

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**PESQUISA DE POLIMORFISMO HLA E NÃO HLA EM PESSOAS
COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 E COM DOENÇA CELÍACA**

TESE DE DOUTORADO

MARÍLIA DORNELLES BASTOS

PORTO ALEGRE, BRASIL

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

**PESQUISA DE POLIMORFISMO HLA E NÃO HLA EM PESSOAS
COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 E COM DOENÇA CELÍACA**

MARÍLIA DORNELLES BASTOS

A apresentação dessa tese é exigência do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor

Orientadora: Themis Reverbel da Silveira

Coorientadora: Lavínia Schüler-Faccini

PORTO ALEGRE, BRASIL

2016

CIP - Catalogação na Publicação

DORNELLES BASTOS, MARÍLIA

PESQUISA DE POLIMORFISMO HLA E NÃO HLA EM PESSOAS
COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 E COM DOENÇA CELÍACA /
MARÍLIA DORNELLES BASTOS. -- 2016.
204 f.

Orientadora: THEMIS REVERBEL DA SILVEIRA.
Coorientador: LAVÍNIA SCHÜLER-FACCINI.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Porto
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Doença Celiaca. 2. Diabetes Mellitus tipo 1. 3.
Polimorfismo genético. I. REVERBEL DA SILVEIRA,
THEMIS, orient. II. SCHÜLER-FACCINI, LAVÍNIA,
coorient. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

ESTA TESE FOI DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM: 27/04/2016
E, FOI AVALIADA PELA BANCA EXAMINADORA COMPOSTA POR:

Prof. Dr. Dennis Baroni Cruz

Universidade de Santa Cruz do Sul-UNISC

Dra. Cristina Toscani Leal Dornelles

Hospital de Clínicas de Porto Alegre- HCPA

Prof. Dr. Paulo Roberto Antonacci Carvalho

Programa de Pós graduação em Saúde da Criança e do Adolescente

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dedico esse trabalho ao carinho e compreensão que meu esposo Sílvio e meus filhos Beatriz e Daniel dispensaram a mim, tornando possível realizar mais esse sonho.

Dedico também à minha mãe Anna e a memória de meu pai Carlos que, de forma exemplar, ensinaram-me tudo o que é realmente importante na vida, além do gosto pela docência e pela pesquisa.

Agradecimento

- Agradeço à minha orientadora **Doutora Themis Reverbel da Silveira** que compartilha seu conhecimento com tanto carinho e entusiasmo que faz com que minha admiração pela ciência e pelo cuidado com a criança aumente a cada encontro com ela.
- À minha coorientadora **Doutora Lavínia Schuller Faccini** que me ensinou de forma leve e interessante uma parte do seu grande conhecimento de genética. Além disso, foi a responsável por eu conhecer pessoas muito competentes que foram decisivas para o sucesso desse trabalho: **Bibiane Godoy, Ana Carolina Moisés da Silva, Thayne Woycinck Kowalski e Luiza Monteavaro Mariath**
- Agradeço especialmente às amigas doutorandas **Thayne Kolwalski e Luiza Mariath** que me acompanharam em todas as etapas dessa pesquisa buscando comigo a solução para os problemas e comemorando os resultados.
- Um grande mérito da realização dessa tese foi ter a oportunidade de conhecer pessoas tão especiais como a amiga **Doutora Marcia Punhães**, que também esteve junto em todos os momentos do trabalho, preocupando-se com os resultados e, acima de tudo, com os pacientes que eram de sua responsabilidade.
- Ao **Doutor Balduino Tschiedel** a quem tenho uma profunda admiração pelo sua capacidade de gerir uma entidade com um fim social tão relevante como o Instituto da Criança com Diabetes(ICD), preocupando-se com a pesquisa sem perder o cuidado com o atendimento qualificado de forma integrada e multidisciplinar.
- Aos **médicos e funcionários do ICD** que, sem perder o foco de seu trabalho, auxiliaram de forma decisiva para que se pudesse ter acesso aos pacientes, aos resultados dos exames e a coleta de material biológico para a pesquisa. Foram tantas pessoas especiais que ajudaram, que temo citar os nomes e esquecer de alguém.
- A amiga e colega **Doutora Ana Luiza Guedes Pires** que, além da carinhosa colaboração em muitas etapas desse trabalho, teve uma participação decisiva no contato com os pacientes da Associação do Celíacos do Brasil (ACELBRA).

- Aos **pacientes e familiares** do ICD e da ACELBRA, pela boa vontade e interesse em participar do estudo.
- Às acadêmicas de nutrição **Lara Dias Coutinho e Rafaela Munstock** que auxiliaram na coleta de dados de forma responsável e eficiente.
- Ao Laboratório Endocrimeta no nome do seu responsável técnico, **Doutor Cláudio Prestes de Oliveira**, que demonstrou ser uma empresa que, além de prestar um serviço de qualidade, tem o interesse em fomentar a pesquisa científica.
- Aos colegas **professores e funcionários da Universidade de Santa Cruz do Sul** no nome da grande amiga e colega **Doutora Giana Diesel Sebastiany** que sempre me entusiasmaram na realização desse projeto e tornaram o possível com um apoio incondicional.
- A amiga **Doutora Rita Mattiolo** que me auxiliou de forma decisiva para a interpretação dos resultados dessa tese e me deu a oportunidade de conhecer seu caráter e seu profissionalismo.
- A minha amiga e secretária **Isabel Weschenfelder** que contribuiu de forma indireta mas imprescindível, fazendo que os meus pacientes não ficassem sem o atendimento no momento certo de uma forma que somente ela consegue fazer. Além disso, foi solidária em muitos momentos de preocupação e cansaço.
- A secretária **Rosane Blanger** e funcionárias do Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente pela eficiência e presteza na resposta a todas as dúvidas e solicitações.
- Ao **CNPQ, a UNISC e ao PPG-SCA**, pelo apoio financeiro, sem o qual não seria possível a realização deste trabalho.
- Às Doutoradas **Elsa Regina Justo Giugliani, Patrícia Miranda Lago, Cristina Targa Ferreira e Cristina Dornelles Leal**, pela gentileza de participarem da banca do meu exame de qualificação.
- Aos professores Doutores **Luciana Rodrigues Silva, Dennis Baroni Cruz, Paulo Carvalho e Cristina Toscani Leal Dornelles** por terem aceitado participar da banca examinadora deste trabalho.
- Finalizo agradecendo novamente ao **Silvio** e ao **Daniel** pelo constante estímulo e carinho e à **Beatriz** que, além disso, auxiliou na elaboração de figuras e tabelas que são apresentadas neste trabalho.

RESUMO

Introdução e Objetivos: A maior prevalência de doença celíaca (DC) em indivíduos com diabetes mellitus tipo I (DM1) já é reconhecida. Ambas as doenças tem causa autoimune, em que os genes HLA classe 2 representam o principal fator genético de risco. Porém, existe uma considerável parcela da população que não manifesta tais doenças e são portadores desses genes. Estudo de associação genômica (GWAS) identificaram polimorfismos de susceptibilidade às duas doenças em genes diferentes do sistema HLA, que poderão auxiliar na compreensão da causa e das suas variabilidades clínicas. Os objetivos desse estudo foram avaliar as frequências dos polimorfismos HLA e não HLA em pessoas com DM1 e com DC e relacionar esses dados com a ocorrência de sintomas gastrointestinais, com a idade do diagnóstico da DM1 e com história alimentar.

Métodos: Delineamento transversal, com avaliações retrospectivas e prospectivas, em pessoas com DM1 com e sem DC. Foram realizadas entrevista e revisão de prontuário dos pessoas, seguido de coleta de sangue ou saliva. A pesquisa dos genes *RGS1*, *IL2-IL21*, *BACH2*, *TLR7/TLR8* e *IL18RAP* foi realizada por *PCR Real-Time*. Os alelos DQA1* 0501 e DQB1* 0201 para DQ2.5 e o alelo DQB1*0302 para DQ8 foram identificados a partir da técnica de genotipagem de HLA *Tag-single-nucleotide polymorphism (Tag SNP)*.

Resultados: As frequências alélicas e genotípicas entre 273 pessoas com DM1 sem DC e 39 pessoas com DM1 e DC não apresentaram diferença significativa. A presença de sintoma gastrointestinal foi mais frequente nos portadores dos polimorfismos dos genes *RGS1* e *IL18RAP*. O tempo de aleitamento materno, a idade de introdução do glúten e a idade do diagnóstico da DM1 foram semelhantes entre os grupos. A comparação dos cinco polimorfismos com a combinação dos haplótipos para DQ2.5 e DQ8 não apresentou diferença significativa. Nos 312 indivíduos, com DM1 com e sem DC e nos 66 indivíduos portadores de DC sem DM1 foi identificado alelos DQ2.5 e ou DQ8 em 97% dos casos, enquanto que nos indivíduos com DC sem DM1 identificou-se em 76% dos casos. DQ2.5 foi mais frequente entre pessoas com DC e DQ8 foi mais frequentes entre pessoas com DM1.

Conclusões: A presença dos polimorfismos dos genes estudados não modificou a chance do indivíduo com DM1 ter ou não DC. Houve associação dos genes *RGS1* e *IL18RAP* com sintomas gastrointestinais. A pesquisa dos alelos DQ2.5 e DQ8, pela técnica *Tag-SNP*, permitiu determinar um alto valor preditivo negativo no diagnóstico de DC na população com DM1 e com DC, semelhante ao descrito na literatura com a técnica convencional.

Palavras-chave: Doença Celíaca; Diabetes Mellitus tipo 1; Antígenos HLA; Polimorfismo Genético.

ABSTRACT

Introduction and Objectives: The higher prevalence of celiac disease (CD) in individuals with diabetes mellitus type I (T1D) is already recognized. Both diseases have autoimmune cause, where HLA genes class 2 represent the major genetic risk factor. However, there is a considerable portion of the population that does not manifest such diseases and are carriers of these genes. Genome-wide association studies (GWAS) have identified susceptibility polymorphisms to both diseases in different genes of the HLA system that may assist in understanding the etiology and in its clinical variabilities. The objectives of this study were to evaluate the frequencies of HLA and non-HLA polymorphisms in patients with T1D and CD, related to the occurrence of gastrointestinal symptoms, the age of diagnosis of T1D and food history.

Methods: Mixed design with retrospective and prospective evaluations in patients with T1D with and without DC. They were conducted interview and review of medical records of patients, followed by collecting blood or saliva. The search for genes *RGS1*, *IL21-IL2*, *BACH2*, *TLR7 / TLR8* and *IL18RAP* was performed by Real-Time PCR. The alleles DQA1 * 0501 and DQB1 * 0201 for DQ2.5 and DQB1 * 0302 for DQ8 were identified from the Tag-single-nucleotide polymorphism (tag SNP) genotyping HLA technique

Results: The allelic and genotypic frequencies between 273 T1D patients without CD and 39 patients with T1D and CD showed no significant difference. The presence of gastrointestinal symptoms were more frequent in patients with polymorphisms of genes *RGS1* and *IL18RAP*. The duration of breastfeeding, the age of introduction of gluten and the age of diagnosis of T1D were similar between the groups. The comparison of the five polymorphisms with the combination of haplotypes for DQ2.5 and DQ8 showed no significant difference. In 312 individuals with DM1 with and without CD and 66 individuals with CD without T1D was identified alleles DQ2.5 and/or DQ8 in 97% of cases, whereas in individuals with CD without T1D was identified in 76% of cases . DQ2.5 was more frequent among patients with CD and DQ8 was more frequent among patients with T1D

Conclusions: The presence of polymorphisms of genes studied did not modify the chance of T1D whether or not DC. There was an association of *RGS1* and *IL18RAP* genes with gastrointestinal symptoms. The survey of DQ2.5 and DQ8 alleles by Tag-SNP technique allowed determining a high negative predictive value in the diagnosis of CD in the population of patients with T1D and DC, similar to that described in the literature with the conventional technique

Keywords: Celiac Disease; Diabetes Mellitus, Type 1; HLA Antigens; Polymorphism, Genetic

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Linha do tempo apresentando as principais contribuições na história da Diabetes Mellitus.....	21
Figura 2:	Linha do tempo da Doença Celíaca.....	25
Figura 3:	Patogênese da Doença Celíaca.....	26
Figura 4:	Iceberg Celíaco representando a classificação da Doença Celíaca com a nomenclatura adotada pela ESPGHAN.....	28
Figura 5:	Características histológicas da Doença Celíaca a partir da classificação de Marsh.....	32
Figura 6:	Diagnóstico da Doença Celíaca.....	35
Figura 7:	Prevalência global de Doença Celíaca, Diabetes tipo 1, Artrite Reumatóide, Colite Ulcerativa e Doença de Crohn.....	41
Figura 8:	Principais combinações de alelos associadas ao risco de DC.....	45
Figura 9:	Linha do tempo das descobertas desde o HLA em 1980 até 2014.....	47
Figura 10:	Patogênese da DC e o papel dos cinco genes não HLA pesquisados.....	53
Figura 11:	Logística da seleção das pessoas	64

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura

Tabela 1:	Critérios diagnósticos de Diabetes.....	22
Tabela 2:	Sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos para DC.....	30
Tabela 3:	Classificação de Marsh modificada por Oberhuber et al.....	31
Tabela 4:	Classificações histológicas da Doença Celíaca.....	34
Tabela 5:	Estudos de Prevalência de Doença Celíaca no Brasil.....	38
Tabela 6:	Estudos de prevalência de DC entre pessoas com DM1 no Brasil.....	42
Tabela 7:	Estudos que investigaram os polimorfismos em pessoas com Doença Celíaca e Diabetes Mellitus tipo 1.....	49

Artigo Original 1- Português

Tabela 1:	Comparação das características clínicas pessoas com DM1.....	101
Tabela 2:	Frequências alélicas e genótípicas dos polimorfismos.....	102
Tabela 3:	Polimorfismos não HLA entre as combinações dos haplótipos para DQ2.5 e DQ8.....	103
Tabela 4:	Presença de alelos de risco e sintomas gastrointestinais entre pessoas com DM1.....	104
Material suplementar 1:	Protocolo de pesquisa.....	105
Material suplementar 2	Presença de alelos de risco e sintomas gastrointestinais entre pessoas com DM1 e DC.....	106
Material suplementar 3	Polimorfismos não HLA e combinações de haplótipos para DQ2.5 e/ou DQ8.....	107

Artigo Original 2- Português

Tabela 1:	Distribuição dos haplótipos combinados de DQ2.5 e DQ8.....	123
Tabela 2:	Presença dos alelos de DQ2.5 e DQ8 entre as pessoas com DM1.....	123
Tabela 3:	Presença dos alelos de DQ2.5 e DQ8 entre as pessoas com DM1e DC e entre pessoas com DC sem DM1.....	124
Tabela 4:	Presença dos alelos de DQ2.5 e DQ8 entre as pessoas com DM1sem DC e entre as pessoas com DC independente de ter DM1.....	124

Artigo Original 1- Inglês

Table 1:	Comparison of the clinical characteristics of the patients.....	161
Table 2:	Allelic and genotypic frequencies of the polymorphisms.....	162
Table 3:	Non-HLA polymorphisms among the combinations of haplotypes for DQ2.5 and DQ8.....	163
Table 4:	Presence of risk alleles and gastrointestinal symptoms in patients with T1D.....	164
Material suplementar 1:	Research Protocol.....	165
Material suplementar 2	Presence of risk alleles and gastrointestinal symptoms in patients with CD.....	166
Material suplementar 3	Non-HLA polymorphisms and combinations of haplotypes for DQ2.5 and/or DQ8.....	167

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1C	Hemoglobina Glicada ou Glicosilada
ACELBRA-RS	Associação dos Celíacos do Brasil-Rio Grande do Sul
AGA	Anticorpo Antigliadina
AGA- Deam	Antigliadina Deamidada
Anti GAD	Antidescarboxilase do Ácido Glutâmico
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> Célula Apresentadores de Antígenos
BACH 2	<i>BTB domain and CNC homolog 2</i>
DC	Doença Celíaca
DM1	Diabetes Mellitus Tipo 1
EMA	Antiendomísio
ESPGHAN	<i>European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition</i> Sociedade Europeia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição
GWAS	<i>Genome-wide association study</i> Estudo de associação genômica
HbA1c	Hemoglobina Glicada ou Glicosilada
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i> Antígeno leucocitário humano
IAA	Anti-Insulina
ICA	Autoanticorpos anti-ilhotas
ICD	Instituto da Criança com Diabetes
IgA	Imunoglobulina A
IL18 RAP	<i>Interleukin 18 receptor accessory protein</i>
IL2/IL21	Interleucina 2 e 21

LIE	Linfócitos intraepiteliais
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> Complexo Principal de Histocompatibilidade
NK	<i>Natural Killer</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> Reação em cadeia da polimerase
RGS1	<i>Regulator of G protein signaling 1</i>
SBT	<i>Sequence based typing</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> Polimorfismo de Nucleotídeo Simples
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SSO	<i>Sequence Specific Oligonucleotide probes</i>
SSP	<i>Sequence Specific Primers</i>
T CD4⁺	Células T Auxiliares
T1D	<i>Type 1 Diabetes Mellitus</i>
Tag-SNP	<i>Tag single nucleotide polymorphisms</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDT	Testes de Desequilíbrio de Transmissão
TG2	Enzima Transglutaminase
TLR	<i>Toll-like Receptors</i>
TTG	Transglutaminase Tecidual
TTG-IgA	Transglutaminase Tecidual IgA

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO:	17
2. REVISÃO DA LITERATURA:	20
2.1-DIABETES MELLITUS TIPO 1.....	20
2.1.1-Características Gerais.....	20
2.1.2-Diagnóstico.....	21
2.1.3- Aspectos Epidemiológicos.....	23
2.2- DOENÇA CELÍACA.....	23
2.2.1-Características Gerais.....	23
2.2.2-Patogênese e Classificação.....	26
2.2.3-Diagnóstico.....	28
2.2.4- Aspectos Epidemiológicos.....	36
2.2.5-Tratamento.....	39
2.3-DOENÇA CELÍACA E DIABETES	40
2.3.1-Aspectos Epidemiológicos.....	40
2.3.2-Dilema da triagem.....	42
2.3.3-Fatores genéticos de risco.....	44
3. JUSTIFICATIVA.....	55
4. HIPÓTESES.....	57

5. OBJETIVOS.....	59
5.1-OBJETIVO PRINCIPAL.....	59
5.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	59
6. MÉTODOS.....	61
6.1-DELINEAMENTO.....	61
6.2-LOCAIS DAPESQUISA.....	61
6.3-POPULAÇÃO.....	61
6.4-CRITÉRIOS DE INCLUSÃO.....	61
6.5-CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	62
6.6- LOGÍSTICA.....	63
6.7- VARIÁVEIS ESTUDADAS.....	65
6.8- MÉTODOS LABORATORIAIS.....	65
6.8.1-Extração do DNA.....	65
6.8.2-Genotipagem dos Polimorfismos.....	65
6.8.3-Determinação haplotípica de HLA DQ2.5 e DQ8.....	66
6.8.4-Transglutaminase IgA e IgA Total	67
6.9-CONSIDERAÇÕES ESTATÍSTICAS.....	67
7. ASPECTOS ÉTICOS.....	70
8. REFERÊNCIAS.....	73
9. ARTIGOS ORIGINAIS.....	82
9.1- ARTIGO ORIGINAL 1- PORTUGUÊS.....	83
9.2- ARTIGO ORIGINAL 2- PORTUGUÊS.....	108
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	126
11. CONCLUSÕES.....	130
12. APÊNDICES.....	131
APÊNDICE A- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento(Pessoas com DM1).....	132
APÊNDICE B- Protocolo de Pesquisa- Pessoas com DM1.....	134

APÊNCICE C- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Pessoas com Doença Celíaca).....	136
APÊNCICE D- Protocolo de Pesquisa -pessoas com Doença Celíaca.....	138
13. ANEXOS.....	139
ANEXO A- Artigo Original 1 em inglês.....	140
ANEXO B- Artigo Original 2 em inglês.....	168
ANEXO C-Produção científica durante o doutorado: Artigo de Revisão.....	186
ANEXO D- Produção científica durante o doutorado: Apresentação de resultados em congressos e simpósios.....	194
ANEXO E- Produção científica durante o doutorado: Capítulo do Livro.....	203

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1) caracteriza-se por hiperglicemia crônica, resultante de insulinopenia progressiva, causada pela destruição das células beta pancreáticas por auto-anticorpos e acomete indivíduos geneticamente predispostos (WHITACKER *et al.*, 2008). A Doença Celíaca (DC) é uma enteropatia crônica e permanente, provocada por uma intolerância às proteínas do glúten do trigo, centeio, cevada em sujeitos geneticamente predispostos (DINIZ-SANTOS, D; MACHADO; SILVA, 2012).

A maior ocorrência de DC, em indivíduos com DM1, é amplamente conhecida com prevalências entre 3 e 8%. Por outro lado, 3 a 12% das pessoas com DC apresentam DM1 (KAHALY; SCHUPPAN, 2015). Ambas as doenças tem etiologia auto-imune, em que a presença de moléculas HLA (*Human Leukocyte Antigen*) classe 2 representa o principal fator genético de risco (TSOUKA; MAHMUD; MARCON, 2015) (TRONCONE; DISCEPOLO, 2014). Entre os alelos de risco identificados, destacam-se os HLA-DQA1*05 e DQB1*02 no cromossomos 6p21, que podem estimar um alto valor preditivo negativo, mas um baixo valor preditivo positivo, já que 35 a 40% da população, em geral, apresenta um ou ambos alelos (ROMANOS *et al.*, 2014) (WIJMENGA; GUTIERREZ-ACHURY, 2014).

O sistema HLA é bastante polimórfico e apresenta uma variabilidade entre diferentes áreas geográficas e etnias. O Brasil é um país com grande miscigenação de raças e com grande variação entre as regiões. Estudo recente identificou uma ancestralidade africana em 50% da população do nordeste e 70% de ancestralidade europeia no sul e sudeste do país (KEHDY *et al.*, 2015).

Os estudos de associação genômica, *Genome-wide association study* (GWAS), identificaram polimorfismos de susceptibilidade às duas doenças, em genes diferentes do sistema HLA que poderão auxiliar na compreensão da etiologia, no reconhecimento de

variações clínicas e na busca de alternativas terapêuticas. A grande maioria desses loci não HLA contém genes envolvidos em rotas de sinalização de células imune, maturação e diferenciação de células T e quimiocinas. (GUTIERREZ-ACHURY; COUTINHO DE ALMEIDA; WIJMENGA, 2011) (PLUGIS; KHOSLA, 2015).

Não existem estudos relativos à pesquisa dos genes HLA e/ou não HLA entre pessoas com DC e DM1, na região sul do país. Logo, a pesquisa de marcadores genéticos de risco para DM1 e DC em indivíduos do nosso meio poderá auxiliar no maior entendimento dessas doenças e no conhecimento de algumas características genéticas em uma parte do Brasil que tem características étnicas diferentes das outras regiões.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diabetes Mellitus Tipo 1

2.1.1 Características gerais

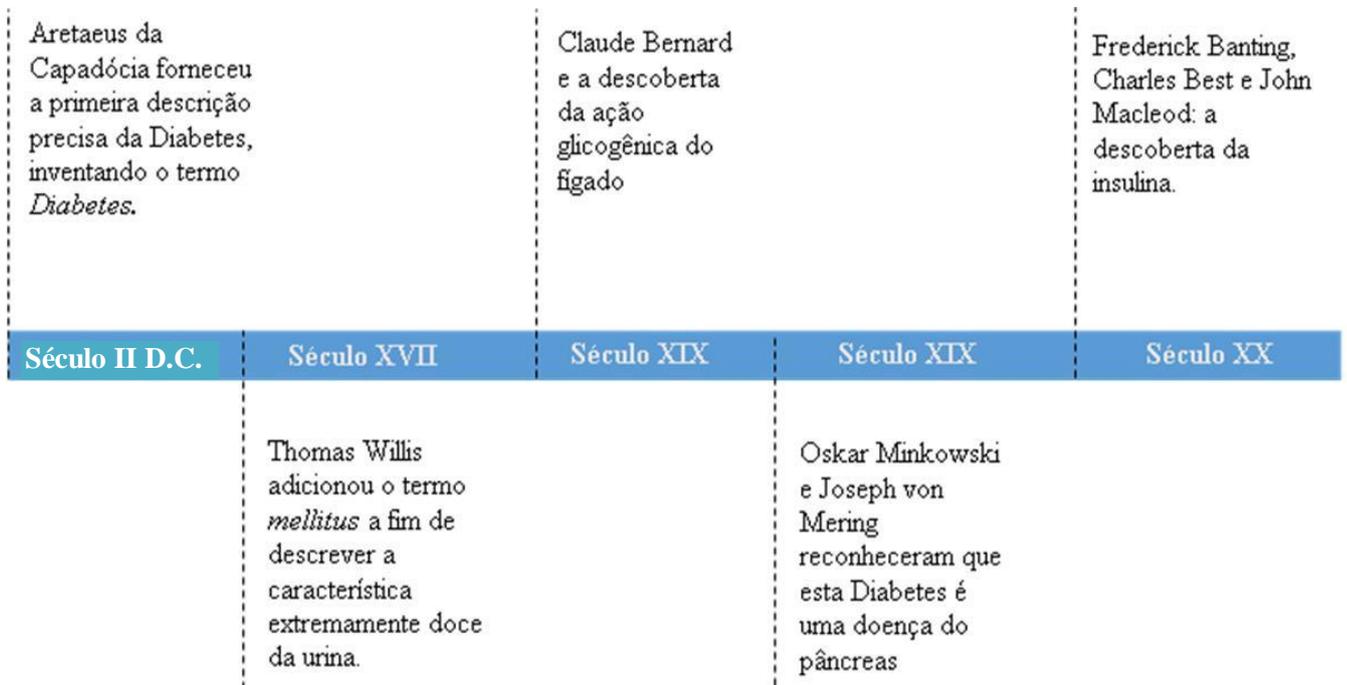
A principal característica da Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) é a hiperglicemia crônica, que é associada a lesões e disfunções de diferentes órgãos e tecidos, especialmente olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Os principais sintomas são: poliúria, polidipsia e perda de peso. Uma das características marcantes dos pacientes com DM1 é a cetoacidose que requer, obrigatoriamente, insulina como tratamento (MONTENEGRO JÚNIOR *et al.*, 2013).

