

Orientação e diagnóstico genético de HLA-DQ2 e HLA-DQ8 relacionados ao risco de desenvolvimento da doença celíaca em celíacos e grupos de risco

STELA BITTENCOURT CARDOSO¹

ALICE KUNZGEN SCHEER, CLÉDIA SILVEIRA FLORES DA SILVA, AMANADA
BARBOSA ATRIB

PROF. DR. CARLOS CASTILHO DE CARROS³

¹Universidade Federal de Pelotas– steabittencourt@live.com

Universidade Federal de Pelotas– alicekunzgen@gmail.com

Universidade Federal de Pelotas– clediajag@gmail.com

Universidade Federal de Pelotas– amanda_b_atrib@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas– barroscpel@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Doença Celíaca (DC) é caracterizada por uma enteropatia autoimune desencadeada pela ingestão de glúten em indivíduos geneticamente predispostos com haplótipos do Antígeno Leucocitário Humano (HLA), principalmente HLA-DQ2 ou HLA-DQ8.

O objetivo deste estudo foi descrever um método para genotipar as principais variações genéticas causadoras da DC. Os alelos de risco relacionados ao complexo antígeno leucocitário humano (HLA) estão associados à gravidade da lesão intestinal, aos resultados dos testes sorológicos, às doenças relacionadas à DC e à sintomatologia.

Padronizamos um método para analisar o DNA de 140 pacientes com DC e identificar a distribuição dos três alelos de risco mais importantes para o desenvolvimento de DC (DQA1*05:01, DQB1*02:01 e DRB1*04, este último como marcador para o haplótipo DQB1*03:02/DQA1*03/DRB1*04). Dados sorológicos, resultados de biópsia, sintomatologia e incidência de doenças associadas à DC foram coletados por meio de questionário previamente validado.

2. METODOLOGIA

O perfil clínico dos pacientes com DC foi avaliado por meio de questionário adaptado de outro estudo já aprovado e testado para uso em pacientes com DC, incluindo, entre outras, questões sobre resultados de biópsia intestinal, testes sorológicos, sintomas relacionados à DC e presença de outras doenças relacionadas (CASOL CA; DE PELLEGRIN CP et al 2007).

As células bucais foram coletadas para análise de DNA por meio da raspagem da parede interna das bochechas com um swab estéril, logo após a realização de bochechos com água mineral para reduzir a contaminação bacteriana. Os swabs foram identificados com códigos numéricos para proteger a identidade do participante e armazenados a -20 °C até a extração do DNA no laboratório.

Quanto a extração de DNA genômico e controle de qualidade, um protocolo adaptado para purificação de DNA genômico de Miller et al. foi usado [18]. A qualidade do DNA foi confirmada por um teste-PCR utilizando primers que reconhecem um gene constitutivo (enzima conversora de angiotensina) como controle. Os primers utilizados foram 5'-CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT-3' e 5'-GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTA GA-3' e os produtos da PCR foram

analisados em gel de agarose 1% após eletroforese pelo observação de um produto de 490pb (ARANALDE LCR. PEDERZOLI BS et al 2016).

A amplificação dos alelos estudados foi realizada por PCR. Os alelos de interesse foram DQA1*05:01 e DQB1*02:01 (relativos ao complexo DQ2.5 e aos haplótipos DR3-DQ2) e DRB1*04 (relativos ao complexo DQ8 identificando o haplótipo DR4-DQ8).

As reações foram preparadas em volume final de 20µL utilizando o GoTaq® Green Master Mix (PROMEGA, EUA) com 2 µL de DNA genômico e primers específicos adaptados do protocolo descrito por SACCHETTI et al. (2001). Primers para identificar os alelos de risco DQ2 alfa-1 (5'-AGC AGT TCT ACG TGG ACC TGG GG-3' e 5'-GGT AGA GTT GGA GCG TTT AAT CAG A-3') geraram um produto de PCR de 144bp, enquanto primers que identificam os alelos de risco DQ2 beta-1 (5'-CGC GTG CGT CTT GTG AGC AGA AG-3' e 5'-GGC GGC AGG CAG CCC CAG CA-3') geraram um amplicon de 110 pb. Os primers que identificam o alelo de risco DQ8 (5'-GGT TAA ACA TGA GTG TCA TTT CTT AAA C-3' e 5'-GTT GTG TCT GCA GTA GGT3') amplificaram um produto de 217 pb.

As reações foram realizadas em termociclador (AMPLITHERM®) utilizando o seguinte protocolo: 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 20 segundos, 56°C por 10 segundos e 72°C por 50 segundos; 72°C durante 5 minutos. Os tamanhos dos fragmentos foram analisados após eletroforese em gel de agarose a 3% corado com SYBR Safe (Invitrogen®-Thermo Fisher Scientific, EUA) por meio de documentação fotográfica.

No presente estudo analisamos os três alelos mais importantes relacionados à DC: dois deles pertencem à molécula DQ2.5, representando a subunidade alfa (DQA1*05:01) e beta (DQB1*02), e um que é um marcador para o haplótipo (DRB1*04) que codifica o heterodímero DQ8. Este protocolo de PCR é capaz de identificar a presença ou ausência desses alelos, mas não o número de cópias em cromossomos homólogos. Para entender melhor a relação entre genótipos, grau de lesão intestinal e testes sorológicos, realizamos análise de dados combinando os três alelos e considerando todas as combinações desses alelos em pacientes com DC (n = 140). Também analisamos as distribuições e associações considerando apenas os alelos DQ2 (DQA1*05:01 e DQB1*02:01) ou apenas o alelo referente ao DQ8.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados clínicos foram comparados as análises de genotipagem dos alelos de risco para DQ2 e DQ8, indicando um resultado favorável entre ambos, comprovando a eficácia do método.

