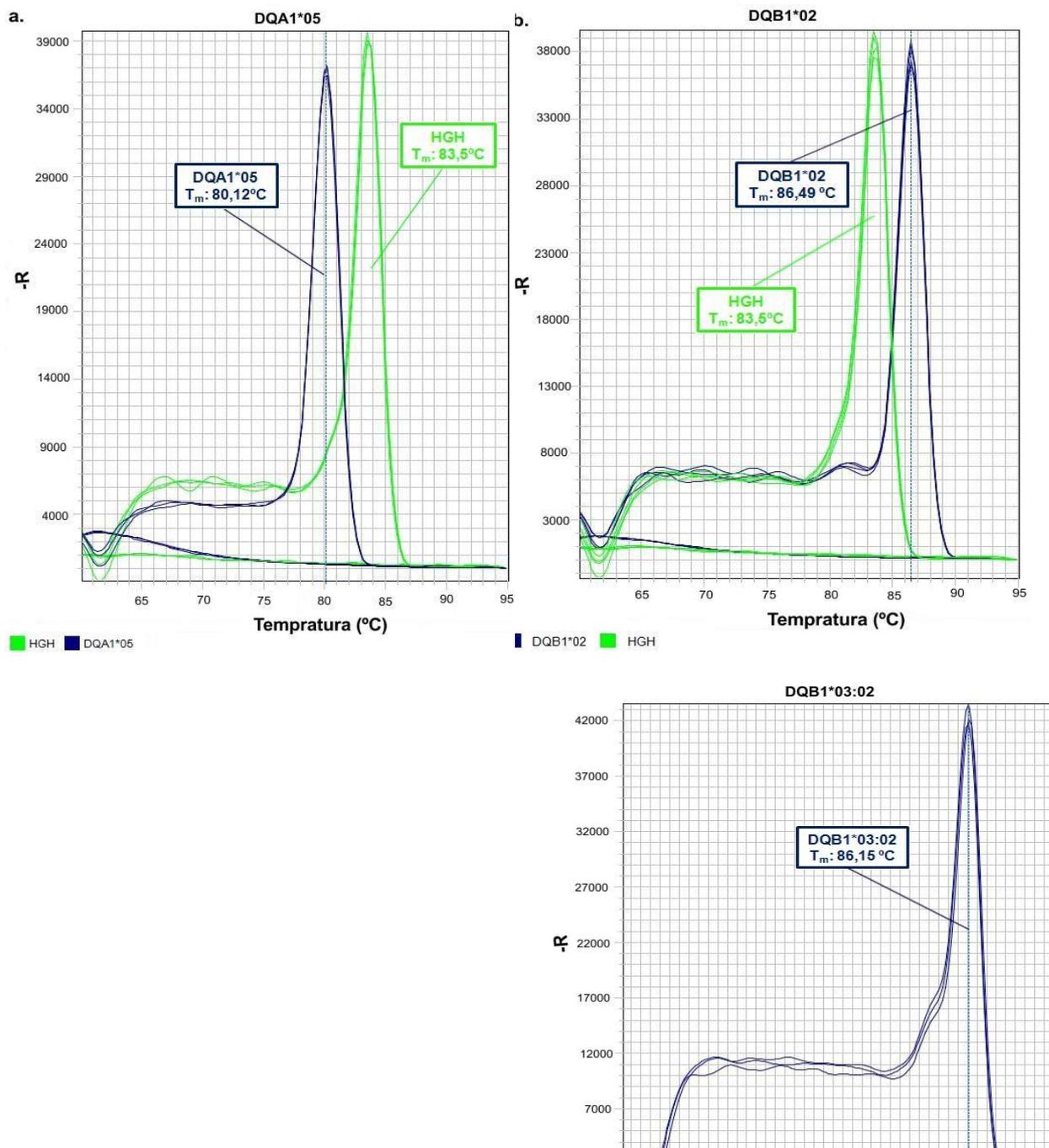
3.1 Distribuição da frequência dos alelos HLA predisponentes para DC