Essa forma de diabetes foi anteriormente chamada de diabetes insulino-dependente ou diabetes juvenil. Apresentam, na maioria das vezes, autoanticorpos, que foram identificados como marcadores da destruição autoimune da célula β . Os principais são os autoanticorpos anti-ilhotas (ICA) e anti-insulina (IAA), antidescarboxilase do ácido glutâmico (anti-GAD) e para as tirosinofosfatases IA-2 e IA-2b. Eles, geralmente, precedem a hiperglicemia por meses ou anos e um ou mais deles estão presentes em 85% a 90% dos pacientes na ocasião do diagnóstico (MONTENEGRO JÚNIOR *et al.*, 2013).

A DM1 idiopática corresponde à minoria dos casos e caracteriza-se pela ausência de marcadores de autoimunidade contra as células β e não associação a haplótipos do sistema HLA. Os indivíduos com essa forma de diabetes também podem desenvolver cetoacidose e apresentam graus variáveis de deficiência de insulina. Como a avaliação dos auto-anticorpos não se encontra disponível em todos os centros, a classificação etiológica do DM1 nas subcategorias autoimune e idiopática pode não ser sempre possível (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2014).

A Diabetes é conhecida desde a antiguidade e, a despeito de muitos avanços terapêuticos, ainda permanece uma doença crônica incurável. A linha do tempo descrita na figura 1 traz as principais contribuições na história da Diabetes Mellitus, como ficou conhecida a partir do século 17, quando foi observado que os pacientes apresentavam a urina doce (KARAMANOU, 2016).

Figura 1- Linha do tempo apresentando as principais contribuições na história do Diabetes Mellitus



Adaptado de: KARAMANOU, Marianna., 2016.

2.1.2 Diagnóstico

Os sintomas clássicos já descritos da Diabetes são bem característicos e auxiliam na suspeita clínica. A glicemia de jejum é o meio mais prático de se estabelecer o diagnóstico de DM1. A hemoglobina glicada ou glicosilada (HbA1c ou A1C) é o produto da reação não enzimática entre a glicose sanguínea e a hemoglobina e refletem a média das glicemias

durante os últimos 2 a 3 meses, que é o tempo de sobrevivência das hemácias. É considerado o padrão ouro na avaliação do controle glicêmico, devendo ser realizada a cada 3 a 4 meses. A Academia Americana de Diabetes recomenda como meta para todas as crianças, níveis de HbA1c <7,5% (MONTENEGRO JÚNIOR *et al.*, 2013) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015a).

A Tabela 1 demonstra os critérios diagnósticos que foram revalidados pela Academia Americana de Diabetes e são indicados tanto para o diagnóstico como para a triagem da doença (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2015b).

Tabela 1: Critérios diagnósticos de Diabetes:

1. Hemoglobina Glicosilada maior ou igual a 6,5%
ou
2. Glicemia após 8 horas de jejum maior ou igual a 126mg/dl (7,0 mmol/L)
ou
3. Glicemia após 2 horas da ingestão de 75 gramas de glicose maior ou igual a 200mg/dl (11,1 mmol/L)
ou
4. Sintomas clássicos de hiperglicemia ou crise hiperglicêmica com glicose plasmática maior ou igual a 200mg/dl (11,1 mmol/L)

Obs: Na ausência de hiperglicemia inequívoca, os critérios 1 a 3 devem ser confirmados por repetição

Fonte: AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Children and Adolescents 2015.

2.1.3 Aspectos Epidemiológicos:

A incidência de DM1 tem acentuada variação geográfica, que pode ser atribuída a diferenças genéticas assim como questões de exposição ambiental. Estudo da Federação Internacional de Diabetes relata um aumento de incidência anual de 3%, onde o Brasil ocupa o 3º lugar em prevalência no mundo, após os Estados Unidos e Índia (IDF Diabetes ATLAS 2015).

2.2 Doença Celíaca

2.2.1 Características gerais

A Doença Celíaca (DC) é uma enteropatia crônica e permanente provocada por uma intolerância às proteínas do glúten do trigo, centeio, cevada em sujeitos geneticamente predispostos. A ingestão desses cereais por pacientes celíacos pode ocasionar inflamação intestinal, atrofia nas vilosidades, hiperplasia de criptas e sintomas típicos de má absorção como diarreia e baixo ganho de peso e estatura. Podem ocorrer sintomas atípicos e condições que afetam diversos órgãos, com manifestações inespecíficas como: anemia, alterações psiquiátricas, osteoporose, entre outros. Devido aos sintomas atípicos e as formas silenciosas, a doença frequentemente não é diagnosticada corretamente e pode acarretar graves complicações (DINIZ-SANTOS, D; MACHADO; SILVA, 2012) (SCHUPPAN; JUNKER; BARISANI, 2009).

A história da DC começou com a introdução sistemática do Glúten na dieta humana no período Neolítico, mas a primeira descrição da doença ocorreu no Século I d.C. por Areteu da Capadócia, médico grego que designou tais pacientes com *Koiliakos* (celíacos), a partir da palavra grega *Koelia*, que significa abdome. A linha do tempo, descrita na figura 2, traz uma visão dos principais momentos da história da DC até o presente século, quando as grandes evoluções ocorrem de forma mais rápida especialmente nos aspectos diagnósticos e de

compreensão da fisiopatologia que serão descritos oportunamente (DINIZ-SANTOS, D; MACHADO; SILVA, 2012) (KOEHLER; WIESER; KONITZER, 2014) (TOMMASINI, 2011) (KELLY *et al.*, 2015).

Figura 2 - Linha do tempo da Doença Celíaca

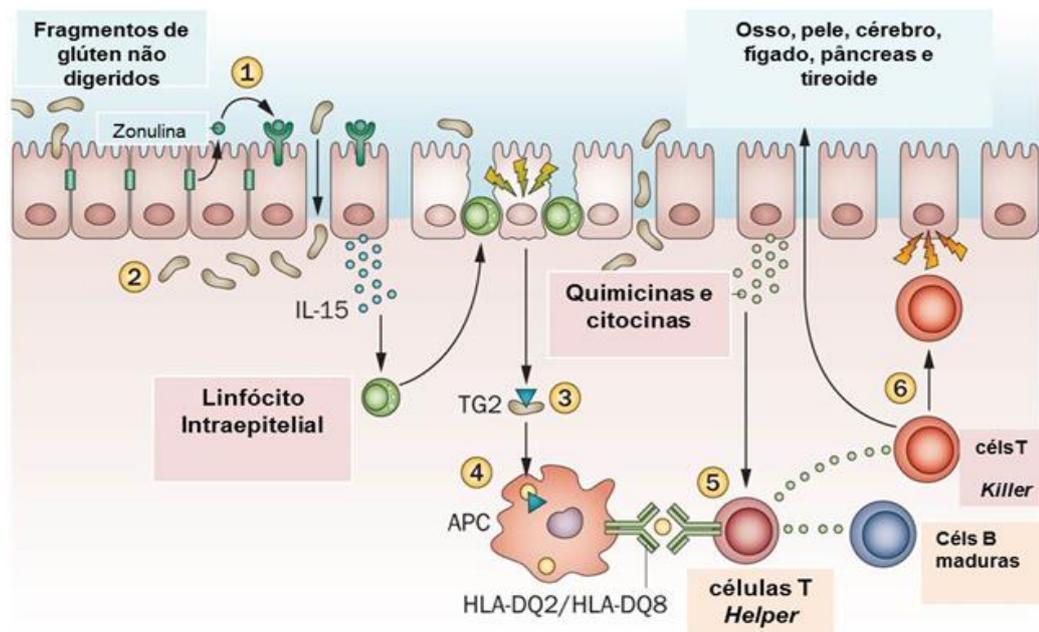
Substituição do Nomadismo pelo cultivo da terra.		Samuel Gee descreve os sintomas relacionado a dieta, mas não se sabia qual alimento seria deletério.		Realização do diagnóstico por biópsia: Uso de cápsulas pericrais para a realização dos exames; Identificação do glúten presente no trigo, cevada e centeio como causadores das lesões intestinais.		Identificação do anticorpo Antiendomísio; Referência ao modelo "Iceberg Celíaco"; Necessidade de biópsias em 3 ocasiões para a confirmação do diagnóstico.		Nova definição de Intolerância ao glúten com anticorpos negativos; Recomendação da ESPGHAN para diagnóstico sem biópsia com questionamentos de outras entidades; Pesquisas crescentes de biologia molecular na busca de maior entendimento da fisiopatogenia e alternativas de tratamento.
Período Neolítico (1000 a.C)	Século I d.C	1888	1950	1952 - 1965	1965 - 1973	1973 - 1997	1997 - 2011	2011 - atualidade
	Primeira descrição da doença celíaca descrita por Aretus da Capadócia: "Koiiakos"		Willian K. Dick observa declínio da doença com a escassez de trigo que ocorreu na 2ª Guerra.		Identificação de marcador sorológico-Antigliadina; Reconhecimento de formas atípicas e assintomáticas da doença; Associação com variações de HLA.		Identificação do anticorpo Transglutaminase Tecidual e Antigliadina Deamidada; Necessidade de biópsia em uma ocasião para a confirmação do diagnóstico; Estudos de associação genômica identificam genes não HLA que contribuem no entendimento da patogênese da DC.	

Fontes: DINIZ-SANTOS, D; MACHADO, APL; SILVA, LR 2012 ; WIESER, Herbert; KOEHLER, Peter; KONITZER, Katharina. 2014; TOMMASINI, Alberto; NOT, Tarcisio; VENTURA, Alessandro. 2011.

2.2.2 Patogênese e Classificação:

A base imunológica da Doença Celíaca resulta de um desequilíbrio do sistema imune inato e adaptativo. Nessas condições, a gliadina (principal componente tóxico do glúten) atravessa o epitélio intestinal, ativando o sistema imune adaptativo e determinando aumento da permeabilidade intestinal e desencadeando a reação inflamatória local e a distância (RUBIO-TAPIA; MURRAY, 2010). A figura 3 demonstra os principais aspectos da fisiopatologia da DC, levando a manifestações clínicas gastrointestinais e extra intestinais.

Figura 3: Patogênese da Doença Celíaca



1-Componete tóxico do glúten atravessando o epitélio intestinal;

2-Ativação de citocinas inflamatórias (imunidade inata)

3-Enzima Transglutaminase(TG2) promove a deamidação dos peptídeos contidos no glúten que atravessaram a lâmina própria e que serão melhor reconhecidos pelas moléculas HLA classe II.

4- As célula apresentadores de antígenos(APC) iniciam a ativação das células inflamatórias.

5- As células T *Helper* são as células efetoras da inflamação intestinal.

6- As células T *Killer* ativadas migram para o epitélio intestinal causando inflamação local e a distância, sendo responsável pelos sintomas gastrointestinais e extra-intestinais.

Adaptado de: (LEFFLER, DANIEL A.; GREEN; FASANO, 2015)

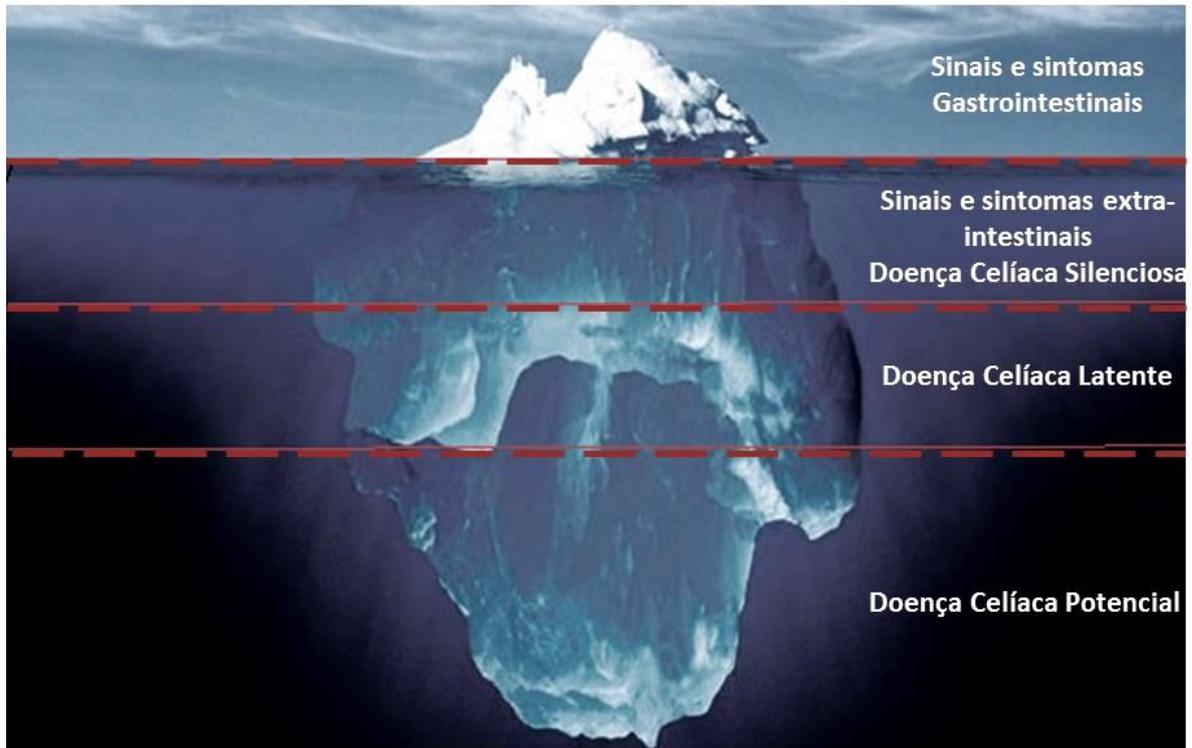
Diversas classificações têm sido usadas, principalmente com a distinção entre Doença Celíaca clássica, atípica, assintomática, latente e potencial. Porém, atualmente, os sintomas atípicos tem sido considerados mais frequentes que os sintomas clássicos e, por tal motivo, a Sociedade Europeia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN) recomenda a utilização da seguinte nomenclatura (HUSBY *et al.*, 2012):

- **Sinais e sintomas gastrointestinais:** diarreia crônica, constipação, distensão abdominal, vômitos, anorexia, dor abdominal e irregularidade de hábito intestinal.
- **Sinais e sintomas extra-intestinais:** anemia, neuropatia, diminuição da densidade óssea, perda de peso, baixa estatura, irritabilidade, aumento de enzimas hepáticas e fadiga crônica.
- **Doença Celíaca Silenciosa:** presença de anticorpos específicos, HLA e biópsia intestinal compatível com Doença Celíaca, porém sem sinais e sintomas suficientes para provocar uma suspeita clínica.
- **Doença Celíaca Latente:** presença de HLA compatível, sem enteropatia, mas que apresentará enteropatia em outro momento de sua vida. Poderá ou não ter sintomas e/ou anticorpos específicos positivos.
- **Doença Celíaca Potencial:** presença de anticorpos específicos e HLA compatível, mas sem anormalidades histológicas na biópsia duodenal. O paciente pode ou não apresentar sinais e sintomas assim como desenvolver enteropatia posteriormente.

A utilização da imagem de um iceberg (Figura 4) surgiu para demonstrar a existência de um grande número de pessoas com DC, mas uma pequena parte dessas pessoas com sintomas detectáveis clinicamente. A partir dessa constatação que se definiu a necessidade da busca

ativa desses indivíduos, em especial, nos grupos considerados de risco para a doença (DINIZ-SANTOS, D; MACHADO; SILVA, 2012).

Figura 4- Iceberg Celíaco representando a classificação da Doença Celíaca com a nomenclatura adotada pela ESPGHAN



Fontes: DINIZ-SANTOS, D; MACHADO, APL; SILVA, LR. 2012; HUSBY, S. *et al.* 2012.

2.2.3 Diagnóstico

Os testes sorológicos são fundamentais para a investigação inicial da DC e estão indicados nos casos de suspeita clínica, para as pessoas com familiares de primeiro grau com diagnóstico de DC e naqueles com outras doenças autoimunes (FASANO, ALESSIO; CATASSI, 2012). O anticorpo Antigliadina (AGA) foi recomendado por décadas para avaliação inicial de pessoas com DC, mas, atualmente, não é mais empregado porque existem anticorpos mais sensíveis e específicos para esse fim. Tais anticorpos mais específicos são: Transglutaminase tecidual (TTG) IgA e IgG, Antiendomísio (EMA) IgA e IgG e Antigliadina

Deamidada (AGA-Deam) IgA e IgG. Como a deficiência seletiva de IgA ocorre com maior frequência em pacientes com DM1 (GRECO; MAGGIO, 2015) e em pacientes com DC (CATALDO *et al.*, 1998) do que na população geral, a dosagem de IgA total é sempre indicada para se excluir a possibilidade de resultados falso-negativos. A TTG-IgA tem alta sensibilidade e especificidade, é de menor custo e é realizada de forma automatizada. O EMA, apesar de sua alta especificidade, apresenta dificuldades na sua realização devido ao alto custo e pelo fato de necessitar de uma pessoa experiente para sua realização (HUSBY *et al.*, 2012). A AGA-Deam é um teste descrito mais recentemente e possui boa especificidade para os anticorpos IgG, sendo recomendado pela Sociedade Americana de Gastroenterologia e pela ESPGHAN para crianças menores de 2 anos de idade e nos casos de deficiência de IgA (RUBIO-TAPIA *et al.*, 2013) (HUSBY *et al.*, 2012). Os resultados são considerados positivos conforme as informações obtidas pelos valores de referência dos *Kits* utilizados pelos laboratórios. A Tabela 2 apresenta a sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos para DC.

Tabela 2: Sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos para DC

Anticorpo	Sensibilidade (variação)	Especificidade (variação)
AGA-IgA	85% (57-100)	90% (47-94)
AGA- IgG	85% (42-100)	80% (50-94)
EMA	95% (86-100)	99% (97-100)
TTG-IgA	98% (78-100)	98% (90-100)
TTG- IgG	70% (45-95)	95% (94-100)
AGA-Deam-IgA	88% (74-100)	95% (90-99)
AGA-Deam-IgG	80% (63-100)	98% (90-99)

AGA: Anticorpo Antigliadina; AGA-Deam: Antigliadina Deamidada; EMA: Antiendomísio; TTG: Transglutaminase;; IgA: Imunoglobulina A; IgG: Imunoglobulina G; HLA: Human leukocyte antigen/Antígeno leucocitário humano.

Adaptado de: WIESER, Herbert; KOEHLER, Peter; KONITZER, Katharina. 2014.

Nas pessoas com sorologia positiva, está indicada a endoscopia digestiva alta com biópsias. Devem ser realizadas por Endoscopia Digestiva Alta e coletadas na 2º e 3º porções do duodeno (pelo menos 4 amostras) e, pelo menos, uma amostra do bulbo duodenal, visto que as alterações podem estar restritas ao bulbo em até 20% dos casos (HUSBY *et al.*, 2012).

A classificação mais utilizada para avaliação histológica da mucosa duodenal foi descrita por Michael Marsh (MARSH, 1992) e modificada por Oberhuber e colaboradores (OBERHUBER; GRANDITSCH; VOGELSANG, 1999), que é apresentada na Tabela 3. A

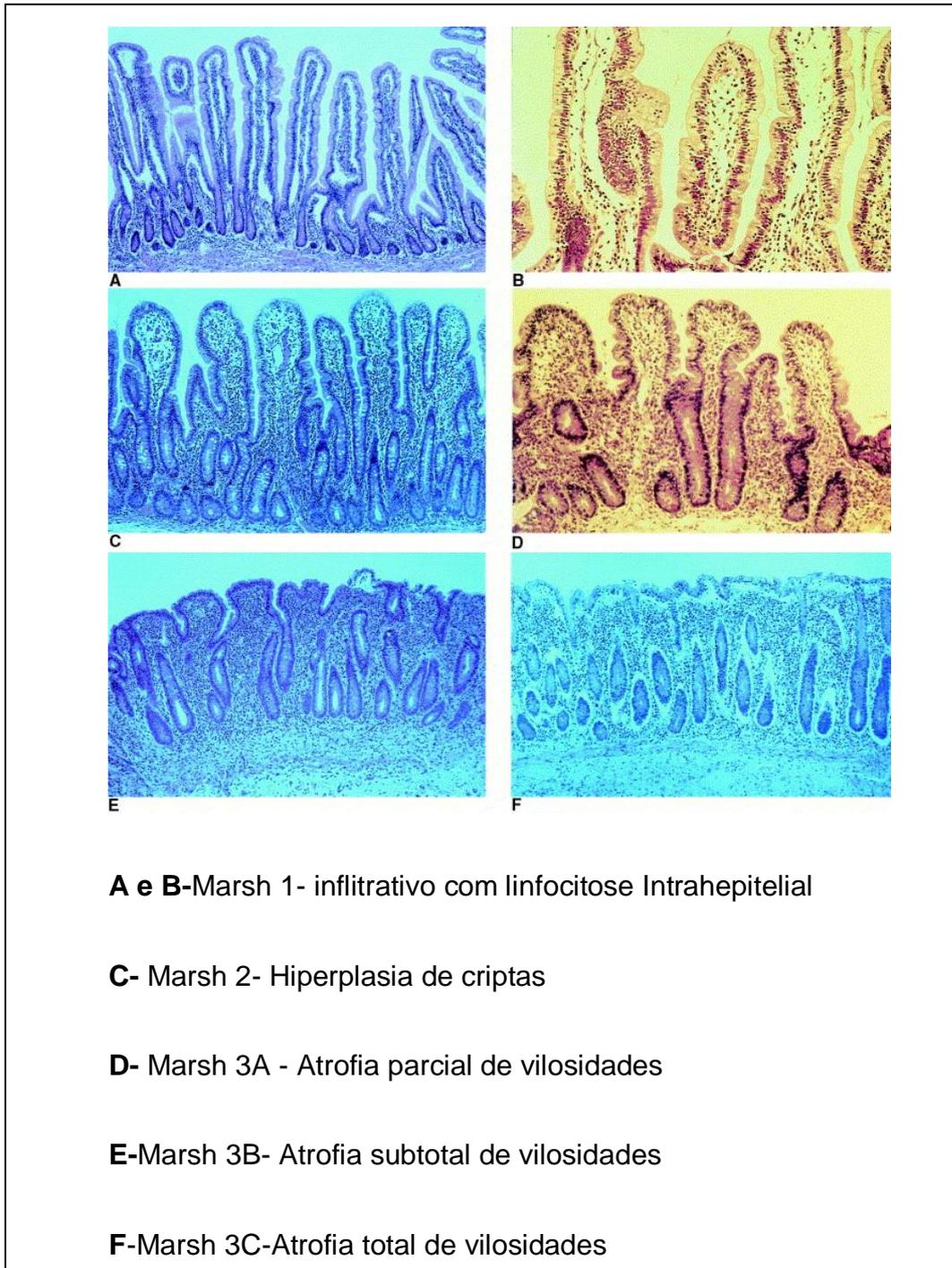
partir das lesões de classe 2 são consideradas diagnósticas de DC e as lesões de classe 4 estão presentes nos raros casos de DC refratária ao tratamento (ALLUÉ, ISABEL POLANCO; MANRIQUE, 2014). Nos resultados 0 ou 1, com sorologia positiva, deve-se considerar a possibilidade de falso positivo da sorologia, falso negativo da biópsia ou DC latente. A figura 5 apresenta as características histológicas descritas na classificação de Marsh modificada por Oberhuber et al. (1999).

Tabela 3- Classificação de Marsh modificada por Oberhuber et al.

Grau	Padrão	Características Histológicas
Marsh 0	Pré infiltrativo	Mucosa Normal
Marsh 1	Infiltrativo	Linfocitose Intraepitelial
Marsh 2	Hiperplásico	Marsh 1 + hiperplasia de criptas
Marsh 3	Destrutivo	Marsh 2 + atrofia de vilosidades
• Marsh 3A		Atrofia parcial
• Marsh 3B		Atrofia subtotal
• Marsh 3C		Atrofia total
Marsh 4	Atrófico	Mucosa plana

Modificado de DINIZ-SANTOS, D; MACHADO, APL; SILVA, LR. 2012; WIESER, Herbert; KOEHLER, Peter; KONITZER, Katharina. 2014

Figura 5: Características histológicas da Doença Celíaca a partir da classificação de Marsh



Uma classificação histológica alternativa tem sido proposta por Corazza e Villanacci (2005), dividindo as lesões da mucosa em categorias A e B com seus subgrupos:

- Grau A: Não atrófica - com vilosidades e criptas com arquitetura normal e aumento de LIE (mais de 25 por campo).
- Grau B1: Atrófica - com proporção vilosidades: cripta maior que 3:1, porém com vilosidades presentes e aumento de LIE (mais de 25 por campo).
- Grau B2: Atrófica e plana - vilosidades não detectadas e aumento de LIE (mais de 25 por campo).