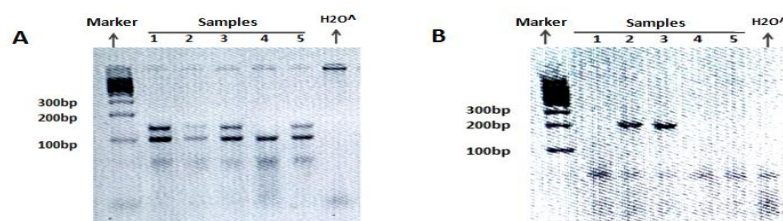


Figura 1: Análise da genotipagem dos alelos de risco para DQ2 e DQ8. Imagens de geis de agarose (3%) após eletroforese mostrando resultado das genotipagens por PCR. A) para os alelos DQA1*05 (codifica subunidade alfa da proteína DQ2) com tamanho de fragmento de 144pb e o alelo DQB1*02 (codifica subunidade beta da proteína DQ2) com tamanho de fragmento de 110pb; B) para o alelo DRB1*04 (identifica o haplótipo de risco para DQ8) com tamanho de fragmento de DNA amplificado de 217pb; Nas primeiras colunas de cada gel vemos o marcador molecular de 100pb (PROMEGA®, USA), Na última coluna de cada imagem o resultado da reação sem amostra (H₂O[^]).

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho conseguimos padronizar um método simples para a genotipagem dos principais alelos de risco para o desenvolvimento de doença celíaca. Com este resultados fomos capazes de genotipar um grande número de pessoas com diagnóstico confirmado de doença celíaca, e desta forma contribuindo para o desenvolvimento da ciência nesta área.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. **Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis.** Annual Review of Immunology. 2011;29(1):493–525.
2. Yuan J, Gao J, Li X, Liu F, Wijmenga C, Chen H, et al. **The tip of the “Celiac Iceberg” in China: A systematic review and meta-analysis.** PLoS ONE. 2013;8(12).
3. Admou B, Essaadouni L, Krati K, Zaher K, Sbihi M, Chabaa L, et al. **Atypical celiac disease: From recognizing to managing.** Gastroenterology Research and Practice. 2012;2012.
4. West J, Logan RFA, Hill PG, Khaw KT. **The Iceberg of Celiac Disease: What Is Below the Waterline? Clinical Gastroenterology and Hepatology.** 2007;5(1):59–62.
5. Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA. ACG clinical guidelines: **Diagnosis and management of celiac disease. American Journal of Gastroenterology.** 2013;108(5):656–76.
6. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. **European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease.** Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 2012;54(1):136–60.
7. Hanif FM, Kumar Mandhwani R, Hassan Luck N, Abbas Z, Mubarak M, Laeeq SM, et al. **Clinicopathological Study of Seronegative Celiac Disease in Adults**

in Pakistan: A Pilot Study. Middle East Journal of Digestive Diseases [Internet]. 2017;9(2):94–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.15171/mejdd.2017.57>

8. Rostom A, Murray JA, Kagnoff MF. **American Gastroenterological Association (AGA) Institute Technical Review on the Diagnosis and Management of Celiac Disease.** *Gastroenterology*. 2006;131(6):1981–2002.
9. Anderson RP, Henry MJ, Taylor R, Duncan EL, Danoy P, Costa MJ, et al. **A novel serogenetic approach determines the community prevalence of celiac disease and informs improved diagnostic pathways.** *BMC Medicine*. 2013;11(1).
10. Castro-Antunes MM, Crovella S, Brandão LAC, Guimarães RL, Motta MEFA, da Silva GAP. **Frequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 in celiac patients and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil.** *Clinics*. 2011;66(2):227–31.
11. Stanković B, Radlović N, Leković Z, Ristić D, Radlović V, Nikčević G, et al. **HLA genotyping in pediatric celiac disease patients.** *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 2015;14(3):171–6.
12. Cassol CA, de Pellegrin CP, Wahys MLC, Pires MMDS, Nassar SM. **Perfil clínico dos membros da associação dos celíacos do Brasil - Regional de Santa Catarina (ACELBRA-SC).** *Arquivos de Gastroenterologia*. 2007;44(3):257–65.
13. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.** *Nucleic Acids Research*. 1988;16(3):1215.
14. Aranalde LCR, Pederzoli BS, Marten T, Barros FC, Basso RP, Silveira JM, et al. **The ACTN3 R577X polymorphism affects the lipid profile and the prognosis of nutritional intervention in HIV-positive patients.** *Nutrition Research* [Internet]. 2016;36(6):564–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2016.02.002>
15. Sacchetti L, Tinto N, Calcagno G, Improta P, Salvatore F. **Multiplex PCR typing of the three most frequent HLA alleles in celiac disease.** *Clinica Chimica Acta*. 2001;310(2):205–7.
16. Marsh MN. **Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue').** *Gastroenterology*. 1992;102(1):330–33054.
17. Mills JR, Murray JA. **Contemporary celiac disease diagnosis: Is a biopsy avoidable?** *Current Opinion in Gastroenterology*. 2016;32(2):80–5.
18. Hadithi M, Blomberg BME von, Crusius JBA, Bloemena E, Kostense PJ. **Accuracy of Serologic Tests and HLA-DQ Typing for Diagnosing.** *Annals of Internal Medicine*. 2007;