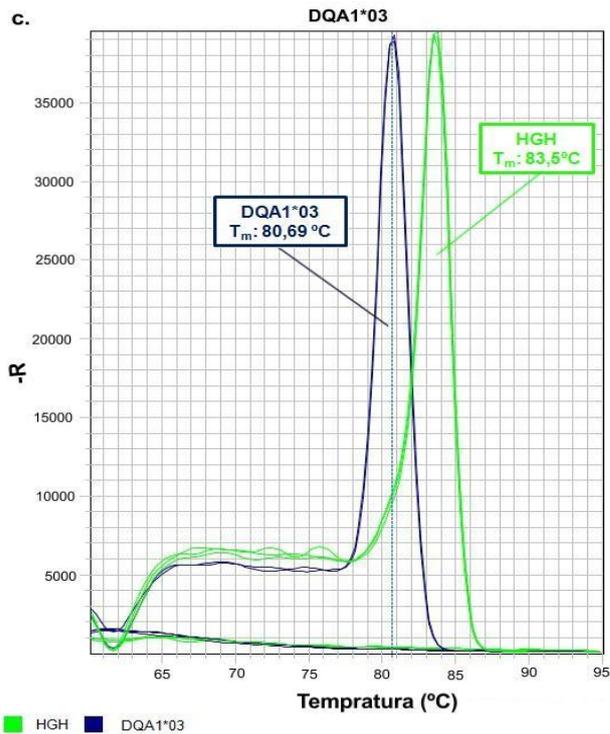
Dos 208 celíacos, 7,69% (n=16) apresentaram tanto os alelos que codificam para o heterodímero DQ2 (DQA1*05 e DQB1* 02) quanto para o DQ8 (DQA1*03 e DQB1*03:02);

75,49% (n=157) apresentaram o DQ2 (DQA1*05 e DQB1*02); 5,28% (n=11) apresentaram apenas um dos alelos que codificam o DQ2. Desses 1,44% foram positivos para o alelo DQA1*05 e 3,84% para o alelo DQB1*02. Dos 24 celíacos restantes, 10,58% (n=22) foram positivos para DQ8, desses 5,77% apresentaram a variante DQ8 e o alelo DQB1*02 e 0,96% (n=2) não apresentaram nenhum dos alelos predisponentes para DC. A distribuição detalhada da frequência dos alelos HLA predisponentes para DC em celíacos está demonstrada na tabela 2 e figura 2.

Figura 1 – Representação gráfica das curvas de *melting* (curvas de desnaturação) dos alelos predisponentes para DC e do controle endógeno da reação (HGH) e fluorescência da curva de desnaturação (-R). Temperatura em °C.

a. DQA1*05 b. DQB1*02 c. DQA1*03 d. DQB1*03:02.



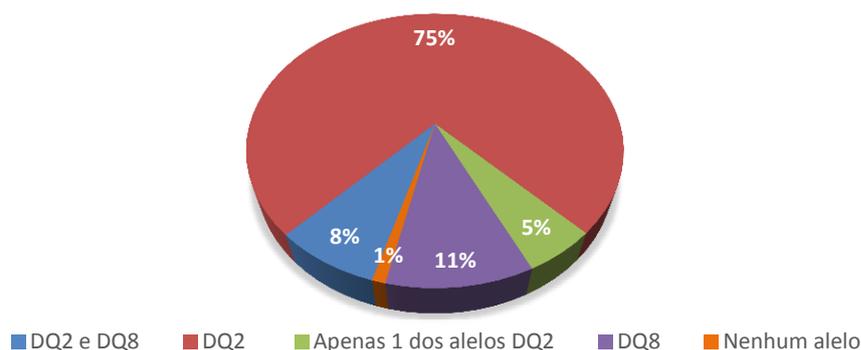


Fonte: SELLESKI, 2015.

Tabela 2 - Frequência dos alelos HLA predisponentes para DC encontrados em 208 celíacos.

HLA	Celíacos	
	n	%
DQ2 e DQ8	16	7,69%
DQ2	157	75,49%
Apenas um dos alelos DQ2	11	5,28%
DQ8	22	10,58%
Nenhum alelo	2	0,96%

Figura 2 - Frequência dos alelos HLA predisponentes para DC encontrados em 208 celíacos.