Mais recentemente Ensari (2010) propôs uma versão mais simples e prática da classificação de Marsh, com objetivo de facilitar a correlação clinico-patológica, em tipos 1, 2 e 3. A classificação 4 de Marsh e Oberhuber é considerada obsoleta nas classificações descritas mais recentemente porque tais lesões estão relacionadas a expansão aberrante de células T demonstradas por imunohistoquímica e, por isso já caracterizam DC refratária, jejunita ulcerativa e linfoma de células T. A Tabela 4 apresenta uma comparação das classificações existentes.

Estudo canadense relativo ao diagnóstico histológico da DC concluiu que a classificação de Coraza e Villanacci tem maior reprodutibilidade inter-observador quando comparada com a tradicional classificação de Marsh modificada por Oberhuber. Os autores reforçaram também a importância de realizar biópsias no bulbo duodenal, uma vez que observaram alterações somente nessa região em 21% dos exames avaliados (BILKHOO *et al.*, 2015).

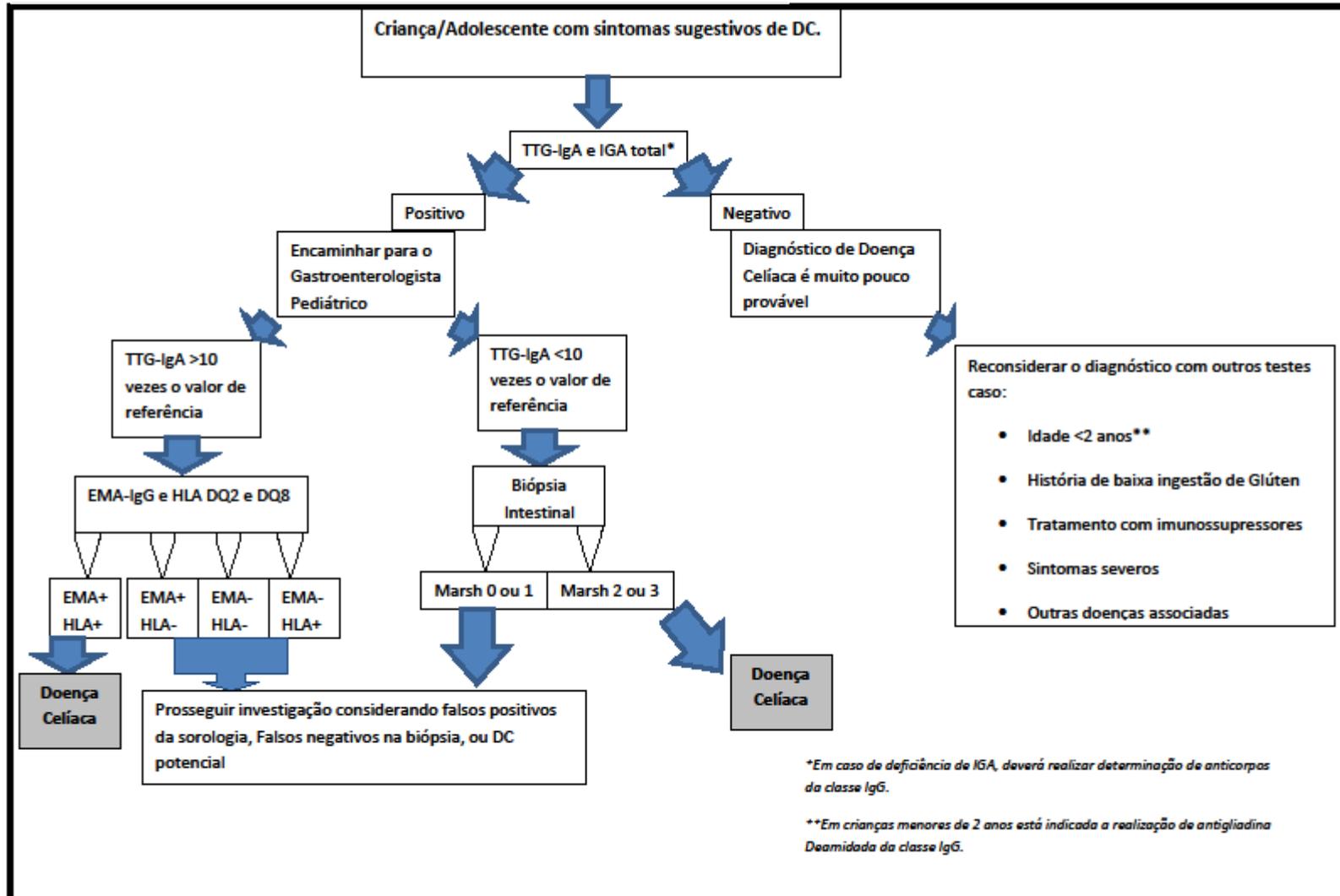
Tabela 4: Classificações histológicas da Doença Celíaca

Marsh	Oberhuber	Coraza e Villanacci	Ensari
Tipo 1	Tipo 1	Grau A	Tipo 1
Tipo 2	Tipo 2	Grau A	Tipo 1
Tipo 3	Tipo 3A	Grau B1	Tipo 2
	Tipo 3B	Grau B2	Tipo 2
	Tipo 3C	Grau B3	Tipo 3
Tipo 4	Tipo 4	Obsoleta	Obsoleta

Modificado de: ENSARI, Arzu, 2010.

As recomendações da ESPHGAN (HUSBY *et al.*, 2012) para pessoas com sintomas sugestivos de DC estão resumidas na Figura 6. Nesse consenso europeu é considerada a possibilidade de diagnóstico prescindindo da biópsia em casos selecionados de pessoas sintomáticas. Já o último consenso da Academia Americana de Gastroenterologia, considera a biópsia duodenal mandatória para confirmação diagnóstica de DC (RUBIO-TAPIA *et al.*, 2013). Lundin e Sollid (2014) descrevem os recentes avanços no diagnóstico DC e consideram que, apesar de vários estudos indicarem que a sorologia pode ser suficiente para o diagnóstico, existe algum ceticismo em adotar protocolos sem biópsia. Os autores admitem a possibilidade do diagnóstico sem biópsia desde que tenham sinais ou sintomas clínicos da doença, sorologia fortemente positiva em testes repetidos e a presença de HLA-DQ2 e ou HLA- DQ8.

Figura 6- Diagnóstico da Doença Celíaca.



AGA-Deam: Antigliadina Deamidada; DC: Doença Celíaca; EMA: Antiendomísio; HLA Human Leucocyte antigen/Antígeno Leucocitário Humano; IgA: Imunoglobulina A;

IgG: Imunoglobulina G; TTG: Transglutaminase Tecidual

Adaptado de: HUSBY, S. et al. 2012

Pessoas com risco genético para DC podem apresentar anticorpos com níveis flutuantes, particularmente a TTG e AGA- Deam. Nessas pessoas, que não tem sinais ou sintomas de DC, a confirmação do diagnóstico somente será feita com biópsia. (HUSBY *et al.*, 2012) (CILLERUELO *et al.*, 2015).

O enfrentamento com glúten está indicado somente em situações com resposta duvidosa como: lesão histológica de baixo grau (Marsh 1); indivíduos HLA DQ2 e DQ8 negativo; pessoas com marcadores sorológicos negativos no momento da suspeita diagnóstica e pessoas que iniciaram dieta sem investigação prévia (HUSBY *et al.*, 2012) (RUBIO-TAPIA *et al.*, 2013). A partir da prova de provocação, a elevação dos anticorpos, associada a recaída clínica e/ou histológica, permite confirmar o diagnóstico de DC, sendo a quantidade mínima de glúten necessária de 15 gramas por dia, (ALLUÉ, ISABEL POLANCO; MANRIQUE, 2014).

2.2.4 Aspectos Epidemiológicos:

Na Europa e nos Estados Unidos, a prevalência da DC varia entre 1 e 3 % entre a população geral (GUTIERREZ-ACHURY; COUTINHO DE ALMEIDA; WIJMENGA, 2011). Há um crescente reconhecimento da doença celíaca, com dados emergentes sobre a prevalência em todo o mundo , incluindo países como Índia e China (LUNDIN; SOLLID, 2014). A Figura 4 apresenta o mapa mundial com as prevalências da DC relatada por Lionetti e colaboradores (2015). Os autores relacionaram tais prevalências com o consumo de glúten e a frequência de Haplótipos DQ2 e DQ8 na população.

A maior ocorrência de DC em crianças foi relatada em estudo realizado na Espanha (MARINÉ *et al.*, 2011), com 4.280 sujeitos de 1 a 80 anos, demonstrando que esta doença ocorre cinco vezes mais em crianças do que em adultos. Com relação ao gênero, o mesmo estudo espanhol considera que DC é mais prevalente em mulheres, numa relação de 1: 2,5.

Indivíduos que têm um parente de primeiro grau com DC tem um risco 10 vezes maior de ser celíaco, assim como esse risco é maior entre pessoas com tireoidite autoimune (3 a 5%), Diabetes tipo 1 (5 a 10%) e Síndrome de Down (5,5%) (HUSBY *et al.*, 2012).

Catassi e colaboradores (2014) alertam que a incidência de DC está aumentando tanto em áreas com histórico da doença, quanto em novas regiões, como é o exemplo do que ocorre nos países asiáticos. Os autores consideram que mais estudos epidemiológicos são necessários para esclarecer o papel de fatores como alimentação infantil, quantidade de glúten ingerido e padrão dos genótipos predisponentes encontrados nas diferentes populações.

No Brasil, a prevalência de Doença Celíaca comprovada por biópsia, até o momento, variam entre 0,15 a 1,94%, porém existe uma variabilidade nos testes usados para o diagnóstico bem como a população estudada, como está demonstrado na Tabela 5. A maior prevalência em crianças relatada recentemente no estudo espanhol, também foi demonstrada no estudo de Pratesi e colaboradores (2003).

Tabela 5 – Estudos de Prevalência de Doença Celíaca no Brasil

Autor/ ano	Estado	Prevalência	%	População estudada	Exames
Gandolfi, et al 2000	Distrito Federal	1/681	0,15%	2084 doadores de sangue	AGA IgA e IgG EMA IgA Biópsia
Pratesi, et al 2003	Distrito Federal	Adultos=2,11/1000 Crianças=5,44/1000	0,21% 0,54%	4.405 adultos e crianças	EMA-IgA Biópsia
Melo, et al 2006	São Paulo	1/273	0,36%	3000 adultos doadores	TTG- IgA EMA Biópsia
Pereira, et al . 2006	Paraná	1/417	0,23%	2086 adultos doadores	TTG-IgA EMA-IgA Biópsia
Crovella, et al. 2007	Pernambuco	9/1074	0,84%	1074 Universitários/baixa renda assintomáticos	TTG - IgA e IgG+ HLA Biópsia
Oliveira, et al. 2007	São Paulo	1/214	0,46%	3000 adultos doadores	TTG IgA Biópsia
Brandt, et al .2008	Pernambuco	15/831	1,94%	831 crianças e adolescentes (2 a 18 anos)	TTG <i>guinea pig</i> e humana + EMA
Modelli, et al.2010	Distrito Federal	1/214	2,3%	Crianças sintomáticas de 12 a 36 meses	EMA-IgA TTG-IgA AGA-IgG e IgA HLA+ Biopsia

AGA: Anticorpo Antigliadina; AGA-Deam: Antigliadina Deamidada; EMA: Antiendomísio; TTG: Transglutaminase;; IgA: Imunoglobulina A; IgG: Imunoglobulina G; HLA; Human leukocyte antigen/Antígeno leucocitário humano.

Fontes: GANDOLFI, L *et al.* 2000; PRATESI, S *et al.* 2003. QUEIROZ, MS *et al.* 2004; MELO, SBC *et al.* 2006; PEREIRA, MAG *et al.* 2006. CROVELLA, S *et al.* 2012; OLIVEIRA, RP *et al.* 2007; BRANDT, Kátia Galeão;; SILVA, Gisélia Alves Pontes da. 2008; MODELLI, IC *et al.* 2010

2.2.5 Tratamento

Até o momento, a dieta isenta de glúten é o tratamento de eleição. A retirada do trigo, do centeio e da cevada da dieta resulta, usualmente, na remissão clínica, sorológica e histológica. A melhora dos sintomas inicia a partir de duas semanas, a modificação dos marcadores sorológicos pode ocorrer em até 6 a 12 meses e a recuperação das vilosidades intestinais em torno de dois anos. A adesão à dieta sem glúten, além de promover a remissão dos sintomas gastrointestinais, leva à normalização do crescimento e desenvolvimento da criança; ao restabelecimento de parâmetros hematológicos e bioquímicos; à reversão da osteopenia em crianças; à melhora da osteoporose em adultos; à diminuição dos abortamentos espontâneos e dos recém-nascidos com baixo peso; a uma diminuição da incidência de alguns tipos de câncer em adultos; à redução do risco de morbidade e mortalidade; ao bem-estar e melhor qualidade de vida (ROMERO, 2013).

Recomenda-se alimentos naturais e frescos, como carnes, peixes, ovos, leite e derivados, frutas, verduras e hortaliças, legumes e cereais que não contenham glúten como: milho, soja, mandioca e arroz. Os produtos industrializados, para serem considerados seguros, devem conter no máximo 10mg/kg(=10ppm) e devem vir com a etiqueta informando que é livre de glúten (ALLUÉ, ISABEL POLANCO; MANRIQUE, 2014).

Catassi e colaboradores (2007) realizaram um estudo multicêntrico, randomizado e duplo cego, com 49 indivíduos adultos com doença celíaca e concluíram que a ingestão de uma dose de glúten de 50mg por dia, é o mínimo necessário para causar alguma lesão na mucosa intestinal dos pacientes celíacos (uma porção de 25 gramas de pão contém aproximadamente 1,6 gramas de glúten) (FASANO, ALESSIO; CATASSI, 2012). Com relação à aveia, não existe unanimidade em considerar esse cereal como seguro para celíacos. Nos Estados Unidos, a aveia não é proibida para os celíacos e pode ser liberada com rótulo de “livre de glúten” desde que tenha menos de 20ppm (MÄKI, 2014). No nosso meio, Laureano

e Silveira (2010) realizaram um estudo com produtos rotulados como “livres de glúten” e encontraram presença de mais de 20ppm, em 12,9% da amostra estudada.

Alternativas de tratamento para a DC têm sido estudadas visando diminuir a permeabilidade da mucosa, reduzir o efeito do glúten na mucosa lesada, bem como a induzir tolerância ao glúten (MÄKI, 2014). Plugis e Khosla (2015) relataram os recentes avanços na pesquisa de alternativas de tratamento para DC no contexto de sua fisiopatologia, propondo alternativas que envolvem desde a produção de cereais não tóxicos a Bloqueadores do HLA DQ2 ou DQ8. Leffler e colaboradores (2015) realizaram um ensaio clínico randomizado com Acetato de Lazarotide, substância que atua na regulação das junções firmes do epitélio intestinal (*tight junction*) e concluíram que o medicamento não substitui a dieta sem glúten, mas reduz, de forma mais eficaz, os sinais e sintomas naqueles que fazem dieta.

2.3 Doença Celíaca e Diabetes

2.3.1 Aspectos Epidemiológicos

A coexistência de DC com outras doenças autoimunes é relatada em estudos epidemiológicos e genéticos. Os fatores de risco são compartilhados com Doença de Crohn, Colite Ulcerativa, Artrite Reumatóide, Tireoidite Autoimune e DM1 (ZHERNAKOVA *et al.*, 2010) (TÖREL ERGÜR *et al.*, 2010) (GUTIERREZ-ACHURY; COUTINHO DE ALMEIDA; WIJMENGA, 2011). A Figura 7 demonstra a prevalência global da DC e quatro doenças autoimunes relacionadas. Triolo e colaboradores (2011) realizaram um estudo com 491 crianças com DM1 e encontraram 32,6% com, pelo menos, um anticorpo e 18,6% com diagnóstico clínico de outra doença autoimune associada.

Figura 7: Prevalência global de Doença Celíaca, Diabetes tipo 1, Artrite Reumatóide, Colite Ulcerativa e Doença de Crohn



CD:Celiac Disease; T1D: Type 1 Diabetes; RA: Reumathoide Artrits, UC Ulcerative Colitis, CrD: Crohn Disease

Fonte: GUTIERREZ-ACHURY, J; COUTINHO DE ALMEIDA, R; WIJMENGA, C. 2011.

Revisões sistemáticas realizadas recentemente reforçam a associação entre DC e DM1. Elfström e colaboradores (2014) encontraram uma prevalência média de 6,0%, em que foram avaliados estudos de mais de 15 países, incluindo o Brasil. Donaghue e colaboradores (2015) revisaram estudos da Europa e Austrália e identificaram uma prevalência média de 5,1% entre crianças e adultos com DM1. Da mesma forma, no rastreamento de DC em 767 pacientes com DM1, realizado no Instituto da Criança com Diabetes, em Porto Alegre, encontrou-se uma prevalência de 5,1% com a doença confirmada por biópsia duodenal (RAMOS *et al.*, 2015). A Tabela 6 demonstra os estudos de prevalência de DC em pacientes com DM1 realizados no Brasil.

Tabela 6-Estudos de prevalência de DC entre pacientes com DM1 no Brasil:

Ano	Estado	Prevalência	Autor
2005	São Paulo	4,8%	Baptista et al.
2006	Pernambuco	10,5%	Araújo et al.
2006	Minas Gerais	2,6%	Tanure et al.
2010	Bahia	10,5%	Diniz Santos
2013	Minas Gerais	3,1%	Gonçalves et al
2015	Rio Grande do Sul	5,1%	Ramos et al
2016	Rio Grande do Norte	4,5%	Costa Gomes et al

Fontes: BAPTISTA, Márcia Luiza *et al.* 2005; TANURE, MG *et al.* 2006; DINIZ-SANTOS, DANIEL R, 2010; RAMOS, Ana Regina L *et al.* 2015; COSTA GOMES, Rosane *et al.* 2016.

O aumento da incidência de DC nas últimas décadas, junto à maior ocorrência de DC em pessoas com DM1, indicam que o consumo de glúten e a permeabilidade e inflamação do intestino são fatores de risco para o desenvolvimento de DM1(VAARALA; ATKINSON; NEU, 2008) (FRISK *et al.*, 2008). Esses resultados, em conjunto, sugerem que a DM1 e a DC têm uma base genética e ambiental em comum.

2.3.2 O Dilema da triagem:

Existe um dilema relacionado à indicação de triagem dos pacientes com DM1 assintomático, pois não há um consenso se as pessoas assintomáticas devam ou não seguir uma dieta livre de glúten. Os argumentos para indicar a dieta livre de glúten para pacientes com DM1 e DC, mesmo que não tenham sintomas, baseiam-se no melhor controle metabólico e para prevenção da osteopenia (SUD *et al.*, 2010).

Maior mortalidade e mais complicações microvasculares (nefropatia e retinopatia) em adultos com diagnóstico concomitante de DC e DM1, quando comparado com a DM1 isolada,

foi relatada em dois estudos realizados na Suécia, no qual os autores sugerem que tais pacientes representam um grupo de risco distinto (MOLLAZADEGAN *et al.*, 2013) (MOLLAZADEGAN *et al.*, 2014). Por outro lado, Tsouka e colaboradores (2015) compararam pacientes com DC associada a DM1 com pacientes com DC isolada e verificaram que os pacientes com as doenças associadas apresentam um fenótipo mais leve da DC.

Os estudos que avaliam o efeito da dieta sem glúten nos valores de hemoglobina glicosilada e no controle de eventos hipoglicêmicos, não demonstraram haver uma melhora desses parâmetros. Todavia, nesses estudos foi questionado a real adesão a dieta, quando o paciente não observa sintomas ao ingerir glúten (SIMMONS *et al.*, 2011).

Com relação à osteopenia, existe menos controvérsia. Valério e colaboradores (2008) recomendam a adesão à dieta livre de glúten para prevenir osteopenia em crianças e adolescentes com DC e DM1. Estudo realizado no Brasil, por Diniz Santos e colaboradores (2008), verificou que a autoimunidade celíaca está associada a redução da mineralização óssea nos pacientes com DM1, mesmo naqueles que eram assintomáticos.

Entre as complicações possíveis da DC, existe a ocorrência de Linfoma não Hodking. O risco estimado da sua ocorrência em pacientes com DC é 2 a 6 vezes maior do que na população em geral. Pode haver uma redução desse risco com a realização da dieta livre de glúten, porém esse efeito ainda não está muito claro na literatura (GUANDALINI *et al.*, 2015). Avanços no diagnóstico e na compreensão da patogênese dessa complicação estão permitindo encontrar outras opções de tratamento, fazendo com que o diagnóstico precoce, tanto da DC como das suas complicações possam trazer grandes benefícios (MALAMUT; CELLIER, 2015).

Ludvigsson e colaboradores (2015) em revisão abordando o *screening* de DC na população geral e nos grupos de risco, recomendam que as investigações sejam restritas aos grupos de risco. Porém relataram que ainda não está bem definido se o tratamento dos pacientes assintomáticos possa reduzir o risco de complicações a ponto de haver uma boa relação custo benefício.

Diante de todos os questionamentos, Mahmud e colaboradores (2015) estão desenvolvendo um protocolo de estudo randomizado e controlado para avaliar o tratamento da DC assintomática em pacientes com DM1, em que pretendem trazer maiores evidências sobre tal controvérsia, avaliando também parâmetros de qualidade de vida para esses pacientes.

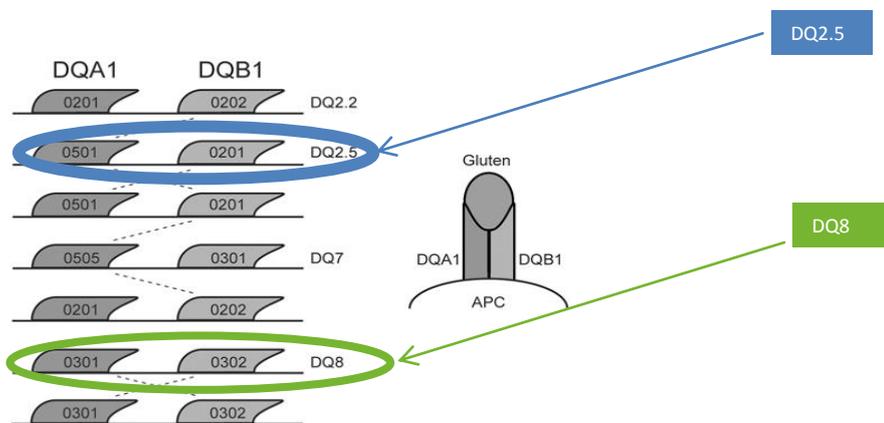
2.3.3 Fatores genéticos de risco

A região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), especificadamente os genes do sistema Antígeno Leucocitário Humano, ou *Human leukocyte Antigen* (HLA) de classe II, representa o principal fator genético de risco para desenvolvimento de DC e DM1 (HOWSON *et al.*, 2009)(NEJENTSEV *et al.*, 2007). Mais de 90% dos pacientes com DC possuem os alelos para DQ2 e os restantes apresentam os alelos para DQ8 (SANZ; ADRADOS, 2013) A DM1 é outra doença geneticamente associada ao HLA-DQ, que contém pelo menos uma cópia do haplótipos DQ2 ou DQ8, sendo mais frequente a ocorrência dos alelos para DQ8. (KOOY-WINKELAAR *et al.*, 2011).

A combinação de alelos irá determinar um maior ou menor risco para o desenvolvimento das doenças. Os alelos DQB1*0201 e DQA1*0501 formam o haplótipo DQ2.5; os alelos DQB1*0302 e DQA1*0301 formam o haplótipo DQ8. Existem também as combinações DQA1*0201 e DQB1*0202 que formam o haplótipo DQ 2.2 e os alelos DQA1*0505 e DQB1*0301 que formam o haplótipo DQ7. No caso da DC, as combinações de maior risco são DQ2.5 e DQ8 ou homocigoto de DQ2.5. No caso da DM1 a mesma

combinação dos alelos para o haplótipo DQ2.5 e DQ8 causa um risco 20 vezes maior de desenvolver a doença (MONSUUR *et al.*, 2008)(LIU *et al.*, 2014)(NOKOFF; REWERS, 2013). A Figura 8 apresenta de forma esquemática as principais combinações de alelos associadas ao risco de DC, relacionando com sua habilidade de ligação com o glúten para apresentação para os linfócitos T.

Figura 8: Principais combinações de alelos associadas ao risco de DC



Modificado de: MONSUUR, AJ *et al.* 2008.

A associação entre essas moléculas e o desenvolvimento de DC é explicada pela alta afinidade de ligação que elas possuem pelos peptídeos derivados da gliadina, existentes no glúten. A ocorrência dessa ligação resulta em uma resposta imune com geração de anticorpos específicos e secreção de citocinas inflamatórias, fator de necrose tumoral e interferon, que são os causadores das manifestações clínicas da doença (BODD *et al.*, 2010).

O processo autoimune da DM1 é mediado por macrófagos e linfócitos T, com anticorpos circulantes para antígenos das células β do pâncreas (NOKOFF; REWERS, 2013). Na maioria dos casos, a agressão inicial das células β ocorre indiretamente, ou seja, anticorpos produzidos contra antígenos virais acabam lesionando as células β devido ao mimetismo molecular entre os antígenos virais e antígenos dessas células. A hiperglicemia

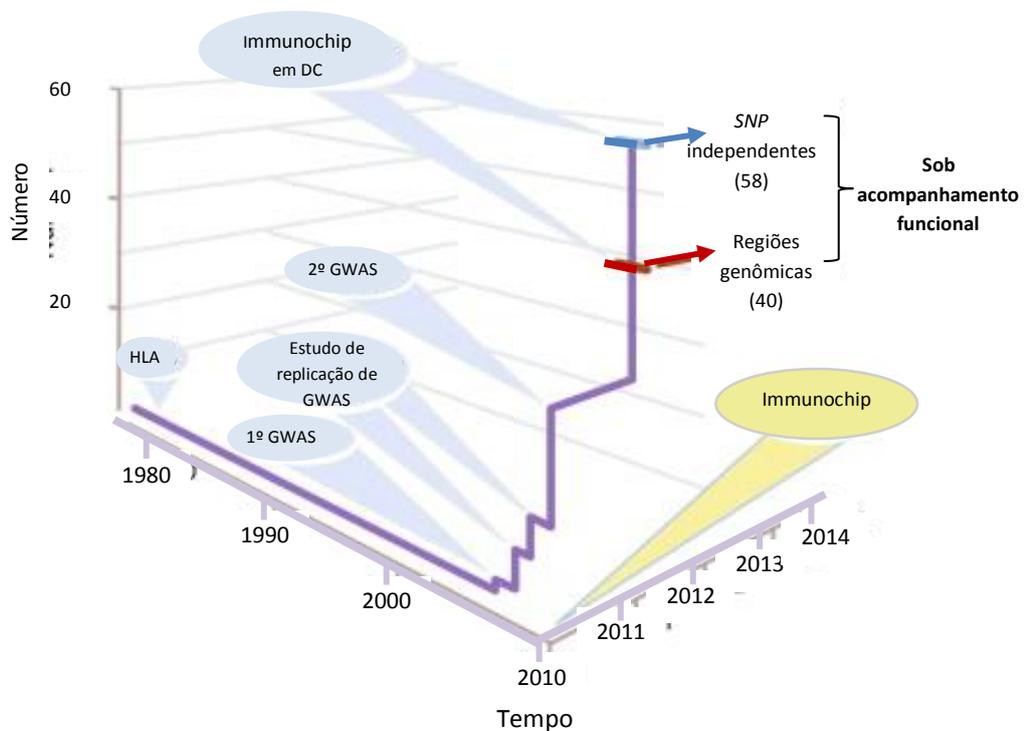
permanente se manifesta quando 90% das ilhotas são destruídas (MONTENEGRO JÚNIOR *et al.*, 2013).

Os genes HLA, exercem um papel importante em doenças autoimunes como DC e DM1, sendo a sua identificação nas pessoas com tais doenças muito importante para compreender aspectos da maior ou menor suscetibilidade, assim como para compreender as diferentes apresentações clínicas. As genotipagens são realizadas por reação de cadeia de polimerase- *Polymerase Chain Reaction (PCR)* e as técnicas moleculares mais utilizadas são *sequence specific primers (SSP)* e *sequence specific oligonucleotide probes (SSO)*. Porém essas técnicas consideradas tradicionais para genotipagem envolvem muitas reações tornando-as complicadas e com alto custo. Monsuur e colaboradores (2008) validaram uma técnica usando *Tag single nucleotide polymorphisms (Tag SNP)*, permitindo a realização dos testes com alta sensibilidade e especificidade com um custo menor. Brandão e colaboradores (2010) realizaram um estudo, na região nordeste do Brasil, em pacientes com DM1 e confirmaram maior risco de desenvolver a doença nos pacientes heterozigotos para DQ2.5/DQ8, utilizando a técnica usando *Tag SNP*.

A ausência dos genes HLA DQ2 e DQ8 praticamente exclui o risco, principalmente, para DC, mas muitas pessoas têm um ou ambos os genes não desenvolvem DM1 ou DC. Este fato sugere que existam outras variáveis genéticas e ambientais que influenciam o aparecimento da DM1 e da DC. Os estudos de associação genômica (GWAS) buscam por genes não HLA que possam auxiliar na compreensão da etiologia e nas variabilidades clínicas que ocorrem entre os indivíduos (SMYTH *et al.*, 2008). Trynka e colaboradores (2010) destacaram a importância dos GWAS para relacionar o compartilhamento genético entre as doenças e descrevem o maior compartilhamento de genes que ocorre entre a DC e a DM1 (sete genes) seguido do compartilhamento entre a artrite reumatoide e a Doença de Crohn (quatro genes).

Romanos e colaboradores (2014) avaliaram 57 genes não HLA e sugerem que a pesquisa desses genes poderá melhorar a previsão de maior risco de DC entre indivíduos com DM1. Em revisão recente, Ricaño-Ponce, Wijmenga e Gutierrez-Achury (2015) apresentaram a cronologia das descobertas desde 1980, destacando o ano de 2007, quando foi realizado o primeiro GWAS, e o ano de 2010, pelo advento do *ImmunoChip*. Observa-se na Figura 9 a rápida evolução, chegando a identificação de mais de 41 regiões relacionadas com a DC.

Figura 9- Linha do tempo das descobertas desde o HLA em 1980 até 2014



DC: Doença Celíaca; *SNP*: Single Nucleotide Polimorphism; *GWAS*: Genome-wide association study

Modificado de: RICAÑO-PONCE, Isis; WIJMENGA, Cisca; GUTIERREZ-ACHURY, Javier. 2015

A grande maioria desses *loci* não HLA contém genes relacionados com resposta imune que estão envolvidos em rotas de sinalização de células imune, maturação e diferenciação de células T e quimiocinas. Na resposta imune observada na DC, o consumo de glúten leva à apresentação de antígenos e à liberação de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas, depois

de ligadas aos seus receptores, induzem sinalização intracelular (GUTIERREZ-ACHURY; COUTINHO DE ALMEIDA; WIJMENGA, 2011).

Entre os genes já pesquisados, destacamos na Tabela 7 os polimorfismos de nucleotídeos simples (*SNPs*) e seus respectivos alelos de risco, cujos estudos demonstram alguma relação com a fisiopatogenia da DC e da DM1. Os referidos genes são comparados com o catálogo do projeto internacional *HapMap*. Esse catálogo contém as variantes genéticas comuns que ocorrem nos seres humanos e como elas são distribuídas entre as pessoas dentro das populações e entre populações de diferentes partes do mundo. Tal projeto foi concebido para fornecer informações que os pesquisadores podem usar para conectar variantes genéticas de risco em doenças específicas. A partir dessas conexões, tona-se possível a identificação de novos métodos de prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças de interesse (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>).

Os tipos de estudo realizados pelos autores citados na Tabela 7 foram GWAS, Caso Controle e Testes de Desequilíbrio de Transmissão (TDT). O TDT é realizado a partir de um *software* que utiliza regressão logística multivariada para avaliar a associação dos *SNPs* com as doenças de interesse (IZZIO *et al.*, 2011).

Tabela 7- Estudos que investigaram os polimorfismos em pacientes com Doença Celíaca e Diabetes Mellitus tipo 1

Gene(SNP)	Alelo de risco	HapMap-Europeus*	Autor	Tipo de estudo	Local do estudo
RGS1 (rs2816316) (C/A)	A	0,80	Izzo <i>et al.</i> , 2011.	TDT	Itália
			Romanos <i>et. al.</i> , 2009.	Caso-controle	Itália
			Hunt <i>et al.</i> , 2008.	Caso-controle	Reino Unido, Irlanda, Holanda
			Smyth <i>et al.</i> , 2008.	GWAS*	Reino Unido, Irlanda, Finlândia, Noruega e Romania
			Van Heel <i>et al.</i> , 2007.	GWAS*	UK
IL2/IL21 (rs6822844) (C/A)	C	0,85	Izzo <i>et al.</i> , 2011.	TDT	Itália
			Romanos <i>et. al.</i> , 2009.	Caso-controle	Itália
			Van Heel <i>et al.</i> , 2007.	GWAS*	Reino Unido, Irlanda e Holanda
			Smyth <i>et al.</i> , 2008.	GWAS*	Reino Unido, Irlanda, finlândia, Noruega e Romania
BACH2 (rs11755527) (C/G)	C	0,58	Smyth <i>et al.</i> , 2008.	GWAS*	Reino Unido, Irlanda, finlândia, Noruega e Romania
TLR7/TLR8 (rs597985) (C/T)	T	0,76	Izzo <i>et al.</i> , 2011.	TDT	Itália
IL18RAP (rs917997) (A/G)	A	0,22	Smyth <i>et al.</i> , 2008.	GWAS*	Reino Unido, Irlanda, Finlândia, Noruega e Romania

* <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>

RGS1: Regulator of G protein signaling 1 ; **IL2/IL21:** Interleucina 2 e 21; **BACH 2:** BTB domain and CNC homolog 2; **TLR:** Toll-like receptors; **IL18RAP:** Interleukin 18 receptor accessory protein **TDT-**Teste de Desequilíbrio de Transmissão.

Fontes: IZZO, V *et al.* 2011; ROMANOS, J *et al.* 2009. HUNT, K A *et al.*, 2008; VAN HEEL, D A *et al.* 2007; SMYTH, DJ *et al.* 2008.

O gene *RGS1* (*Regulator of G protein signaling 1*) atua na ativação e proliferação de células B e no bloqueio dos linfócitos intraepiteliais (LIE) (IZZO *et al.*, 2011). O papel principal dos LIE é prevenir entrada de patógenos capazes de causar reações inflamatórias que causam dano epitelial. O descontrole na ativação dos LIE é a marca da DC, onde ocorre destruição de células epiteliais e consequente atrofia vilositária (GALATOLA *et al.*, 2013).

Smyth e colaboradores (2008) descreveram uma suscetibilidade comum entre a DC e a DM1 partir de genes como *RGS1*. Nesse estudo, foi sugerido que existem mecanismos biológicos comuns que causam intolerância a antígenos da dieta e dano tecidual. A associação desse gene com Esclerose Múltipla, Diabetes tipo 1 e Doença Celíaca, que são doenças mediadas por células T, é estudada por Gibbons e colaboradores (2011). Os autores comprovaram a ligação do gene com o processo inflamatório que ocorre nessas doenças através da pesquisa em tecidos de mucosa intestinal de humanos, mucosa intestinal de ratos e no sangue periférico. Portanto, o papel do gene *RGS1* nos processos inflamatórios que envolvem a DC e a DM1 tem relação com seu efeito sobre os linfócitos T e B e, de forma especial, com as lesões intestinais.

Os genes relacionados às interleucinas 2 e 21 (IL2/IL21), localizados no cromossoma 4q27, atuam como fator de crescimento das células T, na proliferação de células *Natural Killer* (NK), monócitos, macrófagos e na diferenciação de células B (TRYNKA; WIJMENGA; VAN HEEL, 2010). O polimorfismo *rs6822844* além da associação com DC, também é descrito em associação com artrite reumatóide e DM1 (HUNT *et al.*, 2008). A associação com DM1 foi relatada por Smyth e colaboradores (2008) como sendo mais forte do que sua associação com a DC, porém lembram que, além dos fatores genéticos e inflamatórios, os fatores epigenéticos e ambientais também influenciam no desfecho de maior ou menor risco dessas doenças.

O gene *BACH2* (*BTB domain and CNC homolog 2*), localizado no cromossoma 6q15, é definido como um amplo regulador imune que reprime a diferenciação de múltiplas linhagens efectoras das células T auxiliares (T CD4⁺). Por isso é associado a diversas doenças autoimunes e alérgicas, incluindo asma, Doença de Crohn, Doença Celíaca, Vitiligo, Esclerose múltipla e DM1 (ROYCHOUDHURI *et al.*, 2013). Também é conhecido como gene regulador das células B na resposta dos anticorpos desencadeada por infecções virais (TRYNKA; WIJMENGA; VAN HEEL, 2010) (GARNER *et al.*, 2014). Plugis e Khosla (2015) sugerem que o maior conhecimento do papel desse gene na patogênese da DC poderá auxiliar na busca de novas alternativas de tratamento para a doença. Já com a DM1, Marroquí e colaboradores (2014), em um estudo desenvolvido em células pancreáticas humanas e de roedores, demonstraram que a sua patogênese está relacionada com mecanismos de apoptose sobre as células β pancreáticas.

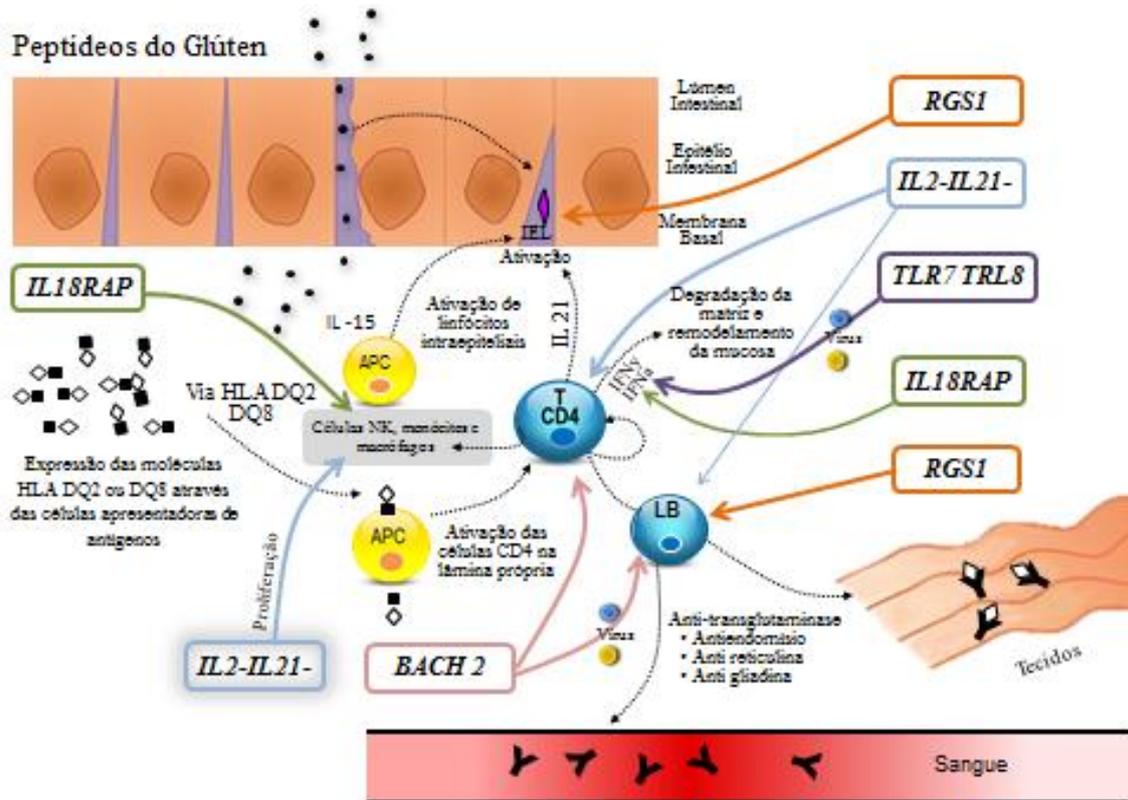
Os genes relacionados à *Toll-like receptors (TLR)*, *TLR7/TLR8* localizado no cromossoma Xp22.2, por ser um gene ligado ao x, somente as mulheres possuem o fenótipo heterozigoto. O polimorfismo *rs 5979785* já tem descrito sua maior expressão na DM1 por Cooper e colaboradores (2009) em um GWAS envolvendo 1715 polimorfismos. Abadie e colaboradores (2011) relacionam a ativação e promoção de células T pró-inflamatórias que ocorre na patogênese dessas doenças com polimorfismos de genes como *TLR7/TLR8*. A relação com a imunidade inata e a produção de interferon, a partir do gatilho de infecções virais e a ligação com esses genes é relatado por Kim e colaboradores (2015) em uma revisão sobre o papel da imunidade inata na patogênese da DC.

O gene relacionado a *IL18 RAP (Interleukin 18 receptor accessory protein)*, localizado no cromossoma 2q12, está associado à produção de interferon gama e a atividade das células T e das células *NK* (HUNT *et al.*, 2008). Tal polimorfismo é considerado de suscetibilidade

para DC e com caráter protetor para DM1 (MYHR *et al.*, 2013) (SMYTH *et al.*, 2008). Plaza-Izurieta e colaboradores (2011) avaliaram a expressão desse gene em biópsias intestinais de pacientes com DC no momento do diagnóstico e compararam com pacientes em dieta livre de glúten há mais de dois anos. Os autores observaram maior expressão do gene nos pacientes com DC ativa e sugerem que, além dos fatores genéticos, exista uma grande influência de fatores ambientais nas reações inflamatórias desencadeadas por ativação de células T.

A Figura 10 demonstra de forma esquemática o papel dos cinco genes citado na patogênese da DC.

Figura 10: Patogênese da DC e o papel dos cinco genes não HLA pesquisados



- *RGS1*- Ativação e proliferação de células B e bloqueio de Linfócitos Intraepiteliais (IZZO *et al.*, 2011) (GALATOLA *et al.*, 2013).
- *IL2-IL21*- Atua como fator de crescimento das células T, na diferenciação de células B e proliferação das células NK monócitos, macrófagos (TRYNKA; WIJMENGA; VAN HEEL, 2010).
- *BACH2*- Diferenciação de linhagens de células T CD4. Atua como regulador da resposta de anticorpos desencadeada por infecções virais (ROYCHOUDHURI *et al.*, 2013) (GARNER *et al.*, 2014).
- *TLR7/TLR8*- Produção de células T inflamatórias na produção de IL15. Produção de interferon, a partir do gatilho de infecções virais (ABADIE *et al.*, 2011) (KIM, SUNG KOO, 2015).
- *IL18RAP*- está relacionado com a produção de Interferon gama e ativação de células T e das células NK (SMYTH *et al.*, 2008).

RGS1: Regulator of G protein signaling 1; *IL2/IL21*: Interleucina 2 e 21; *BACH2*: BTB domain and CNC homolog 2; *TLR*: Toll-like receptors; *IL18RAP*: Interleukin 18 receptor accessory protein

Modificado de: SCHUPPAN, D; JUNKER, Y; BARISANI. 2009

3 JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

Diabetes tipo 1 e Doença Celíaca são doenças autoimunes cuja manifestação envolve uma base genética comum, em que os genes HLA de classe II, representam o principal fator risco. Mais de 90% dos pacientes apresentam os alelos DQ2 e ou DQ8. Porém, aproximadamente 40% da população que não apresenta tais doenças, também são portadores desses genes.

Os estudos de identificação de polimorfismos não HLA, realizados até o momento, apontam genes de susceptibilidade para DC e DM1 com associação de alterações imunológicas e inflamatórias. Não existem estudos desses genes em pessoas com DM1 na população brasileira. Portanto, a caracterização dos polimorfismos não HLA poderá trazer benefícios para o entendimento da relação entre essas doenças e das variabilidades clínicas existentes entre os indivíduos.

Não existem estudos dos genes HLA DQ2.5 e DQ8 entre indivíduos com DC e DM1 no Rio Grande do Sul e sabemos que a população brasileira apresenta uma grande variabilidade de etnias entre suas regiões.

4 HIPÓTESES

4 HIPÓTESES

Os polimorfismos não HLA pesquisados na amostra são mais prevalentes nas pessoas com Diabetes tipo 1, que apresentam Doença Celíaca quando comparados com aquelas sem Doença Celíaca associada.

A variabilidade clínica entre as pessoas com DM1 e DC pode estar associada aos polimorfismos não HLA.

5 OBJETIVOS

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Principal

Avaliar a frequência dos polimorfismos HLA e não HLA em pessoas com Diabetes Mellitus tipo 1 e com Doença Celíaca.

5.2 Objetivos Específicos

1. Comparar a frequência dos polimorfismos não HLA apontados como de risco para DC e DM1 em uma amostra de pessoas com Diabetes Mellitus tipo 1 que apresentam ou não DC.
2. Avaliar a presença de sintomas gastrointestinais, a idade da introdução do glúten, o tempo de aleitamento materno e a idade do diagnóstico da DM1 entre pessoas com DM1 que apresentam ou não DC.
3. Relacionar a presença de sintomas gastrointestinais e idade do diagnóstico da diabetes com a presença dos alelos de risco para os polimorfismos não HLA entre as pessoas com DM1.
4. Avaliar a frequência dos alelos para DQ2.5 e para DQ8 em pessoas com Diabetes tipo 1 e com Doença Celíaca em uma população do Rio Grande do Sul.

6 MÉTODOS

6 MÉTODOS

6.1 Delineamento: O presente estudo constou de um delineamento transversal, com avaliações retrospectivas e prospectivas. Os desfechos foram Polimorfismos não HLA e determinação haplotípica de HLA DQ2.5 e DQ8 e os fatores em estudo foram Diabetes Mellitus tipo 1, Doença Celíaca e a associação dessas duas doenças.

6.2 Locais da pesquisa: Instituto da Criança com Diabetes (ICD) – Hospital da Criança Conceição, localizado na cidade de Porto Alegre, capital do Estado do Rio Grande do Sul (RS), para avaliação das pessoas com DM1. Departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Associação dos Celíacos do Brasil- Rio Grande do Sul (ACELBRA-RS).

6.3 População: Foram avaliados pessoas com diagnóstico de Diabetes Mellitus tipo 1, que recebem atendimento periódico no Instituto da Criança com Diabetes e indivíduos com diagnóstico de Doença Celíaca, que participaram dos eventos promovidos pela ACELBRA-RS.

6.4 Critérios de inclusão

6.4.1 Pessoas com DM1

- Ter diagnóstico de DM1 firmado pela equipe de atendimento do ICD e estar apresentando evolução clínica compatível com o diagnóstico durante o tratamento com insulina;
- Possuir, pelo menos, 2 anos completos no momento do recrutamento;
- Indicação de coleta de sangue por indicação do próprio atendimento;

- Possibilidade de coleta de saliva para extração do DNA;
- Consentir na participação no estudo mediante a assinatura do consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelo paciente ou seu responsável legal. Esse documento é apresentado no APÊNDICE A.
- Disponibilidade do paciente ou seu responsável legal de responder a entrevista estruturada apresentada no APÊNDICE B.

6.4.2 Pessoas com DC

- Diagnóstico de DC firmado pelo médico assistente do paciente.
- Possuir, pelo menos, 2 anos completos no momento do recrutamento;
- Possibilidade de coleta de saliva para extração do DNA;
- Consentir na participação no estudo mediante a assinatura do consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelo paciente ou seu responsável legal. Esse documento é apresentado nos APÊNDICES C.
- Disponibilidade do paciente ou seu responsável legal de responder a entrevista estruturada apresentada no APÊNDICE D.

6.5 Critérios de exclusão

6.5.1 Pessoas com DM1

- Não haver realizado sorologia para DC (TTG- IgA) até momento da realização do estudo;

- Sorologia para DC com valores considerados intermediários pelo *Kit* fornecido pelo laboratório (TTG-IgA entre 9,0U/ml e 16,0U/ml);
- Não haver realizado Endoscopia Digestiva Alta com biópsias duodenais até momento da realização do estudo, apesar da sorologia ser positiva para DC (TTG-IgA maior que 16U/ml);
- Sorologia positiva para DC (TTG-IgA maior que 16U/ml) cuja biópsia duodenal foi classificada como menor que 2, pelos critérios de Marsh (1992) modificados por Oberhuber (1999).

6.5.2 Pessoas com DC

- Ter o diagnóstico de DM1 associada a DC.
- Não haver realizado estudo histológico para estabelecer o diagnóstico de DC.