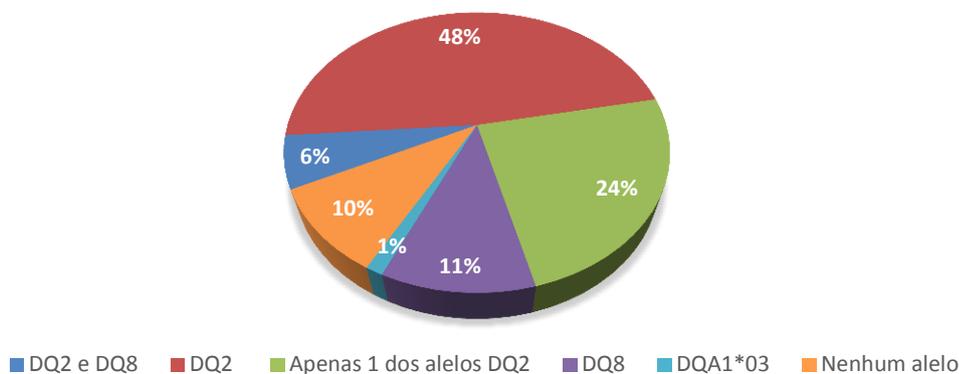


Dos 481 parentes de primeiro grau de celíacos, 6,03% (n=29) apresentaram tanto os alelos que codificam para o heterodímero DQ2 (DQA1*05 e DQB1* 02) quanto para o DQ8 (DQA1*03 e DQB1*03:02); 48,02% (n=231) apresentaram apenas o DQ2 e 24,12% (n=116) apresentaram apenas um dos alelos que codificam o DQ2. Desses 8,94% foram positivos para o alelo DQA1*05 e 15,18% para o alelo DQB1*02. Dos 105 parentes de celíacos restantes, 10,81% (n=52) foram positivos para DQ8, desses 2,29% apresentaram a variante DQ8 e o alelo DQB1*02; 1,25% (n=6) apresentaram o alelo DQA1*03 e 9,77% (n=47) não apresentaram nenhum dos alelos predisponentes para DC. A distribuição detalhada da frequência dos alelos HLA predisponentes para DC em parentes de celíacos de primeiro grau está demonstrada na tabela 3 e figura 3.

Tabela 3 - Frequência dos alelos HLA predisponentes para DC encontrados em 481 parentes de primeiro grau de celíacos.

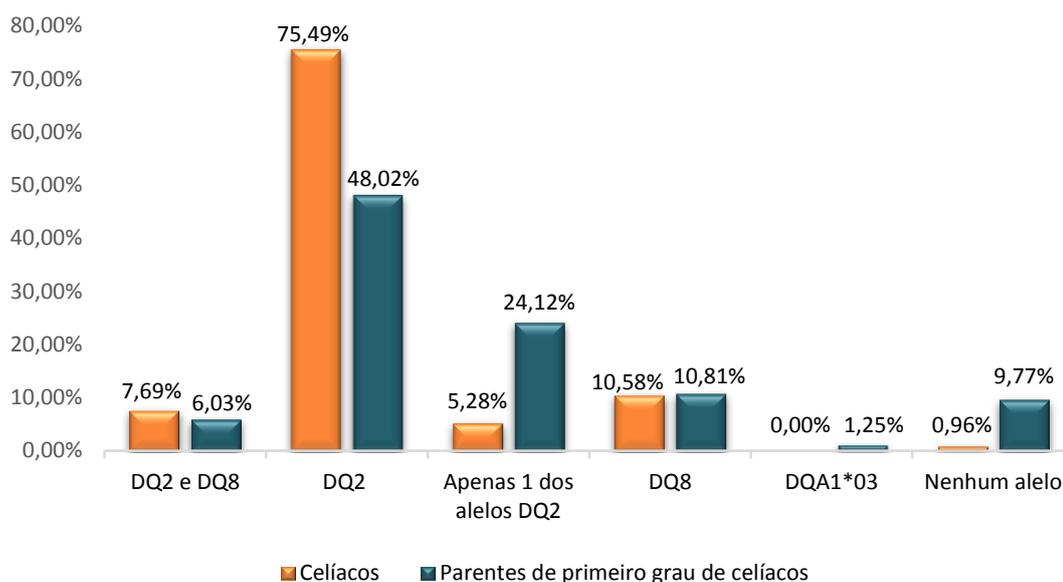
HLA	Parentes de primeiro grau	
	n	%
DQ2 e DQ8	29	6,03%
DQ2	231	48,02%
Apenas um dos alelos DQ2	116	24,12%
DQ8	52	10,81%
DQA1*03	6	1,25%
Nenhum alelo	47	9,77%

Figura 3 - Frequência dos alelos HLA predisponentes para DC encontrados em 481 parentes de primeiro grau de celíacos.