6.6 Logística

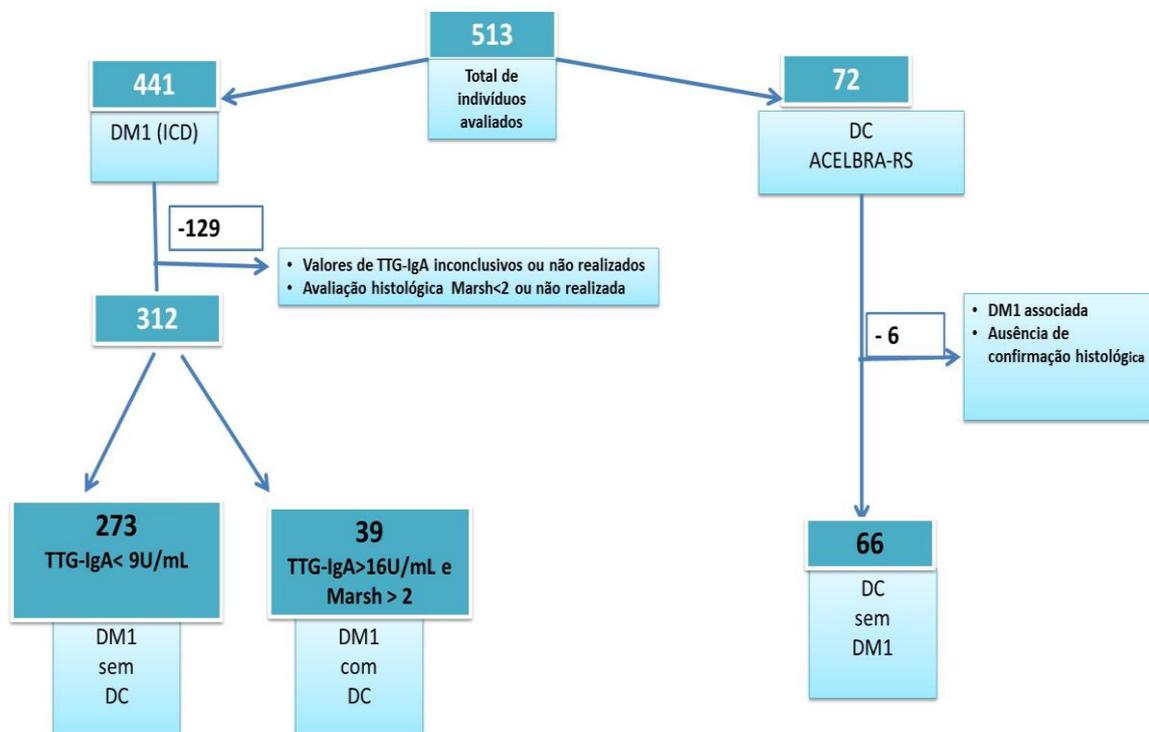
As pessoas com DM1 são atendidas desde os 0 aos 21 anos de idade e permanecem em atendimento no ICD até a idade adulta. São avaliados a cada 3 meses, e submetidos a coleta de exames para o controle da diabetes. A partir de 2 anos de idade, são avaliadas a presença de anticorpo Transglutaminase Tecidual IgA (TTG-IgA) e Imunoglobulina A (IgA) sérica. Aquelas com sorologia positiva são encaminhadas para o Serviço de Gastroenterologia do Hospital Conceição para investigação diagnóstica com endoscopia digestiva alta e realização biópsia duodenal. Em caso de deficiência de IgA é solicitada avaliação de IgG Antiendomísio (EMA).

No dia que realizaram a avaliação periódica para controle da Diabetes, após a autorização para participar do estudo, mediante a leitura e assinatura do termo de consentimento (APÊNDICE A), também foi realizada a entrevista (APÊNDICE B) e coletada amostra de sangue e/ou saliva para extração de DNA.

Para os indivíduos com diagnóstico de DC não associada a DM1, foi solicitada autorização para participar do estudo, mediante a leitura e assinatura do termo de consentimento (APÊNDICE C) durante eventos promovidos pela ACELBRA-RS. Foi coletada amostra de saliva e realizada entrevista (APÊNDICE D) para identificar aqueles que contemplavam os critérios de inclusão no estudo.

A Figura 11 resume a logística utilizada para seleção das pessoas avaliadas para o estudo.

Figura 11: Logística da seleção das pessoas



DM1: Diabetes Mellitus tipo 1; ICD: Instituto da Criança com Diabetes; DC: Doença Celíaca; ACELBRA- RS: Associação dos Celíacos do Brasil-Rio Grande do Sul; TTG-IgA: Transglutaminase total IgA

6.7 Variáveis estudadas

Das pessoas com DM1, foram avaliadas as seguintes variáveis clínicas: idade, gênero, tempo de aleitamento materno, idade do diagnóstico da DM1, idade da introdução do glúten na dieta e a presença de queixa gastrointestinal.

A frequência dos polimorfismos não HLA dos genes *RGS1*, *IL2/IL21*, *BACH2* *TLR7/TLR8* e *IL18 RAP* foi avaliada em todas as pessoas com DM1.

A frequência dos alelos para DQ2.5 e DQ8 foi avaliada em todas as pessoas com DM1 e com DC.

6.8 Métodos Laboratoriais

6.8.1 Extração do DNA

Uma amostra de sangue periférico (10 ml de sangue total com anticoagulante) foi coletada para posterior extração de DNA pelo método de *Salting Out* (LAHIRI; NURNBERGER, 1991). Quando impossibilitada a coleta de sangue, uma amostra de saliva foi coletada através do kit Oragene (DNA Genotek®) e submetida à extração de DNA de acordo com as instruções do fabricante.

6.8.2 Genotipagem dos Polimorfismos

A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR *Real Time*) foi realizada para determinação genotípica dos polimorfismos investigados através do ensaio por TaqMan® Genotyping Assays (Applied Biosystems, USA), conforme instruções do fabricante. Os ensaios utilizados no PCR *Real Time* para todos os polimorfismos estavam previamente depositados no *Custom TaqMan Genotyping Assay* (Applied Biosystems) e

incluem: C__15810686_10 (rs2816316 A>C de *RGS1*), C__28983601_10 (rs6822844 G>T de *IL2/IL21*), C__2014214_10 (rs11755527 C>G de *BACH2*), C__11532957_10 (rs5979785 C>T de *TLR7/TLR8*) e C__345197_1_ (rs917997 A>G *IL18RAP*).

6.8.3 Determinação Haplótipica de HLA-DQ2.5 e DQ8

A predição dos haplótipos de HLA-DQ2.5 e HLA-DQ8 foi realizada a partir da abordagem de *Tag Single nucleotide polymorphism (Tag-SNP)* (MONSUUR *et al.*, 2008) (BRANDAO L C *et al.*, 2010). A Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (*PCR Real Time*) foi realizada através do ensaio por *TaqMan® Genotyping Assays (Applied Biosystems, USA)*, conforme instruções do fabricante. Os ensaios utilizados estavam previamente depositados no Custom *TaqMan Genotyping Assay (Applied Biosystems)* e incluíram: C__58662585_10 (rs2187668 C>T de HLA-DQA1) e C__29817179_10 (rs7454168 C>T de HLA-DQB1). Os alelos pesquisados foram: DQB1*0201 e DQA1*0501 para o haplótipo DQ2.5 e o alelo DQB1*0302 para o haplótipo DQ8.

A análise dos resultados foi realizada através do *StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems)*. A determinação genotípica dos polimorfismos não-HLA foi realizada com o auxílio do mesmo *software*, enquanto a determinação haplotípica de DQ2.5 e DQ8 foram obtidas a partir da abordagem de *Tag Single nucleotide polymorphism (Tag-SNP)* (MONSUUR *et al.*, 2008) (BRANDAO L C *et al.*, 2010).

6.8.4 Transglutaminase IgA e IgA total

A dosagem do anticorpo Transglutaminase total IgA foi realizada pela técnica de Enzimoimunoensaio. O exame foi solicitado pela equipe de atendimento do ICD e foi realizado pelo Laboratório de Apoio de Análises Clínicas Especiais, Barcelona (ESP) em parceria com ao laboratório de Análises Clínicas Endocrimetra de Porto Alegre – RS. Os valores de referência são: não reagente: inferior a 9,0 U/mL; indeterminado: 9,0 a 16,0 U/mL e reagente: superior a 16,0 U/mL.

Os níveis séricos de IgA total foram determinados em todas as amostras de soro pela técnica de nefelometria, utilizando-se o aparelho Behring Nephelometer II (Dade Behring, EUA). Esse exame foi solicitado pela equipe de atendimento do ICD e foi realizado pelo laboratório de análises clínicas do Hospital da Criança Conceição. As pessoas que apresentassem níveis séricos de IgA total abaixo de 5 mg/dL seriam considerados com diagnóstico de deficiência seletiva de IgA e submetidos à dosagem de anticorpos EMA- IgG.

No presente estudo não houve casos de deficiência de IgA entre as pessoas com DM1, logo todos foram avaliados somente com TTG-IgA.

6.9 Considerações estatísticas

A partir do objetivo principal, foi planejado um estudo no qual a taxa esperada alelo de risco mais raro entre DM1 sem DC seria de 20% enquanto que entre DM com DC seria de 44%. Supondo que a proporção de celíacos entre diabéticos é de 10% estimou-se que um tamanho amostral de 30 pessoas com DM1 com DC e de 300 com DM1 sem DC forneceria um poder estatístico de 80% em um nível de significância bicaudal de 5% para testar esta diferença.

Todos os polimorfismos foram testados para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, através do teste de Qui-Quadrado. Frequências alélicas e genótípicas foram comparadas entre os grupos através de Teste de Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher. Os mesmos testes foram utilizados para comparar a frequência dos alelos de risco dos polimorfismos com os haplótipos de DQ2.5 e DQ8. As características clínicas foram comparadas entre os grupos através dos testes de Qui-Quadrado, Teste Exato de Fischer, Teste de Kruskal Wallis e ANOVA. Análises subsequentes avaliaram a influência dos polimorfismos não HLA nas características clínicas das pessoas com DM1. Regressão logística binária foi empregada para explorar possíveis interações gene-gene (epistasia) entre polimorfismos que foram associados a(s) mesma(s) variável(is) dependente(s). Os dados foram analisados com o programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* versão 20.0.

7 ASPECTOS ÉTICOS

7 ASPECTOS ÉTICOS

Toda a pesquisa que envolve seres humanos visa o mínimo de intervenções possíveis. Com essa preocupação, a coleta de sangue foi realizada somente nas pessoas com DM1 que tinham indicação de coleta de sangue em função dos exames periódicos indicados pela equipe médica. No caso de não haver indicação de coleta de sangue, foi realizada a coleta de saliva. No caso das pessoas com diagnóstico de DC, como realizaram o procedimento fora do ambiente próprio para coleta de sangue e não havia outra indicação médica para coleta de sangue, para todos foi realizada a coleta de saliva.

O presente estudo foi desenvolvido obedecendo às normas do Congresso Nacional de Saúde a partir da resolução de número 466/12, sendo aprovado através da Plataforma Brasil (CAE 01260412.7.0000.5347) pelos Comitês de Ética em Pesquisa das seguintes instituições: Grupo Hospitalar Conceição, onde foi realizada a coleta de dados das pessoas com DM1 e Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), comitê vinculado a instituição de origem da pesquisadora (Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente - UFRGS).

Tanto os pacientes ou seus responsáveis com DM1 como com DC foram devidamente esclarecidos sobre o estudo e, aos mesmos, foi solicitada a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICES A e C) em duas vias: uma permaneceu com o pesquisador e outra com o sujeito da pesquisa.

8 REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. ABADIE, Valérie *et al.* Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annual Review of Immunology*, v. 29, n. 1, p. 493–525, 23 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21219178>>. Acesso em: 4 ago. 2011.
2. ALLUÉ, Isabel Polanco; MANRIQUE, María Luisa Mearin. Enfermedad celíaca. In: ALLUÉ, ISABEL POLANCO (Org.). *Atlas de Gastroenterología Pediátrica*. Madrid: Ergon, 2014. p. 151–157.
3. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Children and Adolescents. *Diabetes Care*, v. 38, n. Supplement_1, p. S70–S76, 1 jan. 2015a. Disponível em: <<http://care.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/dc16-S014>>.
4. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*, v. 38, n. Supplement_1, p. S8–S16, 2015b. Disponível em: <<http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc15-S005>>.
5. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, v. 37, n. Supplement_1, p. S81–S90, 1 jan. 2014. Disponível em: <<http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc14-S081>>.
6. ATLAS, IDF DIABETES. *IDF DIABETES ATLAS*. Disponível em: <www.diabetesatlas.org>. Acesso em: 1 mar. 2016.
7. BILKHOO, Harpreet Kaur *et al.* Revisiting Pathological Criteria for Earlier Diagnosis of Coeliac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. Ahead of p, p. 1, out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26529345>>.
8. 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, nov. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20571486>>. Acesso em: 12 jan. 2012.
9. BRANDAO L C *et al.* Rapid genetic screening for major human leukocyte antigen risk haplotypes in patients with type 1 diabetes from Northeastern Brazil. *Human Immunology*, v. 71, n. 3, p. 277–280, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2009.12.008>>.
10. CATALDO, F *et al.* Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Italian Society of Paediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and “Club del Tenue” Working Groups on Coeliac Disease. *Gut*, v. 42, n. 3, p. 362–5, 1998. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1727042&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

11. CATASSI, Carlo; FABIANI, Elisabetta; IACONO, Giuseppe. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 85, p. 160–166, 2007. Disponível em: <<http://ajcn.nutrition.org/content/85/1/160.short>>. Acesso em: 20 fev. 2015.
12. CATASSI, Carlo; GATTI, Simona; FASANO, Alessio. The New Epidemiology of Celiac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 59, n. July, p. S7–S9, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24979197>>. Acesso em: 13 fev. 2015.
13. CILLERUELO, María Luz *et al.* Prevalence and Natural History of Celiac Disease in a Cohort of at-Risk Children. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. [Epub ahead of print], n. 3, p. 1, out. 2015. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005176-900000000-99337>>.
14. COOPER, J D *et al.* Follow-up of 1715 SNPs from the Wellcome Trust Case Control Consortium genome-wide association study in type I diabetes families. *Genes and Immunity*, v. 10, n. Suppl 1, p. S85–S94, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/gene.2009.97>>.
15. CORAZZA, G R. Coeliac disease. *Journal of Clinical Pathology*, v. 58, n. 6, p. 573–574, 2005. Disponível em: <<http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.2004.023978>>.
16. COSTA GOMES, Rosane *et al.* The celiac iceberg: from the clinical spectrum to serology and histopathology in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus and Down syndrome. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 51, n. 2, p. 178–185, 4 fev. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26339731>>.
17. DINIZ-SANTOS, D; MACHADO, APL; SILVA, LR. Doença Celíaca. In: CARVALHO, ELISA DE; SILVA, LUCIANA R; FERREIRA, CRISTINA TARGA (Org.). *Gastroenterologia e Nutrição em Pediatria*. São Paulo: Manole, 2012. p. 359–403.
18. DINIZ-SANTOS, Daniel R *et al.* Bone Mineralization in Young Patients with Type 1 Diabetes Mellitus and Screening-identified Evidence of Celiac Disease. *Digestive Diseases and Sciences*, v. 53, n. 5, p. 1240–1245, 16 maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17939041>>. Acesso em: 3 fev. 2012.
19. DONAGHUE, K. C. *et al.* Screening for Celiac Disease in Type 1 Diabetes: A Systematic Review. *PEDIATRICS*, v. 136, n. 1, p. e170–e176, 1 jul. 2015. Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2014-2883>>.
20. DREWES, Anne M. Brain changes in diabetes mellitus patients with gastrointestinal symptoms. *World Journal of Diabetes*, v. 7, n. 2, p. 14, 2016. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1948-9358/full/v7/i2/14.htm>>.

21. DU PRÉ, M. Fleur; SOLLID, Ludvig M. T-cell and B-cell immunity in celiac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 29, n. 3, p. 413–423, jun. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521691815000487>>.
22. ELFSTRÖM, P; SUNDSTRÖM, J; LUDVIGSSON, J F. Systematic review with meta-analysis: associations between coeliac disease and type 1 diabetes. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 40, n. 10, p. 1123–1132, nov. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25270960>>.
23. ENSARI, Arzu. Gluten-sensitive enteropathy (celiac disease): controversies in diagnosis and classification. *Archives of pathology & laboratory medicine*, v. 134, n. 6, p. 826–36, jun. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20524861>>.
24. FASANO, Alessio; CATASSI, Carlo. Clinical practice. Celiac disease. *The New England journal of medicine*, v. 367, n. 25, p. 2419–26, 20 dez. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23252527>>. Acesso em: 9 jul. 2014.
25. FRANZESE, Adriana *et al.* Potential celiac disease in type 1 diabetes: A multicenter study. *Diabetes Research and Clinical Practice*, v. 92, n. 1, p. 53–56, abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21239079>>. Acesso em: 13 jun. 2011.
26. FREEMAN, Hugh James *et al.* Recent advances in celiac disease. *World journal of gastroenterology : WJG*, v. 17, n. 18, p. 2259–72, 14 maio 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3098394&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 ago. 2011.
27. FRISK, G *et al.* A unifying hypothesis on the development of type 1 diabetes and celiac disease: Gluten consumption may be a shared causative factor. *Medical Hypotheses*, v. 70, n. 6, p. 1207–1209, jan. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18249499>>. Acesso em: 19 fev. 2012.
28. GALATOLA, Martina *et al.* Gene Expression Profile of Peripheral Blood Monocytes: A Step towards the Molecular Diagnosis of Celiac Disease? *PLoS ONE*, v. 8, n. 9, p. e74747, 17 set. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0074747>>.
29. GARNER, Chad *et al.* Genome-wide association study of celiac disease in North America confirms FRMD4B as new celiac locus. *PLoS ONE*, v. 9, n. 7, p. 7–12, 2014.
30. GIBBONS, Deena L. *et al.* Cutting Edge: Regulator of G Protein Signaling-1 Selectively Regulates Gut T Cell Trafficking and Colitic Potential. *The Journal of Immunology*, v. 187, n. 5, p. 2067–2071, 1 set. 2011. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1100833>>.

31. GRECO, Domenico; MAGGIO, Filippo. Selective Immunoglobulin A Deficiency in Type 1 Diabetes Mellitus: A Prevalence Study in Western Sicily (Italy). *Diabetes & Metabolism Journal*, v. 39, n. 2, p. 132, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4411544&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
32. GUANDALINI, Stefano *et al.* Celiaquía. In: FASANO, A. (Org.). *Transtornos asociados con el gluten*. first ed. Baltimore: Wolters Kluwer Health, 2015. p. 07–40.
33. GUTIERREZ-ACHURY, J; COUTINHO DE ALMEIDA, R; WIJMENGA, C. Shared genetics in coeliac disease and other immune-mediated diseases. *Journal of Internal Medicine*, v. 269, n. 6, p. 591–603, jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21401738>>. Acesso em: 12 fev. 2015.
34. HOWSON, J M M *et al.* Confirmation of HLA class II independent type 1 diabetes associations in the major histocompatibility complex including HLA-B and HLA-A. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, v. 11, p. 31–45, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2779837&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 19 fev. 2012.
35. HUNT, K A *et al.* Novel celiac disease genetic determinants related to the immune response. *Nat Genet*, v. 40, n. 4, p. 395–402, 2008. Disponível em: <<http://doi.org/10.1038/ng.102>>.
36. 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, n. 1, p. 136–160, jan. 2012. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005176-900000000-99259>>. Acesso em: 4 jan. 2015.
37. IZZO, Valentina *et al.* Improving the Estimation of Celiac Disease Sibling Risk by Non-HLA Genes. *PLoS ONE*, v. 6, n. 11, p. e26920, 7 nov. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3210127&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 3 jan. 2012.
38. KAHALY, George J; SCHUPPAN, Detlef. Celiac Disease and Endocrine Autoimmunity. *Digestive Diseases*, v. 33, n. 2, p. 155–161, 22 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25925917>>.
39. KARAMANO, Marianna. Milestones in the history of diabetes mellitus: The main contributors. *World Journal of Diabetes*, v. 7, n. 1, p. 1, 2016. Disponível em: <<http://www.wjgnet.com/1948-9358/full/v7/i1/1.htm>>.
40. KEHDY, Fernanda S. G. *et al.* Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 112, n. 28, p. 8696–8701, 14 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.pnas.org/content/112/28/8696>\nhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26124090\nhttp://www.pnas.org/content/112/28/8696.full>.

41. KELLY, Ciarán P. *et al.* Advances in Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology*, v. 148, n. 6, p. 1175–1186, maio 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508515001626>>.
42. KIM, Sangman Michael; MAYASSI, Toufic; JABRI, Bana. Innate immunity: Actuating the gears of celiac disease pathogenesis. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 29, n. 3, p. 425–435, jun. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1521691815000554>>.
43. KIM, Sung Koo. Recent update of autism spectrum disorders. *Korean Journal of Pediatrics*, v. 58, n. 1, p. 8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3345/kjp.2015.58.1.8>>.
44. KOEHLER, Peter; WIESER, Herbert; KONITZER, Katharina. Celiac Disease—A Complex Disorder. *Celiac Disease and Gluten*. [S.l.]: Elsevier, 2014. p. 1–96. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124202207000018>>.
45. KOOY-WINKELAAR, Y. *et al.* Gluten-Specific T Cells Cross-React between HLA-DQ8 and the HLA-DQ2 /DQ8 Transdimer. *The Journal of Immunology*, v. 187, n. 10, p. 5123–5129, 15 nov. 2011. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1101179>>.
46. LAHIRI, D K; NURNBERGER, J I. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research*, v. 19, n. 19, p. 5444, 11 out. 1991. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=328920&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
47. LAUREANO, Alvaro Macedo; SILVEIRA, Themis Reverbel Da. Assessment of the gluten content in gluten-free labeled foods: comparison of two gluten detection methods. *Segurança Alimentar e Nutricional*, v. 17, n. 2, p. 70–77, 2010.
48. LEFFLER, Daniel a *et al.* Larazotide Acetate for Persistent Symptoms of Celiac Disease Despite a Gluten-Free Diet: A Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology*, Accepted Manuscript in 10 February 2015, v. 148, n. 7, p. 1311–1319.e6, 12 jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25683116>>. Acesso em: 20 fev. 2015.
49. LEFFLER, Daniel A.; GREEN, Peter H. R.; FASANO, Alessio. Extraintestinal manifestations of coeliac disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, v. 12, n. 10, p. 561–571, 11 ago. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrgastro.2015.131>>.
50. LIONETTI, Elena *et al.* Celiac disease from a global perspective. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 29, n. 3, p. 365–379, jun. 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S152169181500058X>>.

51. LIONETTI, Elena *et al.* Introduction of Gluten, HLA Status, and the Risk of Celiac Disease in Children. *New England Journal of Medicine*, v. 371, n. 14, p. 1295–1303, 2 out. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25271602>>. Acesso em: 2 out. 2014.
52. LIU, Edwin *et al.* Risk of Pediatric Celiac Disease According to HLA Haplotype and Country. *New England Journal of Medicine*, v. 371, n. 1, p. 42–49, 3 jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24988556>>.
53. LUDVIGSSON, Jonas F *et al.* Screening for celiac disease in the general population and in high-risk groups. *United European Gastroenterology Journal*, v. 3, n. 2, p. 106–120, 1 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4406899&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
54. LUNDIN, Knut E.A.; SOLLID, Ludvig M. Advances in coeliac disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 30, n. 2, p. 154–162, mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24457347>>. Acesso em: 19 jan. 2015.
55. MAHMUD, F. H. *et al.* The Celiac Disease and Diabetes-Dietary Intervention and Evaluation Trial (CD-DIET) protocol: a randomised controlled study to evaluate treatment of asymptomatic coeliac disease in type 1 diabetes. *BMJ Open*, v. 5, n. 5, p. e008097–e008097, 11 maio 2015. Disponível em: <<http://bmjopen.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmjopen-2015-008097>>.
56. MÄKI, Markku. Celiac Disease Treatment. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 59, n. July, p. S15–S17, jul. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24979194>>. Acesso em: 19 fev. 2015.
57. MALAMUT, Georgia; CELLIER, Christophe. Complications of coeliac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 29, n. 3, p. 451–458, jun. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2015.05.005>>.
58. MARINÉ, M. *et al.* The prevalence of coeliac disease is significantly higher in children compared with adults. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v. 33, n. 4, p. 477–486, fev. 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2036.2010.04543.x>>.
59. MARROQUI, L. *et al.* BACH2, a Candidate Risk Gene for Type 1 Diabetes, Regulates Apoptosis in Pancreatic -Cells via JNK1 Modulation and Crosstalk With the Candidate Gene PTPN2. *Diabetes*, v. 63, n. 7, p. 2516–2527, 1 jul. 2014. Disponível em: <<http://diabetes.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/db13-1443>>.
60. MARSH, MN. 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. 330–54, 1992.
61. MOLLAZADEGAN, Kaziwe *et al.* A Population-Based Study of the Risk of Diabetic Retinopathy in Patients With Type 1 Diabetes and Celiac Disease. *Diabetes Care*, v. 36, n. 2, p. 316–321, 1 fev. 2013. Disponível em: <<http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc12-0766>>.

62. MOLLAZADEGAN, Kaziwe *et al.* Risk of renal disease in patients with both type 1 diabetes and coeliac disease. *Diabetologia*, v. 57, n. 7, p. 1339–1345, 25 jul. 2014. Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:000337498700011>.
63. MONSUUR, Alienke J. *et al.* Effective Detection of Human Leukocyte Antigen Risk Alleles in Celiac Disease Using Tag Single Nucleotide Polymorphisms. *PLoS ONE*, v. 3, n. 5, p. e2270, 28 maio 2008. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0002270>>.
64. MONTENEGRO JÚNIOR, Renan *et al.* Diabetes Mellitus- Classificação e Diagnóstico. In: VILAR, LUCIO (Org.). *Endocrinologia Clínica*. 5 ed ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 617–632.
65. MYHR, Courtney B. *et al.* The autoimmune disease-associated SNP rs917997 of IL18RAP controls IFN γ production by PBMC. *Journal of Autoimmunity*, v. 44, n. 9, p. 8–12, ago. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0896841113000759>>.
66. NEJENTSEV, Sergey *et al.* Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature*, v. 450, n. 7171, p. 887–892, 6 dez. 2007. Disponível em: <<http://doi.org/10.1038/nature06406>>.
67. NOKOFF, Natalie; REWERS, Marian. Pathogenesis of type 1 diabetes: lessons from natural history studies of high-risk individuals. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1281, n. 1, p. 1–15, abr. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/nyas.12021>>.
68. OBERHUBER, G; GRANDITSCH, G; VOGELSANG, H. The histopatology of CD: time for standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroeterol Hepatol*, v. 11, p. 1185–94, 1999.
69. PLAZA-IZURIETA, L *et al.* Revisiting genome wide association studies (GWAS) in coeliac disease: replication study in Spanish population and expression analysis of candidate genes. *Journal of Medical Genetics*, v. 48, n. 7, p. 493–496, 1 jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21490378>>. Acesso em: 3 fev. 2012.
70. PLUGIS, Nicholas M; KHOSLA, Chaitan. Therapeutic approaches for celiac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 29, n. 3, p. 503–521, jun. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2015.04.005>>.
71. PRATESI, RICARDO *et al.* Prevalence of Coeliac Disease: Unexplained Age-related Variation in the Same Population. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, v. 38, n. 7, p. 747–750, 8 jan. 2003. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/00365520310003255>>. Acesso em: 19 fev. 2012.
72. RAMOS, Ana Regina L *et al.* Rastreamento de Doença Celíaca em Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 1. *IV Simposio Latinoamericano de Enfermedad Celíaca*. Buenos Aires-Argentina: [s.n.], 2015. . Disponível em: <<http://enfermedadesintestinales2015.com/>>.

73. RICAÑO-PONCE, Isis; WIJMENGA, Cisca; GUTIERREZ-ACHURY, Javier. Genetics of celiac disease. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, v. 29, n. 3, p. 399–412, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26060105>>.
74. ROMANOS, Jihane *et al.* Improving coeliac disease risk prediction by testing non-HLA variants additional to HLA variants. *Gut*, v. 63, n. 3, p. 415–422, 1 mar. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3933173&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
75. ROMERO, Maria del Carmen Calvo. La dieta sin gluten. In: ALLUÉ, ISABEL POLANCO (Org.). *Enfermedad Celíaca Presente y Futuro*. Madrid: Ergon, 2013. p. 121–125.
76. ROYCHOUDHURI, Rahul *et al.* BACH2 represses effector programs to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. *Nature*, v. 498, n. 7455, p. 506–510, 2 jun. 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12199>>.
77. RUBIO-TAPIA, Alberto *et al.* ACG Clinical Guidelines: Diagnosis and Management of Celiac Disease. *The American Journal of Gastroenterology*, v. 108, n. 5, p. 656–676, 23 maio 2013. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ajg.2013.79>>.
78. RUBIO-TAPIA, Alberto; MURRAY, Joseph A. Celiac disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 26, n. 2, p. 116–122, mar. 2010. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00001574-201003000-00007>>.
79. SANZ, Eduardo Arranz; ADRADOS, José Antônio Garrote. Utilidad de los marcadores genéticos. In: ALLUÉ, ISABEL POLLANCO (Org.). *Enfermedad Celíaca presente y futuro*. Madrid: Ergon, 2013. p. 43–46.
80. SCHUPPAN, Detlef; JUNKER, Yvonne; BARISANI, Donatella. Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Gastroenterology*, v. 137, n. 6, p. 1912–1933, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19766641>>. Acesso em: 21 jun. 2011.
81. SIMMONS, Jill H. *et al.* Celiac Autoimmunity in Children with Type 1 Diabetes: A Two-Year Follow-Up. *The Journal of Pediatrics*, v. 158, n. 2, p. 276–281.e1, fev. 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347610006037>>.
82. SMYTH, Deborah J *et al.* Shared and Distinct Genetic Variants in Type 1 Diabetes and Celiac Disease. *New England Journal of Medicine*, v. 359, n. 26, p. 2767–2777, 25 dez. 2008. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0807917>>.

83. SUD, Shama *et al.* Celiac Disease and Pediatric Type 1 Diabetes: Diagnostic and Treatment Dilemmas. *International Journal of Pediatric Endocrinology*, v. 2010, n. 1, p. 161285, 2010. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2905696&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
84. TOMMASINI, Alberto. Ages of celiac disease: From changing environment to improved diagnostics. *World Journal of Gastroenterology*, v. 17, n. 32, p. 3665, 2011. Disponível em: <http://www.wjgnet.com/1007-9327/full/v17/i32/3665.htm>.
85. TÖREL ERGÜR, Ayça *et al.* Celiac Disease and Autoimmune Thyroid Disease in Children with Type 1 Diabetes Mellitus: Clinical and HLA-Genotyping Results-Original Article. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, v. 2, n. 4, p. 151–154, 8 dez. 2010. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3005689&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 19 fev. 2012.
86. TRIOLO, Taylor M. *et al.* Additional Autoimmune Disease Found in 33% of Patients at Type 1 Diabetes Onset. *Diabetes Care*, v. 34, n. 5, p. 1211–1213, 1 maio 2011. Disponível em: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc10-1756>.
87. TRONCONE, Riccardo; DISCEPOLO, Valentina. Celiac Disease and Autoimmunity. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 59, n. July, p. S9–S11, jul. 2014. Disponível em: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005176-201407001-00006>.
88. TRYNKA, Gosia; WIJMENGA, Cisca; VAN HEEL, David A. A genetic perspective on coeliac disease. *Trends in Molecular Medicine*, v. 16, n. 11, p. 537–550, nov. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20947431>. Acesso em: 19 fev. 2012.
89. TSOUKA, Alexandra; MAHMUD, Farid H; MARCON, Margaret A. Celiac Disease Alone and Associated With Type 1 Diabetes Mellitus. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 61, n. 3, p. 297–302, set. 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25806677>.
90. VAARALA, Outi; ATKINSON, Mark a; NEU, Josef. The “Perfect Storm” for Type 1 Diabetes: The Complex Interplay Between Intestinal Microbiota, Gut Permeability, and Mucosal Immunity. *Diabetes*, v. 57, n. 10, p. 2555–2562, 1 out. 2008. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2551660&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Acesso em: 11 jan. 2012.
91. VALERIO, Giuliana *et al.* The influence of gluten free diet on quantitative ultrasound of proximal phalanxes in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus and celiac disease. *Bone*, v. 43, n. 2, p. 322–326, ago. 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18499552>. Acesso em: 19 fev. 2012.

92. VASUDEVA, Kiran *et al.* In vivo and systems biology studies implicate IL-18 as a central mediator in chronic pain. *Journal of Neuroimmunology*, v. 283, p. 43–49, jun. 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jneuroim.2015.04.012>>.
93. VATTA, Serena *et al.* Tag–single nucleotide polymorphism–based human leukocyte antigen genotyping in celiac disease patients from northeastern Italy. *Human Immunology*, v. 72, n. 6, p. 499–502, jun. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2011.03.008>>.
94. VRIEZINGA, Sabine L. *et al.* Randomized Feeding Intervention in Infants at High Risk for Celiac Disease. *New England Journal of Medicine*, v. 371, n. 14, p. 1304–1315, 2 out. 2014. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1404172>>.
95. WAHAB, P. Gluten challenge in borderline gluten-sensitive enteropathy. *The American Journal of Gastroenterology*, v. 96, n. 5, p. 1464–1469, maio 2001. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002927001023759>>.
96. WHITACKER, FCF *et al.* Prevalência e Aspectos Clínicos da Associação de Diabetes Melito Tipo 1 e Doença Celíaca. *Endocrinology And Metabolism*, v. 52, n. 4, p. 635–641, 2008.
97. WIJMENGA, Cisca; GUTIERREZ-ACHURY, Javier. Celiac Disease Genetics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, v. 59, p. S4–S7, jul. 2014. Disponível em: <<http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005176-201407001-00004>>.
98. ZHERNAKOVA, Alexandra *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, 11 jun. 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3032060&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 7 set. 2011.

9 ARTIGOS ORIGINAIS

9.1- Artigo Original 1- Português

Polimorfismos não HLA e características clínicas de pessoas com Diabetes Mellitus I e Doença Celíaca

Marília Dornelles Bastos MD^{1 2}

Luiza Monteavaro Mariath MSc³

Márcia Puñales MD PhD⁴

Balduino Tschiedel MD⁴

Thayne Kolwalski MSc³

Lavínia Schüler-Faccini MD PhD^{1 3 5}

Themis Reverbel da Silveira MD PhD^{1 6}

¹ Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

² Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Brasil

³ Departamento de Genética – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

⁴ Instituto da Criança com Diabetes – Hospital da Criança Conceição, Porto Alegre, Brasil

⁵ Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Brasil

⁶ Hospital da Criança Santo Antônio, Porto Alegre, Brasil

Endereço para Correspondência:

Marília Dornelles Bastos

Telefone: (51)92263336

mdbastos@unisc.br

Os autores declaram que não apresentam conflito de interesse.

Abreviaturas e Siglas:

BACH 2- *BTB domain and CNC homolog 2*

DC - Doença Celíaca

DM1 - Diabetes Mellitus tipo 1

HLA- *Human leukocyte antigen*

ICD- Instituto da Criança com Diabetes

IgA- Immunoglobulina A

IL18 RAP- *Interleukin 18 receptor accessory protein*

IL2/IL21- *Interleukin 2 and 21*

NK- *Natural Killer*

PPG-SCA - Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente

RGS1 - *Regulator of G protein signaling 1*

SNP - *Single Nucleotide Polymorphisms*

Tag-SNP - *Tag single -nucleotide polymorphisms*

TLR - *Toll-like receptors*

TTG-IgA - Transglutaminase Tecidual IgA

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UNISC - Universidade de Santa Cruz do Sul

RESUMO

Objetivos: Comparar a prevalência de cinco polimorfismos não HLA de risco para Diabetes Mellitus tipo1 (DM1) e Doença Celíaca (DC) entre pessoas DM1 com e sem DC, investigar correlação dos genótipos com as características clínicas e com a combinação de haplótipos para DQ2.5 e DQ8.

Métodos: Estudo transversal com avaliações retrospectivas e prospectivas em 312 pessoas com DM1 investigados para DC com transglutaminase IgA (TTG-IgA) e com biópsia duodenal. Foram realizadas genotipagens dos genes *RGS1*, *IL2-IL21*, *BACH2*, *TLR7/TLR8* e *IL18RAP* por *PCR Real-Time* e pesquisa dos haplótipos para HLA-DQ2.5 e DQ8 com a técnica *Tag Single nucleotide polymorphism*.

Resultados: As frequências alélicas e genotípicas foram realizadas em 273 pessoas com TTG-IgA negativo e em 39 pessoas com DC e não apresentaram diferença significativa. A presença de sintoma gastrointestinal foi mais frequente nos portadores dos polimorfismos dos genes *RGS1* e *IL18RAP*. O tempo de aleitamento materno, a idade de introdução do glúten e a idade do diagnóstico da DM1 foram semelhantes. A comparação dos cinco polimorfismos com a combinação dos haplótipos para DQ2.5 e DQ8 não apresentou diferença significativa.

Conclusões: A presença dos polimorfismos dos genes estudados não contribuem para diferenciar as pessoas com DM1 com ou sem DC associada. Observamos uma frequência maior de sintomas gastrointestinais em pessoas com alelos de risco para os polimorfismos nos genes *RGS1* e *IL18RAP*. As diferentes combinações de haplótipos DQ2 e DQ8 não influenciaram os resultados dos polimorfismos nos HLA estudados.

Palavras-chave: Doença Celíaca; Diabetes Mellitus tipo 1; Polimorfismos; *Tag-SNP*; Alelos de risco

DESTAQUES:

- Foram avaliados polimorfismos em genes *RGS1*, *IL2-IL21*, *BACH2*, *TLR7 / TLR8* e *IL18RAP*.
- Os polimorfismos não alteraram a probabilidade de um indivíduo com DM1 desenvolver CD.
- Foi observada interação de *RGS1* e *IL18RAP* com sintomas gastrointestinais.
- HLA DQ2.5 e DQ8 não influenciaram o efeito dos polimorfismos não-HLA.

INTRODUÇÃO

A maior ocorrência de Doença Celíaca (DC) em indivíduos com Diabetes Mellitus tipo 1(DM1) já é conhecida, com prevalências entre 1,6 a 16,4% [1] [2] [3]. A prevalência de DC, no sul do Brasil, é de 5,1% [4]. O principal fator genético de risco é a presença das moléculas de *Human leukocyte antigen* (HLA) classe II [5] [6] [7]. Os alelos HLA-DQ2.5 e DQ8 têm alto valor preditivo negativo, porém aproximadamente 40% da população apresenta um ou ambos alelos [8] [9].

Estudos de associação genômica, *Genome-wide association study* (GWAS), identificaram polimorfismos de susceptibilidade a DC e DM1, sendo a maioria desses loci não HLA envolvidos em rotas de sinalização de células imunes, maturação e diferenciação de células T e quimiocinas [10]. O gene *Regulator of G protein signaling 1*(*RGS1*) atua na ativação e proliferação de células B e no bloqueio dos linfócitos intraepiteliais (LIE) [11]. Os genes relacionados a interleucina 2 e 21(IL2/IL21) atuam como fator de crescimento das células T, na proliferação de células *Natural Killer* (NK), monócitos, macrófagos e na diferenciação de células B [12] [13]. O polimorfismo rs6822844 do gene IL2 foi relacionado com a patogênese da DM1 em um estudo polonês [14]. O gene *BACH2* atua sobre as células T auxiliares (T CD4⁺) e como regulador da resposta de anticorpos desencadeada por infecções virais [15] [12]. Os genes relacionados a *toll-like receptors* (*TLR*), *TLR7/TLR8* estão envolvidos na imunidade inata para a detecção de infecções virais, assim como no reconhecimento de receptores para autoimunidade [16] [12] [17]. O gene, *Interleukin 18 receptor accessory protein* (*IL18RAP*) está envolvido na produção de interferon gama [18] [13]. Sua associação com a suscetibilidade a DC foi observada em estudo italiano, quando comparou com indivíduos sadios[19]

A identificação e comparação de polimorfismos de susceptibilidade entre as duas doenças poderiam auxiliar na compreensão da fisiopatogenia e das suas variabilidades clínicas.

Os objetivos do presente estudo são comparar a presença dos alelos de risco para cinco polimorfismos não HLA entre pessoas com DM1 que apresentam ou não DC; comparar a presença dos alelos de risco dos polimorfismos não HLA com haplótipos HLA DQ2 e DQ8 e avaliar as características clínicas entre os dois grupos, relacionando com a presença ou não dos alelos de risco.

MÉTODOS

Delineamento do estudo e população:

Foi desenvolvido um estudo transversal com avaliações retrospectivas prospectivas no período de agosto de 2012 a outubro de 2014. Foram estudados 312 pessoas, com diagnóstico de DM1 atendidos no Instituto da Criança com Diabetes (ICD) – Hospital da Criança Conceição, localizado na cidade de Porto Alegre, capital do Estado do Rio Grande do Sul – Brasil. As pessoas com DM1 são atendidas desde os 0 aos 21 anos de idade e permanecem em atendimento no ICD até a idade adulta. São avaliados a cada 3 meses, e submetidos à coleta de exames para o controle da diabetes. A partir de 2 anos de idade, é avaliada a presença de anticorpo Transglutaminase Tecidual IgA (TTG-IgA) e de Imunoglobulina A (IgA). As pessoas com sorologia positiva são encaminhados para biopsia duodenal. A confirmação de DC foi feita pela presença de alterações histológicas a partir da classificação de Marsh [20] modificada por Oberhuber e colaboradores [21].

Para a avaliação das características clínicas e dos polimorfismos de risco de DC das pessoas com DM1, após a autorização para participação no estudo, foi preenchido protocolo de pesquisa e coleta de amostra de sangue e/ou saliva. Os resultados dos exames de sorologia e da biópsia duodenal foram obtidos na pesquisa dos prontuários. As informações sobre o protocolo da pesquisa estão disponibilizadas em materiais suplementares.

Foram incluídos no estudo as pessoas com TTG-IgA menor que 9,0U/ml, (DM1 sem DC) e as pessoas com TTG-IgA maior que 16U/ml e biópsia duodenal classificada como maior ou igual 2, pelos critérios de Marsh [20] modificados por Oberhuber [21] (DM1 com DC). Foram excluídos da avaliação as pessoas com valores de TTG-IgA entre 9,0U/ml e 16U/ml e com valores superiores a 16U/ml que não realizaram biópsia duodenal ou que a classificação de Marsh foi menor que 2.

Métodos Laboratoriais:

Extração do DNA: Uma amostra de sangue periférico (10 ml de sangue total com anticoagulante) foi coletada para posterior extração de DNA pelo método de *Salting Out* [22]. Quando impossibilitada a coleta de sangue, uma amostra de saliva foi coletada através do *kit* Oragene (DNA Genotek®) e submetida à extração de DNA de acordo com as instruções do fabricante.

Genotipagem dos Polimorfismos: A técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR *Real Time*) foi realizada para determinação genotípica dos polimorfismos investigados através do ensaio por TaqMan® Genotyping Assays (Applied Biosystems, USA), conforme instruções do fabricante. Os ensaios utilizados no PCR *Real Time* para todos os polimorfismos estavam previamente depositados *no Custom TaqMan Genotyping Assay* (Applied Biosystems) e incluem: C__15810686_10 (rs2816316 A>C de *RGSI*),

C_28983601_10 (rs6822844 G>T de *IL2/IL21*), C__2014214_10 (rs11755527 C>G de *BACH2*), C__11532957_10 (rs5979785 C>T de *TLR7/TLR8*) e C____345197_1_ (rs917997 A>G *IL18RAP*). Os ensaios C_58662585_10 (rs2187668 C>T de *HLA-DQA1*) e C_29817179_10 (rs7454168 C>T de *HLA-DQB1*) foram utilizados para predizer os haplótipos HLA-DQ2.5 e HLA-DQ8, respectivamente.

A análise dos resultados foi realizada através do *StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems)*. A determinação genotípica dos polimorfismos não HLA foi realizada com o auxílio do mesmo software, enquanto a determinação haplotípica de DQ2.5 e DQ8 foi obtida a partir da abordagem de *Tag Single nucleotide polymorphism (Tag-SNP)* [23][24].

Análises Estatísticas:

Características clínicas foram comparadas entre as pessoas com DC e sem DC, ambos com diagnóstico de DM, através dos testes Qui-Quadrado, teste de Fisher, teste de Kruskal-Wallis e ANOVA.

Todos os polimorfismos foram avaliados para o equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, através do teste de Qui-Quadrado. Frequências alélicas e genotípicas foram comparadas entre os grupos, através de Teste de Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher. A presença de alelos de risco nos polimorfismos não HLA foram comparadas de acordo com os haplótipos DQ2.5 e DQ8, utilizando os mesmos testes acima citados. Análises subsequentes avaliaram a influência dos polimorfismos não HLA nas características clínicas das pessoas com DM. Regressão logística binária foi empregada para explorar possíveis interações gene-gene (epistasia) entre polimorfismos que foram associados a(s) mesma(s) variável(is) dependente(s).

Considerações éticas:

O estudo foi aprovado pelo comitê de Ética do Hospital da Criança Conceição e, no momento do preenchimento do protocolo, foi solicitado ao paciente ou a seu responsável a autorização para participação no estudo, mediante a leitura e assinatura do termo de consentimento.

RESULTADOS

A média da idade das 312 pessoas com DM1 foi de 14 ± 5 anos, sendo 170 (54,5%) do sexo masculino. Na tabela 1, estão descritas as características clínicas observadas entre pessoas com DC e sem DC, na qual se verifica média de idade superior e frequência maior de queixas gastrointestinais entre as pessoas com diagnóstico de DC. Não foi observada diferença significativa entre o tempo de aleitamento materno, idade de introdução do glúten na dieta e na idade do diagnóstico da DM1. A dor abdominal foi o sintoma mais relatado, sendo mais prevalente no grupo com DC, seguido de diarreia e constipação. As frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos analisados, a descrição dos alelos de risco para cada gene e a comparação das frequências entre pessoas com e sem DC, encontram-se na tabela 2, em que não foi observada diferença estatisticamente significativa nos cinco genes pesquisados.

A avaliação dos haplótipos para DQ2.5 e DQ8 foi realizada em 264 pessoas com DM1 sem DC e em 32 pessoas com DM1 e DC. Das pessoas com DC 96,9% apresentaram pelo menos um dos alelos e nos sem DC essa frequência foi de 82,6% ($P=0,027$).

A tabela 3 apresenta a comparação entre a presença dos alelos de risco para os polimorfismos não HLA e as combinações dos haplótipos para DQ2.5 e DQ8, na qual não foi verificada diferença significativa. Análises adicionais comparando portadores e não

portadores dos haplótipos de risco DQ2.5 e/ou DQ8 foram realizadas. Novamente, não houve diferenças significativas entre os grupos avaliados (tabela suplementar).

A presença do alelo de risco para o polimorfismo do gene *RGS1* ocorreu em todos as pessoas com queixas gastrointestinais ($p=0,023$). O alelo de risco para o polimorfismo do gene *IL18RAP* ocorreu numa frequência discretamente maior entre as pessoas com queixa gastrointestinal ($p=0,048$). Com os outros polimorfismos não se observou diferença, como está demonstrado na tabela 4. Ao compararmos a presença dos alelos de risco e as queixas gastrointestinais somente entre as pessoas com diagnóstico de DC, se observa que todos as pessoas com sintomas gastrointestinais têm o alelo de risco para o polimorfismo de *RGS1*. Ainda, a proporção de portadores do alelo de risco para o polimorfismo de *IL18RAP* entre as pessoas com sintomas permanece maior, porém não foi possível estabelecer uma correlação estatística. Esses dados estão demonstrados como material suplementar.

DISCUSSÃO

Os estudos de associação genômica (GWAS) descrevem o compartilhamento de pelo menos sete genes entre pessoas com DM1 e DC na busca do melhor entendimento da fisiopatogenia dessas doenças [12]. Comparamos os polimorfismos em cinco genes e não encontramos diferença entre as pessoas com DM1 que apresentavam ou não DC.

Foi observada maior frequência do alelo de risco para o polimorfismo do gene *RGS1* entre as pessoas com sintomas gastrointestinais, independente da condição sorológica do indivíduo. Esse gene está relacionado com a atrofia vilositária através da menor sinalização das células G para o bloqueio do linfócitos intraepiteliais (LIE), sabendo-se que os LIE são essenciais para a indução do dano epitelial causado pelo glúten [11] [25]. Smyth e colaboradores [26] sugerem que existem mecanismos biológicos comuns que causam

intolerância a antígenos da dieta e dano tecidual. A associação desse gene com Esclerose Múltipla, DM1 e DC, que são doenças mediadas por células T, é estudada por Gibbons e colaboradores [27], nesses estudos, os autores concluem que existe uma clara ligação desse gene com a presença de alterações histológicas gastrointestinais. Logo, a participação do gene *RGS1* na fisiopatogenia dessas doenças poderia justificar a maior ocorrência de sintomas gastrointestinais nos portadores desse polimorfismo.

O gene relacionado à *IL18RAP* foi demonstrado por Smyth e colaboradores [26] com uma associação negativa com DM1 e associação positiva com DC. Myhr e colaboradores [18] relacionam tais associações com a produção de Interferon gama e a atividade das células T e das células NK. Alguns autores sugerem que tenha um papel importante nas doenças inflamatórias e como um mediador da dor crônica relacionada com neuropatias periféricas [28] [29]. Tais considerações poderiam explicar a discreta diferença encontrada entre a presença de sintomas gastrointestinais nos portadores do alelo de risco entre as pessoas com DM1, independente de ter ou não DC.

Howson e colaboradores [30] pesquisaram a relação entre a idade do diagnóstico da DM1 em 38 polimorfismos não HLA e identificaram dois *locus* de suscetibilidade nos genes *rs2069763* (*IL2/4q27*) e *rs10509540* (*RNLS/10q23.31*) que estariam relacionados com aumento da idade do diagnóstico, considerando esse achado um fator protetor. A mediana idade do diagnóstico de Diabetes tipo 1 foi semelhante entre as pessoas com e sem DC, não tendo influência dos polimorfismos estudados.

A busca de fatores ambientais que justifiquem a ocorrência da DC em pessoas com predisposição genética vem sendo pesquisada, porém a história alimentar não tem sido confirmada em evidências científicas recentes [31] [32] [33]. Catassi, Gatti e Fasano [34]

relataram aspectos da nova epidemiologia da DC e sugerem a realização de mais estudos para esclarecer o papel do aleitamento materno, da ingestão de glúten e de outros fatores ambientais, considerando haver novas regiões geográficas que apresentam aumento da prevalência da doença. Um estudo de corte realizado recentemente na Espanha acompanhou crianças com HLA DQ2 positivo desde o seu nascimento. Os autores consideraram a introdução do glúten durante o período de aleitamento materno como um fator protetor para DC nesse grupo [35]. No presente estudo, a idade de introdução do glúten na dieta e o tempo de aleitamento materno não demonstraram diferença estatística entre os grupos ou na comparação com a presença dos alelos de risco.

Tsouka, Mahmud e Marcon [6] avaliaram 41 crianças com DC associada a DM e 55 crianças somente com DC e observaram que os casos sintomáticos ocorrem mais entre as pessoas com DC isolada e sugerem que as crianças com DM1 que desenvolvem DC tem um fenótipo mais leve da doença. No Brasil, estudo com crianças e adolescentes com DM1 e Síndrome de Down encontrou pouca associação entre os sintomas e os achados histopatológicos, indicando *screening* nas populações de risco, independente da presença de queixas gastrointestinais [36]. No presente estudo, apesar de haver maior prevalência de sintomas gastrointestinais entre as pessoas com DC, 54,1% deles não apresentavam tais sintomas.