Na figura 4, comparam-se os resultados obtidos da distribuição da frequência dos alelos predisponentes para a DC nos celíacos e seus parentes de primeiro grau, onde observa-se que os alelos que codificam o heterodímero DQ2 (DQA1*05 e DQB1* 02) foram os mais frequentes em ambos os grupos e foram encontrados em 75,49% nos celíacos e 48,02% em seus parentes de primeiro grau. Nos parentes de celíacos também destacou a frequência de apenas 1 dos alelos que codificam o HLA DQ2 em 24,12%, onde o mais frequente foi o alelo DQB1*02 em 15,18%. E o alelo DQA1*03:02 apresentou frequência (1,25%) apenas nesse respectivo grupo.

Figura 4 - Frequência dos alelos HLA predisponentes para DC em pacientes celíacos e seus parentes de primeiro grau.



4. Discussão

No presente estudo os genótipos DQ2 e/ou DQ8 estavam presentes em 93,76% dos indivíduos celíacos. Todavia, os alelos que codificam apenas o heterodímero DQ2 estavam presentes em 75,49%, e unicamente os alelos que codificam o heterodímero DQ8 estavam presentes em 10,58%, e os alelos que codificam ambas as variantes DQ2 o DQ8 estava em 7,69% dos casos. Por sua vez, nos parentes de primeiro grau desses celíacos, 64,86% apresentaram os genótipos DQ2 e/ou DQ8, na qual os alelos que codificam somente o heterodímero DQ2 estavam presentes em 54,05%, e os alelos que codificam exclusivamente DQ8 em 10,81%, enquanto as duas variantes (DQ2 e DQ8) estavam presentes em 6,03% dos indivíduos desse grupo. Tais resultados se assemelham aos do estudo realizado em Recife, por Castro - Antunes et al, (2011). Neste, os indivíduos celíacos apresentaram os genótipos DQ2 e/ou DQ8 com a frequência de 93,2%, sendo somente o HLA DQ2 em 75,6% e unicamente o HLA DQ8 17,8%. Em familiares os genótipos DQ2 e/ou DQ8 esteve presente em 79%, sendo apenas o HLA DQ2 e de 52,4%, e somente HLA DQ8 de 15,9%, enquanto para os HLA DQ2 e DQ8 juntos foi de 10,3%.

Essa discreta discrepância na frequência das variantes entre os dois estudos, principalmente no que se refere ao HLA DQ8, poderia ser explicada em parte pelo tamanho da amostra. No estudo realizado em Recife, foram avaliados 73 pacientes celíacos e 126 familiares de primeiro grau, em contraste aos 208 celíacos e 481 parentes de primeiro grau do presente estudo. Outra provável explicação seria o fato dos grupos estudados residirem em

regiões brasileiras diferentes. De acordo com IBGE (2010), a população residente no Distrito federal é composta por 60% da região centro-oeste, 23% região nordeste e 12% sudoeste e os outros 5% das regiões sul, norte, sem especificação e de país estrangeiro. Esses dados demonstram que a população brasiliense é composta por várias regiões do Brasil, o que provavelmente explicaria essa discreta discrepância das frequências.

No estudo de Cecilio e Bonatto (2015), ao avaliar 146 pacientes visando determinar a frequência dos genes HLA DQ2 e DQ8 em portadores de doença celíaca, seus familiares e na população em geral, observou-se que em pacientes com DC a frequência era de 98,6% para os genótipos DQ2 e DQ8; 79,7% apenas para o HLA DQ2, 8,1% para o HLA DQ8 e 10,8% apresentaram as variantes DQ2 e DQ8. Em familiares de primeiro grau de celíacos, 89,7% apresentaram para os genótipos DQ2 e DQ8, sendo 76% unicamente para o HLA DQ2; 10,3% para HLA DQ8 e 3,4% apresentaram ambas as variantes DQ2 e DQ8. Tais resultados corroboram com os achados apresentados nesse estudo.

Outro estudo realizado no Distrito federal por Selleski (2015), na qual analisou grupos de crianças celíacas e não celíacas, apresentou dados similares com o presente estudo, onde os genótipos HLA DQ2 e DQ8 estavam presentes em 92% das crianças celíacas.

Segundo Polvi et al. (1998), na Europa, estudos relataram a frequência do alelo HLA DQ2 variando de 86 a 93%, e o alelo HLA DQ8 com a frequência por volta de 3 a 8% em pacientes celíacos. Nos Estados Unidos quando comparado aos dados europeus, foi evidenciado uma maior frequência de HLA DQ8, aproximadamente 16%, e em menor frequência o HLA DQ2, em torno de 82% (JOHSON et al., 2004). Em pacientes celíacos cubanos a frequência do HLA DQ2 foi aproximadamente 86%, resultados semelhantes ao estudo realizado no Estados Unidos (CINTATO et al., 2006).

A frequência dos genótipos DQ2 e DQ8 dos pacientes celíacos nesse estudo foram semelhantes aos resultados apresentados na Europa. Outro estudo, realizado por Almeida (2014), determinou a frequência de alelos HLA predisponentes para DC em um grupo de recém-nascidos do Distrito Federal, onde os resultados encontrados foram semelhantes ao da Europa.

Segundo Pena et al. (2009), as variabilidades ancestrais brasileiras têm três etnias principais: europeia, africana e ameríndia. E nos últimos dois séculos ocorreram migrações principalmente de sírios, alemães, portugueses, libaneses, italianos e espanhóis que contribuíram com a diversidade populacional brasileira, o que dificulta a caracterização de um indivíduo em um determinado grupo étnico específico. No entanto, a forte ascendência

européia da população brasileira, principalmente nas regiões sul e sudeste, também se refletindo no centro-oeste, poderia explicar essa relação entre as frequências dos estudos realizados na Europa e as do presente estudo.

Outras frequências descritas nesse estudo, presentes em ambos os grupos, foram a presença de apenas um dos alelos que codificam o heterodímero DQ2. Desses 1,44% foram positivos para o alelo DQA1*05 e 3,84% para o alelo DQB1*02 em indivíduos celíacos. Em seus parentes de primeiro grau, 8,94% foram positivos para o alelo DQA1*05 e 15,18% para o alelo DQB1*02. Os celíacos que foram positivos para o DQ8 (10,58%), desses 5,77% apresentaram a variante DQ8 e o alelo DQB1*02, e em seus parentes que foram positivos para o DQ8 (10,81%), desses 2,29% apresentaram a variante DQ8 e o alelo DQB1*02. O alelo DQA1*03 foi encontrado em apenas 1,5% dos parentes de celíacos. No grupo de celíacos 0,96% e no grupo de seus parentes 9,77% foram negativos para todos os alelos predisponentes para DC.

Um estudo realizado com a população italiana analisou o gradiente de risco para DC associada aos genes HLA DQ2 (DQA1*05 e DQB1*02) e DQ8 (DQA1*03 e DQB1*03:02), com a probabilidade da doença na população em geral era de 1:100. Observou-se que a presença desses genes confere maior risco para desenvolvimento da doença celíaca de 1:7, sendo a presença da variante DQ8 (DQA1*03 e DQB1*03:02) em conjunto com o alelo DQB1*02 confere o risco de 1:24. A presença apenas do alelo DQA1*05 confere menor risco de 1:1842 e o alelo DQB1*02 confere risco quando estiver em homozigose. Aqueles indivíduos que não apresentam nenhum dos alelos predisponentes tem menor risco para o desenvolvimento da DC de 1:2518 (MEGIORNI et al., 2009).

De acordo com alguns pesquisadores, na população em geral e frequência desses genótipos HLA é cerca de 25-30%, no entanto apenas 1-3% desses indivíduos desenvolve a patologia (TRYNCA; WINJMENGA; VAN HEEL, 2010; WOLTERS E WINJMENGA, 2008). Sendo que os familiares de primeiro grau de celíacos tem maior probabilidade de desenvolver a patologia, em torno de 10 a 20 vezes maior que a população geral (CASTRO-ANTUNES et al, 2011). Porém, sem a presença desses alelos o risco de desenvolvimento para DC é mínima, com porcentagens menor que 0,5%, conferindo um alto valor preditivo negativo, tornando-se o teste genético de preferência.