Khatib e colaboradores (2016) descreveram um padrão de apresentação clínica da doença em 165 pessoas com DC, em que a dor abdominal foi o sintoma mais prevalente, seguido de constipação e diarreia. De maneira semelhante, os sintomas descritos pelas pessoas com DC foram dor abdominal em 36,9%, diarreia em 15,8% e constipação em 10,5%. Observamos que 19% das pessoas com DM1 sem DC apresentava dor abdominal. Os sintomas gastrointestinais em pessoas com DM1 podem estar associados a diversos

mecanismos patogênicos como a própria autoimunidade, a inflamação, a hiperglicemia, a dismotilidade e as alterações sensoriais e funcionais [38].

Estudo multicêntrico realizado na Espanha com 39 centros e 974 casos, verifica que, a partir dos 6 anos de idade os casos não clássicos e assintomáticos são prevalentes [39]. No entanto, verificou-se que, apesar da média de idade das pessoas com DC ser de 16 anos, entre as pessoas sintomáticas, prevaleceram sintomas considerados clássicos para a doença.

A maior prevalência dos alelos de risco DQA1*0501 e DQB1* 0201 para DQ2.5 e DQB1*0302 para DQ8 também foi demonstrada por Mergioni e Pizzuti [40], em estudo utilizando a técnica *Tag SNP*. A técnica já foi validada em pessoas com DM1 e DC, sendo considerada eficaz e de menor custo, permitindo a realização de estudos de *screening* populacional [23] [24] [41]. No presente estudo, foi possível confirmar o alto valor preditivo negativo do teste, reforçando sua utilidade na avaliação de pessoas com risco para DC como familiares de pessoas com DC, pessoas com DM1 e outras condições autoimunes e genéticas.

Liu e colaboradores [42] em estudo realizado na Suécia, envolvendo a pesquisa de haplótipos de HLA, em 6403 crianças, concluíram que a presença de homozigotos para DQ2 (DQ2/DQ2) ou heterozigoto para DQ2 e DQ8(DQ2/DQ8) tem maior risco de desenvolver a doença quando comparado com as outras combinações de alelos. Romanos e colaboradores [8] recomendam estudos com a combinação de genes HLA e não HLA para auxiliar no diagnóstico dessas pessoas. O presente estudo realizou a comparação entre as diferentes combinações de alelos e a presença dos polimorfismos não HLA, não encontrando diferença significativa entre os grupos.

A limitação a ser considerada, no presente estudo, é a miscigenação existente no Brasil que dificulta-nos a realização de comparação de polimorfismos com os estudos de outros grupos populacionais específicos.

CONCLUSÃO

A presença dos polimorfismos de risco nos genes não HLA estudados não parece influenciar a ocorrência, ao mesmo tempo, de DM1 e DC. Por outro lado, variações nos genes *RGS1* e *IL18RAP* estão associadas a maior ocorrência de manifestações gastrointestinais e dor nos portadores dessas doenças. Mais ainda, nosso estudo aponta para uma ação independente desses genes e a presença dos haplótipos DQ2.5 e DQ8 na ocorrência concomitante de DM1 e DC.

Agradecimentos: Aos pacientes e seus familiares pela participação no estudo. Ao programa de pós graduação em Saúde da Criança e do Adolescente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). À Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). Aos médicos e funcionários do Instituto da Criança com Diabetes(ICD). Ao laboratório de Análises Clínicas Endocrimeta.

Fontes de financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPG-SCA/UFRGS) e Universidade de Santa Cruz do Sul.

REFERÊNCIAS

1. Pham-Short A, Donaghue KC, Ambler G, et al (2015) Screening for Celiac Disease in Type 1 Diabetes: A Systematic Review. *Pediatrics* 136:e170–e176. doi: 10.1542/peds.2014-2883
2. Elfström P, Sundström J, Ludvigsson JF (2014) Systematic review with meta-analysis: associations between coeliac disease and type 1 diabetes. *Aliment Pharmacol Ther* 40:1123–1132. doi: 10.1111/apt.12973
3. Diniz-Santos D, Machado A, Silva L (2012) Doença Celíaca. In: Carvalho E de, Silva LR, Ferreira CT (eds) *Gastroenterol. e Nutr. em Pediatr.* Manole, São Paulo, pp 359–403
4. Ramos ARL, Pinto RB, Bastos MD, et al (2015) Rastreamento de Doença Celíaca em Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 1. IV Simp. Latinoam. Enferm. Celíaca
5. Kahaly GJ, Schuppan D (2015) Celiac Disease and Endocrine Autoimmunity. *Dig Dis* 33:155–161. doi: 10.1159/000369535
6. Tsouka A, Mahmud FH, Marcon MA (2015) Celiac Disease Alone and Associated With Type 1 Diabetes Mellitus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 61:297–302. doi: 10.1097/MPG.0000000000000789
7. Troncone R, Discepolo V (2014) Celiac Disease and Autoimmunity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 59:S9–S11. doi: 10.1097/01.mpg.0000450394.30780.ea
8. Romanos J, Rosen A, Kumar V, et al (2014) Improving coeliac disease risk prediction by testing non-HLA variants additional to HLA variants. *Gut* 63:415–422. doi: 10.1136/gutjnl-2012-304110
9. Wijmenga C, Gutierrez-Achury J (2014) Celiac Disease Genetics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 59:S4–S7. doi: 10.1097/01.mpg.0000450392.23156.10
10. Gutierrez-Achury J, Coutinho de Almeida R, Wijmenga C (2011) Shared genetics in coeliac disease and other immune-mediated diseases. *J Intern Med* 269:591–603. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02375.x
11. Izzo V, Pinelli M, Tinto N, et al (2011) Improving the Estimation of Celiac Disease Sibling Risk by Non-HLA Genes. *PLoS One* 6:e26920. doi: 10.1371/journal.pone.0026920
12. Trynka G, Wijmenga C, van Heel DA (2010) A genetic perspective on coeliac disease. *Trends Mol Med* 16:537–550. doi: 10.1016/j.molmed.2010.09.003
13. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B (2011) Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 29:493–525. doi: 10.1146/annurev-immunol-040210-092915

14. Fichna M, Zurawek M, Fichna P, et al (2013) Polymorphic variant at the IL2 region is associated with type 1 diabetes and may affect serum levels of interleukin-2. *Mol Biol Rep* 40:6957–6963. doi: 10.1007/s11033-013-2815-9
15. Roychoudhuri R, Hirahara K, Mousavi K, et al (2013) BACH2 represses effector programs to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. *Nature* 498:506–510. doi: 10.1038/nature12199
16. Cooper JD, Walker NM, Smyth DJ, et al (2009) Follow-up of 1715 SNPs from the Wellcome Trust Case Control Consortium genome-wide association study in type I diabetes families. *Genes Immun* 10:S85–S94. doi: 10.1038/gene.2009.97
17. Kim SM, Mayassi T, Jabri B (2015) Innate immunity: Actuating the gears of celiac disease pathogenesis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 29:425–435. doi: 10.1016/j.bpg.2015.05.001
18. Myhr CB, Hulme MA, Wasserfall CH, et al (2013) The autoimmune disease-associated SNP rs917997 of IL18RAP controls IFN γ production by PBMC. *J Autoimmun* 44:8–12. doi: 10.1016/j.jaut.2013.06.001
19. Zupin L, Catamo E, Polesello V, et al (2015) Interleukin-18 gene promoter polymorphisms and celiac disease in Italian patients. *Mol Biol Rep* 42:525–533. doi: 10.1007/s11033-014-3796-z
20. Marsh MN (1992) Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* 102:330–54.
21. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H (1999) The histopathology of CD: time for standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11:1185–94.
22. Lahiri DK, Nurnberger JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
23. Monsuur AJ, de Bakker PIW, Zhernakova A, et al (2008) Effective Detection of Human Leukocyte Antigen Risk Alleles in Celiac Disease Using Tag Single Nucleotide Polymorphisms. *PLoS One* 3:e2270. doi: 10.1371/journal.pone.0002270
24. Brandao L C, Vatta S, Guimaraes R, et al (2010) Rapid genetic screening for major human leukocyte antigen risk haplotypes in patients with type 1 diabetes from Northeastern Brazil. *Hum Immunol* 71:277–280. doi: 10.1016/j.humimm.2009.12.008
25. Galatola M, Izzo V, Cielo D, et al (2013) Gene Expression Profile of Peripheral Blood Monocytes: A Step towards the Molecular Diagnosis of Celiac Disease? *PLoS One* 8:e74747. doi: 10.1371/journal.pone.0074747
26. Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM, et al (2008) Shared and Distinct Genetic Variants in Type 1 Diabetes and Celiac Disease. *N Engl J Med* 359:2767–2777. doi: 10.1056/NEJMoa0807917

27. Gibbons DL, Abeler-Dorner L, Raine T, et al (2011) Cutting Edge: Regulator of G Protein Signaling-1 Selectively Regulates Gut T Cell Trafficking and Colitic Potential. *J Immunol* 187:2067–2071. doi: 10.4049/jimmunol.1100833
28. Vasudeva K, Vodovotz Y, Azhar N, et al (2015) In vivo and systems biology studies implicate IL-18 as a central mediator in chronic pain. *J Neuroimmunol* 283:43–49. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.04.012
29. Motavaf M, Safari S, Alavian SM (2014) Interleukin 18 gene promoter polymorphisms and susceptibility to chronic hepatitis B infection: a review study. *Hepat Mon* 14:e19879. doi: 10.5812/hepatmon.19879
30. Howson JMM, Cooper JD, Smyth DJ, et al (2012) Evidence of Gene-Gene Interaction and Age-at-Diagnosis Effects in Type 1 Diabetes. *Diabetes* 61:3012–3017. doi: 10.2337/db11-1694
31. Ludvigsson JF, Green PHR (2014) The Missing Environmental Factor in Celiac Disease. *N Engl J Med* 371:1341–1343. doi: 10.1056/NEJMe1408011
32. Lionetti E, Castellaneta S, Francavilla R, et al (2014) Introduction of Gluten, HLA Status, and the Risk of Celiac Disease in Children. *N Engl J Med* 371:1295–1303. doi: 10.1056/NEJMoa1400697
33. Vriezinga SL, Auricchio R, Bravi E, et al (2014) Randomized Feeding Intervention in Infants at High Risk for Celiac Disease. *N Engl J Med* 371:1304–1315. doi: 10.1056/NEJMoa1404172
34. Catassi C, Gatti S, Fasano A (2014) The New Epidemiology of Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 59:S7–S9. doi: 10.1097/01.mpg.0000450393.23156.59
35. Cilleruelo ML, Fernández-Fernández S, Jiménez-Jiménez J, et al (2015) Prevalence and Natural History of Celiac Disease in a Cohort of at-Risk Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Epub ahead of print]. doi: 10.1097/MPG.0000000000001007
36. Costa Gomes R, Cerqueira Maia J, Fernando Arrais R, et al (2016) The celiac iceberg: from the clinical spectrum to serology and histopathology in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus and Down syndrome. *Scand J Gastroenterol* 51:178–185. doi: 10.3109/00365521.2015.1079645
37. Khatib M, Baker RD, Ly EK, et al (2016) Presenting Pattern of Pediatric Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 62:60–63. doi: 10.1097/MPG.0000000000000887
38. Rodrigues MLC, Motta MEFA (2012) Mechanisms and factors associated with gastrointestinal symptoms in patients with diabetes mellitus. *J Pediatr (Rio J)* 88:17–24. doi: 10.2223/JPED.2153
39. Cilleruelo ML, Roman-Riechmann E, Sanchez-Valverde F, et al (2014) Spanish National Registry of Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 59:522–526. doi: 10.1097/MPG.0000000000000446

40. Megiorni F, Pizzuti A (2012) HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *J Biomed Sci* 19:88. doi: 10.1186/1423-0127-19-88
41. de Bakker PIW, McVean G, Sabeti PC, et al (2006) A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. *Nat Genet* 38:1166–1172. doi: 10.1038/ng1885
42. Liu E, Lee H-S, Aronsson C a, et al (2014) Risk of Pediatric Celiac Disease According to HLA Haplotype and Country. *N Engl J Med* 371:42–49. doi: 10.1056/NEJMoa1313977

Tabela 1- Comparação das características clínicas das pessoas com DM1

Características:	Diabetes tipo 1 sem Doença Celíaca n=273	Diabetes tipo 1 com Doença Celíaca n=39	Valor P
Média de Idade (anos)	13±5,4	16±6,7	0,006*
Gênero: Masculino n(%)	147(53,8)	23(59)	0,547**
Tempo de aleitamento materno: Mediana em meses (IQ 25-75)	4 (2-6)	4 (2-6)	0,294**
Idade do diagnóstico de DM1: Mediana em anos (IQ 25-75)	7 (4,5-10)	6,5 (4-10,5)	0,999***
Idade de introdução do glúten na dieta: Mediana em meses (IQ 25-75)	6 (6-9)	6 (4-7)	0,145***
Queixa gastrointestinal: n (%)	67 (25,0)	17 (45,9)	0,004**
Tipos de queixas	n (%)	N (%)	
Dor abdominal	51 (19)	14 (36,8)	0,012**
Vômitos	21 (7,8)	2 (5,3)	0,573**
Diarréia	12 (4,5)	6 (15,8)	0,015****
Refluxo	14 (5,2)	2 (5,3)	1,000****
Constipação	9 (3,4)	4 (10,5)	0,063****
Distensão abdominal	3 (1,1)	3 (7,9)	0,005**
Anorexia	1 (0,4)	1 (2,6)	0,233****
Intolerância ao leite	0 (0)	1 (2,6)	0,124****

IQ=Intervalo interquartil; * ANOVA- Comparação múltiplas médias com o teste de Bonferoni; ** Teste Qui quadrado *** Teste de Kruskal-wallis ****Teste de Fischer

Tabela 2: Frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos

Gene (Polimorfismo)	Alelo de risco	Diabetes tipo 1 sem Doença Celíaca n=273					Diabetes tipo 1 com Doença Celíaca n=39					FA	FG
		Frequências alélicas		Frequências genotípicas			Frequências alélicas		Frequências genotípicas			Valor P**	Valor P*
RGS1 (rs2816316)	A	A	C	AA	AC	CC	A	C	AA	AC	CC	0,297	0,666
	n(%)	431(81,6)	97(18,1)	179 (67,8)	73(27,7)	12(4,5)	59(86,8)	9(13,2)	26(75,6)	7(20,6)	1(1,9)		
IL2/IL21 (rs6822844)	G	G	T	GG	GT	TT	G	T	GG	GT	TT	0,697	0,921
	n(%)	465(87,7)	65(12,6)	207(78,1)	51(19,2)	7(2,6)	59(89,4)	7(10,6)	26(78,8)	7(21,2)	0(0)		
BACH2 (rs11755527)	C	C	G	CC	CG	GG	C	G	CC	CG	GG	0,170	0,336
	n(%)	274(52,1)	252(47,9)	64(24,3)	146(55,5)	53(20,2)	38(61,3)	24(38,7)	11(35,5)	16(51,6)	4(12,9)		
TLR7/TLR8 [§] (rs5979785)	T	T	C	TT	TC	CC	T	C	TT	TC	CC		
Masculino	n(%)	101(42,3)	138(57,7)	0(0)	101(73,2)	37(26,8)	14(41,2)	20(58,8)	0(0,0)	14(82,4)	3(17,6)	0,580	0,562
Feminino	n(%)	183(75,6)	59(24,4%)	66(54,5)	51(42,1)	4(3,3)	18(72,0)	7(24,1)	6(46,2)	6(46,2)	1(7,7)	0,663	0,471
IL18RAP (rs917997)	A	A	G	AA	AG	GG	A	G	AA	AG	GG	0,847	0,707
	n(%)	150(28,4)	378(71,6)	27(10,2)	96(36,4)	141(53,4)	18(27,3)	48(72,7)	2(6,1)	14(42,4)	17(51,5)		

§ gene ligado ao X; FA= Frequências alélicas; FG= Frequências genotípicas *Teste Exato de Fischer ** teste de Qui-quadrado

Tabela 3: Polimorfismos não HLA entre as combinações dos haplótipos para DQ2.5 e DQ8

Gene (Polimorfismo)	Alelo de risco ^a	DQ2.5/DQ2.5	DQ2.5/DQX ^b	DQ2.5/DQ8	DQ8/DQ8	Q8/DQX ^b	DQX ^a /DQX ^b	Total	Valor P
RGS1 (rs2816316)	A n(%)	30(10,7)	53(18,9)	76(27,1)	15(5,4)	59(21,1)	47(16,8)	280(100)	0,351*
L2/IL21 (rs6822844)	G n(%)	29(10,1)	55(18,9)	81(28,1)	15(5,2)	62(21,5)	46(16,00)	288(100)	0,089*
BACH2 (rs11755527)	C n(%)	22(9,3)	47(19,9)	73(30,9)	13(5,5)	47(19,9)	34(14,4)	236(100)	0,138*
TLR7/TLR8 (rs5979785)	C n(%)	23(9,6)	48(20,0)	69(28,8)	11(4,6)	52(21,7)	37(15,4)	240(100)	0,790*
IL18RAP (rs917997)	A n(%)	10(7,3)	30(21,9)	36(26,3)	8(5,8)	32(23,4)	21(15,3)	137(100)	0,603**

*Teste Exato de Fischer ** teste de Qui-quadrado ^a Presença do alelo de risco homo ou heterozigoto ^bDQX=ausência dos haplótipos DQ2.5 ou DQ8

Tabela 4: Presença de alelos de risco e sintomas gastrointestinais entre pessoas com DM1

Gene (Polimorfismo)	Presença de sintoma gastrointestinal		Ausência de sintoma gastrointestinal		Valor P	
	n	%	n	%		
RGS1 (rs2816316)	AA [§] /AC	79	100	201	93,9	0,023*
	CC	0	0,0	13	6,1	
IL2/IL21 (rs6822844)	GG [§] /GT	77	96,2	209	98,1	0,387*
	TT	3	3,8	4	1,9	
BACH2 (rs11755527)	CC [§] /CG	62	80,5	173	81,6	0,834**
	GG	15	19,5	39	18,4	
TLR7/TLR8 (rs5979785)	TT [§] /TC	65	84,4	175	84,1	0,954**
	CC	12	15,6	33	15,9	
IL18RAP (rs917997)	AA [§] /AG	44	55,7	91	42,7	0,048*
	GG	35	44,3	122	57,3	

[§]Alelo de risco *Teste exato de Fischer ** Teste de Qui-quadrado

Material Suplementar 1

Protocolo de Pesquisa número: _____

Iniciais do nome: _____ Registro: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ .Sexo: 1- Masculino () 2- Feminino ()

Responsável pelas informações: 1- () pai 2- () mãe 3- () paciente 4- () outro-
especificar:

5-História alimentar:

Tempo de aleitamento materno exclusivo: _____ meses. () Não realizou () Não sabe

Introdução de fórmulas: _____ meses. () Não realizou () Não sabe

Introdução de leite de vaca: _____ meses. () Não realizou () Não sabe

Introdução de alimentos com glúten : _____ meses . () Não sabe

6-Idade do diagnóstico da Diabetes (anos e meses):**9-Tem alguma queixa persistente de sintoma gastrointestinal?**

() -Dor abdominal, () Diarréia () Vômitos () Constipação () Distensão abdominal () Anorexia () _____

() -Não

Resultado dos exames:

Transglutaminase IgA (U/ml): _____

IGA Total: _____

Biópsia duodenal (*Classificação de Marsh*):

Material suplementar 2

Presença de alelos de risco e sintomas gastrointestinais entre pessoas com DM1 e DC

Polimorfismo (Gene)		Presença de sintoma gastrointestinal		Ausência de sintoma gastrointestinal		Valor P
<i>RGS1</i> (<i>rs2816316</i>)	A§	n	%	n	%	1,000*
	C	15	100	18	94,7	
		0	0	1	5,3	
<i>IL2/IL21</i> (<i>rs6822844</i>)	G§	n	%	n	%	NA
	T	15	100	18	100	
		0	0	0	0	
<i>BACH2</i> (<i>rs11755527</i>)	C§	n	%	N	%	1,000*
	G	11	84,6	16	88,9	
		2	15,4	2	11,1	
<i>TLR7/TLR8</i> (<i>rs5979785</i>)	T§	n	%	N	%	0,602*
	C	13	92,9	13	81,2	
		1	7,1	3	18,8	
<i>IL18RAP</i> (<i>rs917997</i>)	A§	n	%	N	%	0,227**
	G	9	60	7	38,9	
		6	40	11	61,1	

§Alelo de risco * Teste de Fischer ** teste de Qui-quadrado NA= não avaliado

Material suplementar 3

Polimorfismos não HLA e combinações de haplótipos para DQ2.5 e/ou DQ8

Polimorfismo (<i>Gene</i>)	Alelo de risco	DQ2.5 e/ou DQ8	DQX ^a /DQX ^a	Total	Valor p
RGS1 (<i>rs2816316</i>)	A n(%)	233(83,2)	47(16,8)	280(100)	0,235
L2/IL21 (<i>rs6822844</i>)	G n(%)	242(84,0)	46(16,00)	288(100)	0,595
BACH2 (<i>rs11755527</i>)	C n(%)	202(85,6)	34(14,4)	236(100)	0,217
TLR7/TLR8 (<i>rs5979785</i>)	C n(%)	203(84,6)	37(15,4)	240(100)	0,507
IL18RAP (<i>rs917997</i>)	A n(%)	116(84,7)	21(15,3)	137(100)	0,874

*Teste Exato de Fischer ** teste de Qui-quadrado

^aDQX=ausência dos haplótipos DQ2.5 ou DQ8

9.2-Artigo Original 2- Português

Frequência de alelos para DQ2.5 e DQ8 com a técnica *Tag-single-nucleotide polymorphism* em pessoas com Diabetes tipo 1 e com Doença Celíaca em uma população do sul do Brasil

Autores:

Marília Dornelles Bastos MD^{1 2}

Thayne Kolwalski MSc³

Márcia Puñales MD PhD⁴

Balduino Tschiedel MD⁴

Luiza Monteavaro Mariath MSc³

Ana Luiza Guedes Pires MD PhD¹

Lavínia Schüller-Faccini MD PhD^{1 35}

Themis Reverbel da Silveira MD PhD^{1 6}

¹ Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

² Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, Brasil

³ Departamento de Genética – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil

⁴ Instituto da Criança com Diabetes – Hospital da Criança Conceição, Porto Alegre, Brasil

⁵Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Brasil

⁶Hospital da Criança Santo Antônio, Porto Alegre, Brasil

Endereço para Correspondência:

Marília Dornelles Bastos

Telefone: (51)92263336

mbastos@unisc.br

Os autores declaram que não apresentam conflito de interesse.

Resumo:

O objetivo do estudo foi avaliar a frequência dos alelos para DQ2.5 e para DQ8 com técnica *Tag-single-nucleotide polymorphism (Tag-SNP)* em pessoas com Diabetes tipo I (DM1) e com Doença Celíaca (DC) do sul do Brasil. Foram avaliados 363 indivíduos distribuídos em pessoas com DM1 sem DC (264); com DM1 e DC (32) e com DC sem DM1(66). Em 97% dos pessoas com DM1 e DC e em 76% dos com DC sem DM1 foi identificado alelos DQ2.5 e/ou DQ8 respectivamente. DQ2.5 foi mais frequente entre pessoas com DC e DQ8 foi mais frequentes entre pessoas com DM1. A prevalência de 24,2% de pessoas com DC sem DM1 com ausência de alelos DQ2.5 e DQ8 pode ser explicada pela ancestralidade europeia existente na região pesquisada, onde se tem uma frequência aumentada de outros alelos de risco em pessoas com a doença. Concluímos haver um alto valor preditivo negativo para DC entre pessoas com DM1 quando pesquisamos com a técnica de *Tag-SNP*, porém a alta frequência de indivíduos com alelo DQ8 entre os diabéticos não permite diferenciar quem são os de maior risco para DC. Para uma maior sensibilidade e especificidade dos testes em pessoas do sul e sudeste do Brasil, recomendamos a inclusão dos alelos DQ2.2 e DQ7.

Palavras chaves: Diabetes tipo 1; Doença Celíaca; *Tag SNP*; HLA

Lista de Abreviaturas e Siglas:

ACELBRA-RS - Associação dos Celíacos do Brasil-Rio Grande do Sul

DC - Doença Celíaca

DM1 - Diabetes Mellitus tipo 1

HLA - *Human leukocyte antigen*

ICD - Instituto da Criança com Diabetes

IgA - Imunoglobulina A

PCR - *polymerase chain reaction*

PPG-SCA- Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente

SBT - *Sequence based typing*

SSO - *Sequence-specific probes*

SSP - *Sequence-specific primers*

Tag-SNP -*Tag-single-nucleotide polymorphism*

TTG - Transglutaminase tecidual

UFRGS -Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UNISC - Universidade de Santa Cruz do Sul

1 Introdução:

A Doença Celíaca (DC) é uma enteropatia crônica e permanente provocada por uma intolerância às proteínas do glúten do trigo, centeio, cevada em sujeitos geneticamente predispostos [1]. A base imunológica da DC resulta de um desequilíbrio do sistema imunológico inato e adaptativo. Nessas condições, a gliadina (principal componente tóxico do glúten) atravessa o epitélio intestinal, ativando o sistema imune adaptativo e determinando aumento da permeabilidade intestinal. Os peptídeos contidos no glúten atravessam a lâmina própria, onde podem ser deamidados pela enzima transglutaminase tecidual (TTG). Tais peptídeos são apresentados pelas moléculas HLA classe II (DQ2 e DQ8) que promovem a ativação das células efectoras da inflamação tecidual vista na DC: linfócitos T CD4 helper [2]. Os alelos HLA-DQA1*05 e DQB1*02 tem alto valor preditivo negativo, porém aproximadamente 40% da população apresenta um ou ambos os alelos [3] [4].