A genotipagem desses alelos HLA predisponentes é considerada uma excelente opção antes da realização de procedimentos invasivos (endoscopias seguidas de biopsias), principalmente quando a sorologia for duvidosa. Pode também ser útil para definir a

necessidade de acompanhamento médico especializado em indivíduos pertencentes ao grupo de risco, como por exemplo, doenças autoimunes associadas a DC, síndrome de Down, Turner ou Williams, indivíduos com imunodeficiência de imunoglobulina A e parentes de primeiro grau de pacientes celíacos. Aqueles que não apresentarem os alelos predisponentes para DC seriam poupados de realizar exames sorológicos, bem como os procedimentos mais invasivos. No entanto, na presença dos respectivos alelos de risco, seria necessário realizar exames para a detecção de anticorpos específicos, anti-tTG IgA e anti-EMA IgA, periodicamente, a fim de prevenir a não detecção das formas silenciosas e subclínicas da DC (KAUKINEN et al, 2002; BJORK et al, 2010; SOLLID, LIE 2005; DUBOIS et al, 2010; ANDERSON et al, 2013). No entanto, a tipagem de HLA-DQ não é geralmente usada como exame de triagem, sendo que DQ2 / DQ8 está presente em torno de 30% dos indivíduos saudáveis (MEGIORNI et al., 2009).

5. Considerações finais

As frequências apresentadas corroboraram com estudos realizados na região Nordeste e Sul. A discreta discrepância encontrada poderia ser explicada pelo tamanho amostral ou pelo fato de parte da população que reside no Distrito Federal ser nativa de outras regiões do Brasil. Outros estudos que demonstraram semelhanças foram realizados também no Distrito Federal, bem como na Europa, Estados Unidos e Cuba.

Ainda há poucos estudos definindo a frequência dos genes HLA DQ2 e DQ8 na população brasileira, bem como na América Latina, o que subestima a importância da tipagem para o diagnóstico e o acompanhamento dos pacientes celíacos e os grupos de risco. Estudos amplos, multicêntricos, podem contribuir para a ampliação do conhecimento sobre a relevância do método e sua capacidade de tornar mais precisos os atuais protocolos clínicos para diagnóstico e acompanhamento dos pacientes e dos grupos de risco.

O presente estudo, apesar do grande número de indivíduos avaliados, se limita aos celíacos com diagnóstico confirmado e um grupo de risco restrito a seus parentes. Sendo assim, os resultados não definem precisamente a importância da tipagem genética em outros grupos de risco e na população em geral. Além disso, há ainda aqueles dentro do grupo dos parentes que podem se tornar celíacos em um futuro próximo, pois a DC pode manifestar em qualquer idade, o que alteraria os resultados obtidos.

É importante realizar a genotipagem desses alelos que conferem risco para a doença celíaca, principalmente dentro do grupo de risco. Além disso, para auxiliar no diagnóstico de pacientes com biópsia e testes sorológico duvidosos. Há relevância no estudo da frequência desses alelos nos grupos de risco e na população geral. Assim, a realização de futuros trabalhos em outras regiões pode contribuir para melhorar a compreensão da doença celíaca e de seus alelos HLA predisponentes no Brasil.

Referências Bibliográficas:

ABADIE, V.; SOLLID, L.M., BARREIRO, L.B., JABRI B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. **Annual Review of Immunology**, Paulo Alto, v.29, p. 493-525, Apr. 2011.

ALMEIDA, F.C.D.E. **Prevalência dos genes HLA-DQ2 e DQ8, predisponentes para doença celíaca, em recém-nascidos do Distrito Federal.** 2014. 71f. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

ANDERSON, R.P. et al. A novel serogenetic approach determines the community prevalence of celiac disease and informs improved diagnostic pathways. **BMC Medicine**, London, v.11, n.1, p.188, Aug. 2013.

BEVAN, S.; POPATA, S.; BRAEGGERB, C.P.; BUSCHC, A.; O'DONOGHUED, D., et al; Contribution of the MHC region to the familial risk of coeliac disease. **Journal of Medical Genetics**, London, v.36, n. 9, p.687–690, Set. 1999.

BJORCK, S. et al. Screening Detects a High Proportion of Celiac Disease in Young HLA-genotyped Children. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v. 50, n. 1, p.49–53, Jan. 2010.

Di SABATINO A, CORAZZA GR. Coeliac disease. **The Lancet**, London, v.373, n. 9673, p.1480-93, Apr. 2009.

CASTRO-ANTUNES, M. M. el al. Celiac disease in first-degree relatives of patients. **Journal of Pediatric**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 4, p.331-336, Jul./ Aug. 2010.

CASTRO-ANTUNES, M.M. et al. Fequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 in celiac patients and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil. **Revista do Hospital das Clínicas de São Paulo**, São Paulo, v. 66, n. 2, p. 227–31, Feb. 2011.

CHANG M, GREEN P H R. Genetic Testing Before Serologic Screening in Relatives of Patients With Celiac Disease as a Cost Containment Method. **Journal of Clinical Gastroenterology**, New York, v. 43, n. 1, p. 43-50, Jan. 2009.

CECÍLIO, L.A., BONATTO, M.W.; Prevalência do HLA DQ2 e DQ8 em pacientes portadores da doença celíaca, nos seus familiares e na população geral. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (ABCD)**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 183-185, Jul./Set. 2015.

CINTADO, A.S.L. et al. HLA DQA1*0501 and DQB1*02 in Cuban celiac patients. **Human Immunology**, New York, v. 67, n. 8, p.639-642, Aug. 2006.

CROVELLA, S. et al. Speeding up coeliac disease diagnosis in the developing countries. **Digestive and Liver Disease**, Amsterdam, v. 39, n.10, p. 900–902, Oct. 2007.

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

FASANO, A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. **Physiological Reviews**, Washington, v.91, n.1, p.151–175, Jan. 2011.

FASANO A, CATASSI C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.120, n.3, p. 636–51, Feb. 2001.

HILL et al. Guideline for the Diagnosis and Treatment of Celiac Disease in Children: Recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, New York, v. 40, n. 1, p. 1-19, Jan. 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**, New York, v.54, n.1, p.136–60, Jan. 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo 2010**. Disponível em: <<http://censo2010.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 17 maio 2016.

JOHNSON, T.C. et al. Relationship of HLA-DQ8 and severity of celiac disease: Comparison of New York and Parisian cohorts. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, United States and Paris, v.2, n.10, p.888-894, Oct. 2004.

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**, New York, v. 64, n.4, p. 469–77, Apr. 2003.

KAUKINEN, K. et al. HLA-DQ Typing in the Diagnosis of Celiac Disease, **The American Journal of Gastroenterology**, New York, v.97, n.3, p. 695-9, Mar. 2002.

KNEEPKENS C.M., VON BLOMBERG B.M. Clinical practice: coeliac disease. **European journal of pediatrics**, Berlim, v. 171, n.7, p.1011-21, Jul. 2012.

KLEIN, J; SATO, A. The HLA System. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.343, n.10, p.702-709, Sep. 2000.

KUPFER S. S.; JABRI B. Pathophysiology of Celiac Disease. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, Philadelphia, v.22, n.4, p.639–660, Oct. 2012.

- LIONETTI, E.; CATASSI, C. New Clues in Celiac Disease Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. **International Reviews of Immunology**, London, v.30, n.4. p.219–231, Aug. 2011.
- LINDFORS K, MAKI M, KAUKINEN K. Transglutaminase 2-targeted autoantibodies in celiac disease: Pathogenetic players in addition to diagnostic tools? **Autoimmunity Reviews**, Amsterdam, v. 9, n. 11, p.744-749, Sep. 2010.
- LUDVIGSSON, J. et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. **Gut**, London, v.62, n.1, p.43–52, Jan. 2013.
- LOUKA, A.S.; SOLLID, L.M. HLA in coeliac disease unravelling the complex genetics of a complex disorder. **Tissue Antigens**, England, v. 61, n.2, p. 105–117, Feb. 2003.
- MEDRANO, LM; DEMA, B; LOPEZ-LARIOS, A. HLA and Celiac Disease Susceptibility: New Genetic Factors Bring Open Questions about the HLA Influence and Gene-Dosage Effects. **Plos One**, San Francisco, v.7, n. 10, p.1-5, Oct. 2012.
- MERESSE B, MALAMUT G, CERF-BENSUSSAN N. Celiac disease: an immunological jigsaw. **Immunity**, Cambridge, v.36, n.6, p.907-19, Jun. 2012.
- MEGIORNI, F. et al. HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. **Human Immunology**, New York, v. 70, n.1, p.55-59, Jan, 2009.
- MELO, S.B.C. et al. Prevalence and demographic characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirao Preto, São Paulo, Brazil. **Digestive Disease and Sciences**, New York, v. 51, n. 5, p. 1020–1025, May 2006.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION- NCBI. **HLA DQA1 Major Histocompatibility Complex, class II, DQ alpha 1 [Homo sapiens (human)]**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3117>>. Acesso em: 10 de julho de 2016.
- OLERUP O. et al. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequencespecific primers (PCR-SSP) in 2 hours. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.41, n.3, p.119-34, Mar. 1993.
- PENA S.D, BASTOS-RODRIGUES L, PIMENTA J.R, BYDLOWSKI S.P. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.42, n.10, p.870-6, Oct. 2009.
- PRATESI R, GANDOLFI L. Doença celíaca: a afecção com múltiplas faces. **Jornal de Pediatria**, Brasília, v. 81, n.5, p: 357-358, Sep/Oct, 2005.
- PRATESI, R. et al. Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, England, v.38, n.7, p.747–750, Jul. 2003.
- POLVI, A. et al. HLA-DQ2-Negative Celiac Disease in Finland and Spain. **Human Immunology**, New York, v.59, n. 3, p.169 –175, Mar. 1998.

PROFAIZER T, ECKELS D, DELGADO JC. Celiac disease and HLA typing using real-time PCR with melting curve analysis. **Tissue Antigens**. Copenhagen, v.78, n.1, p.31–7, Jul. 2011.

ROSTOM A, MURRAY JA, KAGNOFF MF. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.131, n.6, p.1981-2002, Dec, 2006.

SAPONE, A. et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. **BMC Medicine**, London, v.7, n.10, p. 13, Feb. 2012.

SCHUPPAN, D.; JUNKER, Y.; BARISANI, D. Celiac Disease From Pathogenesis to Novel Therapies. Reviews in basic and clinical gastroenterology. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.137, n.6, p.1912–1933, Dec. 2009.

SELLESKI, N. **Prevalência de alelos HLA predisponentes para a doença celíaca (HLA DQ2 e HLA DQ8) em crianças celíacas e não celíacas**. 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado) do Programa de Pós- Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

SOLLID LM, LIE BA. Celiac Disease Genetics: Current Concepts and. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, Philadelphia, v.3, n.9, p.843–851, Sep. 2005.

SOLLID L.M, JABRI B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. **Nature Reviews Immunology**, New York, v.13, n.4, p.294-302, Apr. 2013.

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

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

WOLTERS VM, WIJMENGA C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. **The American Journal of Gastroenterology**, Netherlands, v. 103, n. 1, p. 190-195, Jan. 2008.

Anexo I

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

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

O objetivo desta pesquisa é: **avaliar a frequência dos alelos predisponentes para DC em indivíduos celíacos e seus parentes de primeiro grau**. Esses alelos são genes que quase todos os celíacos possuem.

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

A participação do(a) seu(sua) filho(a) será através de uma coleta de sangue periférico, que é um procedimento que não causará dor ou desconforto ao seu(sua) filho(a) e que tem risco mínimo para a saúde. O sangue será coletado no Ambulatório de Doença Celíaca do Hospital Universitário de Brasília (HUB), na data combinada _____ com um tempo estimado para sua realização: 10 minutos. Informamos que o(a) Senhor(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

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

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

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

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

Nome / assinatura

Pesquisador Responsável

Brasília, ____ de _____ de _____

Anexo II

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto “**Frequência dos alelos HLA DQ2 e HLA DQ8 em celíacos e seus parentes de primeiro grau no Distrito Federal**”. Esse projeto é um estudo sobre a doença celíaca, que é uma doença provocada por uma sensibilidade ao glúten. O glúten é uma proteína contida no trigo, cevada e centeio, por isso, quando a pessoa com doença celíaca come pão, biscoito, bolo, massas e outros alimentos que contém glúten, ela pode vir a apresentar sintomas como: diarreia, perda de peso, vômitos, barriga distendida, fraqueza e irritação. A doença celíaca tem ligação com genes chamados HLA DQ2 e DQ8, portanto, se você apresentar esses genes terá chances de desenvolver a doença celíaca, mas não é certeza, pois muitas pessoas têm esse gene e não são celíacas.

O objetivo desta pesquisa é: **avaliar a frequência dos alelos predisponentes para DC em indivíduos celíacos e seus parentes de primeiro grau**. Esses alelos são genes que quase todos os celíacos possuem.

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

A sua participação será através de uma coleta de sangue periférico, que é um procedimento que não lhe causará dor ou desconforto e que tem risco mínimo para a saúde. O sangue será coletado no Ambulatório de Doença Celíaca do Hospital Universitário de Brasília (HUB), na data combinada _____ com um tempo estimado para sua realização: 10 minutos. Informamos que o(a) Senhor(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

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

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

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

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

Nome / assinatura

Pesquisador Responsável

Brasília, ____ de _____ de _____