Existe uma grande variação na prevalência da DC em diferentes países. Na Europa e nos Estados Unidos, a prevalência varia entre 1 e 3% na população geral [5]. As prevalências de DC, comprovada por biópsia, em estudos realizados no Brasil, até o momento, demonstram uma variação de 0,15 a 1,94% [6].

Indivíduos com DM1 apresentam uma prevalência maior de DC. Uma revisão sistemática recente descreveu prevalências entre 1,6 e 16,4% de DC entre indivíduos com DM1, recomendando *screening* a partir dos dois anos de idade nessa população [7]. A prevalência de DC em indivíduos com DM1 do presente estudo é de 5,1% [8].

Os genes HLA, exercem um papel importante em doenças autoimunes como DC e DM1, sendo a sua identificação nas pessoas com tais doenças muito importante para a compreensão de aspectos de suscetibilidade, assim como para a compreensão de diferentes

apresentações clínicas. As genotipagens são realizadas por métodos baseados em reação de cadeia de polimerase- *Polymerase Chain Reaction (PCR)* com *Sequence-Specific Probes (SSO)*, com *Sequence Specific Primers (SSP)* ou *Sequence Based Typing (SBT)*. Porém, essas técnicas consideradas tradicionais para genotipagem envolvem muitas reações tornando-as complexas e de com alto custo. Monsuur e colaboradores [9] validaram uma técnica usando *Tag single nucleotide polymorphisms (Tag SNP)*, permitindo a realização dos testes com alta sensibilidade e especificidade, com um custo menor.

O sistema HLA é bastante polimórfico e apresenta uma variabilidade entre diferentes áreas geográficas e etnias. O Brasil é um país com grande miscigenação e com grande variação racial entre as regiões. Estudo recente identificou uma ancestralidade africana em 50% da população do nordeste e 70% de ancestralidade europeia no sul e sudeste do país [10]. Não existem estudos relativos a pesquisa dos genes HLA DQ2 e DQ8 entre indivíduos com DC e DM1 no Rio Grande do Sul.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência dos alelos para DQ2.5 e para DQ8 com técnica *Tag SNP* em pessoas com DM1 e com DC, em uma população do sul do Brasil.

2 Métodos:

2.1 Delineamento do estudo e população:

Delineamento prospectivo desenvolvido no período de agosto de 2012 a outubro de 2014, envolvendo pessoas com diagnóstico de DM1, atendidos no Instituto da Criança com Diabetes (ICD) – Hospital da Criança Conceição, localizado na cidade de Porto Alegre, capital do Estado do Rio Grande do Sul (RS) – Brasil e pessoas com diagnóstico de DC,

confirmado por biópsia duodenal, residentes da cidade de Porto Alegre, RS – Brasil, que participam da Associação dos Celíacos do Brasil – Rio Grande do Sul (ACELBRA-RS).

Das pessoas com DM1, no dia que realizam avaliação periódica para controle da Diabetes, após a autorização para participar do estudo, foi coletada amostra de sangue e/ou saliva. Entre essas pessoas, identificou-se os que apresentavam TTG-IgA menor que 9,0 U/ml e as pessoas com TTG-IgA maior que 16U/ml e biópsia duodenal classificada como maior ou igual 2, pelos critérios de Marsh [11] modificados por Oberhuber [12]. Foram excluídas da avaliação as pessoas: com valores de TTG-IgA entre 9,0 U/ml e 16 U/ml; valores de TTG-IgA superiores a 16 U/ml que não realizaram biópsia duodenal ou que a classificação de Marsh foi menor que 2.

Das pessoas com diagnóstico de DC, foi solicitada autorização para participar do estudo durante evento promovido pela ACELBRA-RS. Foi coletada amostra de saliva e realizada entrevista para identificar aqueles que tinham o diagnóstico confirmado por biópsia. Foram excluídos da avaliação, as pessoas que não realizaram biópsia duodenal ou que o diagnóstico era duvidoso.

2.2 Métodos Laboratoriais:

2.2.1 Extração de DNA: Uma amostra de sangue periférico (10 mL de sangue total com anticoagulante) foi coletada para posterior extração de DNA pelo método de *Salting Out* [13]. Quando impossibilitada a coleta de sangue, uma amostra de saliva foi coletada através do *kit* Oragene (DNA Genotek®) e submetida à extração de DNA de acordo com as instruções do fabricante.

2.2.2 Determinação Haplotípica de HLA-DQ2.5 e -DQ8: A predição dos haplótipos de HLA-DQ2.5 e HLA-DQ8 foi realizada a partir da abordagem de *Tag Single nucleotide polymorphism (Tag-SNP)* [9,14]. A Técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (*PCR Real Time*) foi realizada através do ensaio por *TaqMan® Genotyping Assays (Applied Biosystems, USA)*, conforme instruções do fabricante. Os ensaios utilizados estavam previamente depositados no *Custom TaqMan Genotyping Assay (Applied Biosystems)* e incluíram: C_58662585_10 (rs2187668 C>T de *HLA-DQA1*) e C_29817179_10 (rs7454168 C>T de *HLA-DQB1*). A análise dos resultados e a determinação *genotípica dos polimorfismos* foi realizada através do *StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems)*. Os haplótipos de DQ2.5 e DQ8 foram preditos a partir dos genótipos identificados, conforme descrito por Monsuur e colaboradores [9] e Brandao e colaboradores ([14]).

2.3 Análises Estatísticas:

As análises estatísticas foram realizadas no *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)* v.20. Os testes de Qui-Quadrado ou Teste Exato de Fisher foram utilizados para comparar as frequências dos haplótipos HLA-DQ2.5 e DQ8 entre os grupos com DM1, com DC e com ambos (DM1+DC), sendo considerados significativos os valores P menores que 0,05.

2.4 Considerações éticas:

O estudo foi aprovado pelos comitês de ética do Hospital da Criança Conceição e da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. No momento do preenchimento do protocolo, foi solicitado ao paciente ou a seu responsável a autorização para participação no estudo, mediante a leitura e assinatura do termo de consentimento.

3 Resultados:

Foram avaliados 363 indivíduos, distribuídos em 3 grupos: pessoas com DM1 e anticorpos negativos para DC (grupo 1= 264 indivíduos), pessoas com DM1 e com diagnóstico de DC (grupo 2= 32 indivíduos) e pessoas com DC sem o diagnóstico de DM1 (grupo 3= 66 indivíduos).

A tabela 1 apresenta a distribuição dos haplótipos combinados de DQ2.5 e DQ8 nos 3 grupos, na qual se verifica a presença de pelo menos um alelo DQ2.5 ou DQ8 em 97% das pessoas do grupo com DM1 e DC (grupo 2) e em 76% indivíduos com DC sem o diagnóstico de DM1 (grupo 3).

A presença dos alelos de DQ2.5 ocorreu em 170 (57,4%) indivíduos com DM1 (Grupos 1 e 2), sendo mais frequente no grupo com diagnóstico de DC (grupo 2). A presença dos alelos de DQ8 ocorreu em 160 (54,1%) indivíduos com DM1, sendo que não houve diferença entre os grupos com ou sem DC (tabela 2).

Quando comparamos as pessoas com DM1 e com diagnóstico de DC (grupo 2) com as pessoas com DC sem o diagnóstico de DM1 (grupo 3) não se observou diferença significativa entre os grupos para os alelos de DQ2. Porém, as pessoas do grupo 2 têm uma frequência significativamente maior do alelo DQ8 (tabela 3).

A tabela 4 demonstra a comparação entre as pessoas com DM1 e sorologia negativa para DC (grupo 1) e as com diagnóstico de DC, independentemente de ter DM1 (grupos 2 e 3). Observamos que a presença do alelo DQ2.5 ocorre com maior prevalência em todos os grupos enquanto que o alelo DQ8 foi mais prevalente somente no grupo que tem DM1.

4 Discussão:

Nosso estudo teve o propósito de avaliar a distribuição de HLA DQ2.5 e DQ8 em pessoas com DM1 e pessoas com DC em uma população do sul do Brasil, onde foi possível confirmar o alto valor preditivo negativo do teste no grupo com DM1. Mergioni e Pizzuti [15], em revisão sobre as implicações práticas da identificação dos alelos de risco HLA em pessoas com DC, reafirmam a importância dos testes negativos como um valor mais significativo. A realização das genotipagens utilizando a técnica *Tag SNP* já foi validada em pessoas com DM1 e DC, sendo considerada eficaz e de menor custo, permitindo a realização de estudos de *screening* populacional [9] [16] [17]. Brandão e colaboradores [14] utilizaram a mesma técnica em pessoas do nordeste do Brasil e observaram maior risco de desenvolver DM1 com a combinação DQ2.5 e DQ8. Estudo realizado na Itália, em 1005 pacientes com DC, verificou a genotipagem dos haplótipos DQ2.5, DQ8, DQ2.2 e DQ7, comparou com a técnica tradicional por *PCR-SSP*, e obteve uma alta sensibilidade e especificidade, recomendando-a para realização em *screening* populacionais e sugerindo estudos em outros grupos populacionais [18].

Mergioni e colaboradores [19] estabeleceram um gradiente de risco para DC a partir do HLA DQ e também definiram como maior risco a combinação dos haplótipos DQ2 e DQ8. Verificamos que 27% das pessoas com DM1 (grupo 1) e 31% das pessoas com DM1 e DC (grupo 2) apresentavam essa combinação de haplótipos, enquanto que, no grupo com DC sem DM1 (Grupo 3), os haplótipos concomitantes ocorreram em 7,6%, havendo nesse grupo uma frequência maior de indivíduos apenas com alelos DQ2.5.

Pessoas com DM1, em qualquer idade, têm um maior risco de DC, porém pelo fato de ambas as doenças serem associadas aos genótipos HLA DQ, nem sempre a pesquisa de HLA

DQ2 e DQ8 é útil para identificação dos grupos predispostos [20]. A diferença na frequência dos alelos DQ8, verificada na tabela 4, confirma essa dificuldade encontrada na procura de alelos de risco para DC nos três grupos estudados. Verificamos que os alelos para DQ2.5 foram mais prevalentes entre as pessoas com DC, porém os alelos DQ8 são mais frequentes nas pessoas com DM1, não sendo possível diferenciar entre o grupo com e sem DC.

Apesar de observarmos um alto valor preditivo negativo entre as pessoas com DM1 e DC identificou-se 24% que não apresentaram os haplótipos para DQ2.5 e DQ8 no grupo com DC sem DM1. Karel e colaboradores [21] avaliaram populações de diferentes países da Europa e pesquisaram os haplótipos DQA1*05 e DQB1*02 para DQ2 e DQA1*03 DQB1*0302 para DQ8 e verificaram uma distribuição heterogênea com uma prevalência maior DQ2 e DQ8 negativos na Itália, quando comparado com a França, Finlândia ou Inglaterra. Koskinen e colaboradores [22] avaliaram haplótipos de risco para DC em 3 países e identificaram no grupo de pacientes italianos a presença dos alelos para DQ2.2 (DQB1*0202 e DQA1*0201) e DQ7 (DQB1*0301) em 27% e 18% respectivamente. Kotze e colaboradores [23], em estudo realizado no sul do Brasil, encontraram uma frequência de 8,9% de indivíduos com DC com alelos DQ2 e/ou DQ8 negativos, e alertaram para a alta miscigenação de raças existente no país. Considerando que o presente estudo foi realizado em uma região do Brasil com alta prevalência de imigrantes italianos e lembrando da maior ancestralidade europeia verificada no sul e sudeste do país [10], a possibilidade de termos uma ocorrência aumentada de outros alelos de risco DQ, diferentes de DQ2.5, deve ser considerada. A pesquisa dos alelos DQA1*0501 e DQB1*0201 permitiu-nos identificar as pessoas DQ2.5, mas não identificamos as pessoas DQ2.2 e DQ7.

5-Conclusões:

A pesquisa dos alelos DQ2.5 e DQ8 pela técnica descrita permite atingir um alto valor preditivo negativo no diagnóstico de DC na população com DM1, semelhante ao descrito na literatura com a técnica convencional.

Observamos uma alta frequência do alelo para DQ8 entre indivíduos com DM1 quando comparados com indivíduos com DC sem DM1. Logo, a presença desse alelo em pessoas com DM1 não indica maior risco de DC na população estudada.

Considerando a miscigenação da população existente no Brasil, recomendamos a inclusão da pesquisa dos alelos para DQ2.2 e DQ7 nas regiões sul e sudeste do Brasil, com o objetivo aumentar a sensibilidade e a especificidade da investigação de risco para DC.

Agradecimentos: : Aos pacientes e seus familiares pela participação no estudo. Ao programa de pós graduação em Saúde da Criança e do Adolescente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). À Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC). Aos médicos e funcionários do Instituto da Criança com Diabetes(ICD). À Associação dos Celíacos do Brasil- RS(ACELBRA-RS). Ao laboratório de Análises Clínicas Endocrimeta.

Fontes de financiamento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PPG-SCA/UFRGS) e Universidade de Santa Cruz do Sul.

6-Referências

- [1] D. Schuppan, Y. Junker, D. Barisani, Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies, *Gastroenterology*. 137 (2009) 1912–1933. doi:10.1053/j.gastro.2009.09.008.
- [2] A. Rubio-Tapia, J.A. Murray, Celiac disease, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26 (2010) 116–122. doi:10.1097/MOG.0b013e3283365263.
- [3] J. Romanos, A. Rosen, V. Kumar, G. Trynka, L. Franke, A. Szperl, et al., Improving coeliac disease risk prediction by testing non-HLA variants additional to HLA variants, *Gut*. 63 (2014) 415–422. doi:10.1136/gutjnl-2012-304110.
- [4] C. Wijmenga, J. Gutierrez-Achury, Celiac Disease Genetics, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 59 (2014) S4–S7. doi:10.1097/01.mpg.0000450392.23156.10.
- [5] J. Gutierrez-Achury, R. Coutinho de Almeida, C. Wijmenga, Shared genetics in coeliac disease and other immune-mediated diseases, *J. Intern. Med.* 269 (2011) 591–603. doi:10.1111/j.1365-2796.2011.02375.x.
- [6] D.R. Diniz-Santos, Doença Celíaca em crianças e adolescentes com diabetes mellitus tipo1 Salvador, Bahia., Tese (Doutorado)- Programa de pós-graduação em Medicina e Saúde. Universidade Federal da Bahia, 2010.
- [7] K.C. Donaghue, G. Ambler, H. Phelan, S. Twigg, M.E. Craig, Screening for Celiac Disease in Type 1 Diabetes: A Systematic Review, *Pediatrics*. 136 (2015) e170–e176. doi:10.1542/peds.2014-2883.
- [8] A.R.L. Ramos, R.B. Pinto, M.D. Bastos, V. Provenzi, C. Geremia, M.A. Soledade, et al., Rastreamento de Doença Celíaca em Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 1, in: IV Simp. Latinoam. Enferm. Celíaca, Buenos Aires-Argentina, 2015. <http://enfermedadesintestinales2015.com/>.

- [9] A.J. Monsuur, P.I.W. de Bakker, A. Zhernakova, D. Pinto, W. Verduijn, J. Romanos, et al., Effective Detection of Human Leukocyte Antigen Risk Alleles in Celiac Disease Using Tag Single Nucleotide Polymorphisms, *PLoS ONE*. 3 (2008) e2270. doi:10.1371/journal.pone.0002270.
- [10] F.S.G. Kehdy, M.H. Gouveia, M. Machado, W.C.S. Magalhães, A.R. Horimoto, B.L. Horta, et al., Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) 8696–8701. doi:10.1073/pnas.1504447112.
- [11] M. Marsh, Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine: a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (“celiac sprue”), *Gastroenterology*. 102 (1992) 330–54.
- [12] G. Oberhuber, G. Granditsch, H. Vogelsang, The histopathology of CD: time for standardized report scheme for pathologists., *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 11 (1999) 1185–94.
- [13] D.K. Lahiri, J.I. Nurnberger, A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies., *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 5444. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=328920&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [14] Brandao L C, S. Vatta, R. Guimaraes, L. Segat, J. Araujo, J.L. De Lima Filho, et al., Rapid genetic screening for major human leukocyte antigen risk haplotypes in patients with type 1 diabetes from Northeastern Brazil, *Hum. Immunol.* 71 (2010) 277–280. doi:10.1016/j.humimm.2009.12.008.

- [15] F. Megiorni, A. Pizzuti, HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing, *J. Biomed. Sci.* 19 (2012) 88. doi:10.1186/1423-0127-19-88.
- [16] E.H. Lavant, D.J. Agardh, A. Nilsson, J.A. Carlson, A new PCR-SSP method for HLA DR-DQ risk assessment for celiac disease, *Clin. Chim. Acta.* 412 (2011) 782–784. doi:10.1016/j.cca.2010.12.033.
- [17] P.I.W. de Bakker, G. McVean, P.C. Sabeti, M.M. Miretti, T. Green, J. Marchini, et al., A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC, *Nat. Genet.* 38 (2006) 1166–1172. doi:10.1038/ng1885.
- [18] S. Vatta, A. Fabris, L. Segat, T. Not, S. Crovella, Tag–single nucleotide polymorphism–based human leukocyte antigen genotyping in celiac disease patients from northeastern Italy, *Hum. Immunol.* 72 (2011) 499–502. doi:10.1016/j.humimm.2011.03.008.
- [19] F. Megiorni, B. Mora, M. Bonamico, M. Barbato, R. Nenna, G. Maiella, et al., HLA-DQ and risk gradient for celiac disease., *Hum. Immunol.* 70 (2009) 55–9. doi:10.1016/j.humimm.2008.10.018.
- [20] I.R. Korponay-Szabó, R. Troncone, V. Discepolo, Adaptive diagnosis of coeliac disease, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 29 (2015) 381–398. doi:10.1016/j.bpg.2015.05.003.
- [21] K. Karell, A.S. Louka, S.J. Moodie, H. Ascher, F. Clot, L. Greco, 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, *Hum. Immunol.* 64 (2003) 469–477. doi:10.1016/S0198-8859(03)00027-2.

- [22] L. Koskinen, J. Romanos, K. Kaukinen, K. Mustalahti, I. Korponay-Szabo, D. Barisani, et al., Cost-effective HLA typing with tagging SNPs predicts celiac disease risk haplotypes in the Finnish, Hungarian, and Italian populations., *Immunogenetics*. 61 (2009) 247–56. doi:10.1007/s00251-009-0361-3.
- [23] L.M. da S. Kotze, R. Nisihara, S.R. da R. Utiyama, L.R. Kotze, Letters to the Editor, *Rev. Esp. Enfermedades Dig.* 106 (2014) 561–562.

Tabela 1- Distribuição dos haplótipos combinados de DQ2.5 e DQ8.

Haplótipos HLA	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
	DM1 sem DC	DM1 com DC	DC sem DM!
	n(%)	n(%)	n(%)
DQ2.5/DQ2.5	23(8,7)	7(21,9)	9(13,6)
DQ2.5/DQX ^a	50(18,9)	9(28,1)	28(42,4)
DQ2.5/DQ8	71(26,9)	10(31,3)	5(7,6)
DQ8/DQ8	16(6,1)	0(0,0)	1(1,5)
DQ8/DQX ^a	58(22,0)	5(15,5)	7(10,6)
DQX ^a /DQX ^a	46(17,4)	1(3,1)	16(24,2)
Total	264(100)	32(100)	66(100)

n=número de indivíduos analisados ^aDQX= Haplótipos não DQ2.5 ou DQ8

P<0,001

Tabela 2- Presença dos alelos de DQ2.5 e DQ8 entre as pessoas com DM1

HLA	Grupo 1 DM1 sem DC n(%)	Grupo 2 DM1 com DC n(%)	P
DQX ^a	120 (45,5)	6 (18,8)	0,004
DQ2.5	144 (54,5)	26 (81,2)	
DQX ^a	119(45,1)	17 (53,1%)	0,388
DQ8	145 (54,9)	15(46,9%)	

n=número de indivíduos analisados ^aDQX= Haplótipos não DQ2.5 ou DQ8

Tabela 3- Presença dos alelos de DQ2.5 e DQ8 entre as pessoas com DM1e DC e entre pessoas com DC sem DM1

HLA	Grupo 2 DM1 com DC n(%)	Grupo 3 DC sem DM1 n(%)	P
DQX ^a	6(18,8)	24(36,4)	0,102
DQ2.5	26(81,2)	42(63,6)	
DQX ^a	17(53,1)	53(80,3%)	0,008
DQ8	15(46,9)	13(19,7%)	

n=número de indivíduos analisados ^a DQX= Haplótipos não DQ2.5 ou DQ8

Tabela 4- Presença dos alelos de DQ2.5 e DQ8 entre as pessoas com DM1sem DC e entre as pessoas com DC independente de ter DM1

HLA	Grupo 1 DM1 sem DC n(%)	Grupos 2 e 3 DC n(%)	P
DQX ^a	120(45,5)	30(30,6)	0,011
DQ2.5	144(54,5)	68(69,4)	
DQX ^a	119(45,1)	70(71,4)	<0,001
DQ8	145(54,9)	28(28,6)	

n=número de indivíduos analisados ^a DQX= Haplótipos não DQ2.5 ou DQ8

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

10 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação de pessoas com sorologia positiva para DC em um grupo com DM1, independente de haver confirmação da DC por biópsia, permite identificar aqueles considerados com DC potencial na nomenclatura adotada pela ESPGHAN (HUSBY *et al.*, 2012). A valorização das características clínicas e genéticas desse grupo de pessoas é importante para encontrar fatores que possam prever sua transição para a “ponta do Iceberg”, como é tradicionalmente comparado na literatura. Espera-se que, a partir de avaliações como essa, seja possível encontrar formas de prevenção para essa transição. No presente estudo, os polimorfismos não HLA estudados não apresentaram diferença significativa tanto entre as pessoas com sorologia positiva sem confirmação como nas pessoas com DC.

Freeman e colaboradores (FREEMAN *et al.*, 2011) encontraram uma prevalência de DC no sexo feminino na maioria dos estudos revisados e relaciona esse fato com a maior frequência de haplótipos HLA DQ2/DQ8 entre mulheres e ao fato das mulheres procurarem mais por atendimento médico para realização do diagnóstico. Revisão sistemática realizada por Elfström e colaboradores (ELFSTRÖM; SUNDSTRÖM; LUDVIGSSON, 2014) verificaram uma prevalência no sexo feminino entre 42% a 59% em revisão de estudos similares. Pesquisa realizada no Brasil, avaliando a prevalência de DC com pacientes com DM1 e Síndrome de Down, verificou uma prevalência do sexo feminino em 54,3% dos indivíduos (COSTA GOMES *et al.*, 2016). Porém, no presente estudo, se verificou uma prevalência do sexo masculino na amostra em geral, independente de apresentar ou não DC.

Estudo multicêntrico realizado na Itália, avaliando DC potencial na DM1 relatou uma prevalência de sintomas em 18,4% dos indivíduos com sorologia positiva para DC, sendo a dor abdominal o mais prevalente (FRANZESE *et al.*, 2011). No presente estudo, verificou-se uma prevalência 45% de sintomas gastrointestinais entre as pessoas com DC, mas 25% das

peessoas com DM1 sem DC também relataram sintomas e em ambos os grupos a dor abdominal foi a queixa mais relatada. A presença de sintomas gastrointestinais na DM1 pode ser atribuída a neuropatia periférica que ocorre nesses pacientes, sendo portanto um achado clínico que não auxilia na identificação das pessoas com maior ou menor predisposição a DC (DREWES, 2016).

O fato de todas as pessoas com queixa gastrointestinal apresentarem o polimorfismo para o gene *RGS1* chama a atenção. Diante disso, recomendam-se mais estudos relacionados a esse gene na sua relação com sintomas gastrointestinais. Por outro lado, o polimorfismo do gene *IL18RAP* ocorreu com maior frequência numa amostra menor de pessoas. A relação desse polimorfismo com a dor crônica relatada por Vasudeva e colaboradores (2015) poderia explicar essa sutil diferença.

A idade de introdução do glúten e o tempo de aleitamento materno são variáveis consideradas com frequência na relação com o diagnóstico de DC, em especial nos grupos de risco. Estudo multicêntrico e randomizado com crianças com história familiar de DC e com HLA DQ2 ou DQ8 positivo não observou diferença no risco de desenvolver DC até os 3 anos de idade no grupo que recebeu glúten entre 4 e 6 meses, quando comparado com placebo (VRIEZINGA *et al.*, 2014). Lionetti e colaboradores (2014) realizaram um estudo de recém-nascidos com familiares de primeiro grau com DC e concluíram que o aleitamento materno ou idade de introdução do glúten não previnem que o indivíduo predisposto geneticamente desenvolva a DC. Da mesma forma, no presente estudo, não foi observada diferença significativa dessas variáveis entre as pessoas com DM1 com ou sem DC associada.

A técnica *Tag-SNP* para as determinações haplotípicas de HLA DQ2.5 e DQ8 já foi validada e demonstrou ser eficaz e econômica. Brandão et al (2010) utilizaram esse método de genotipagem em estudo no nordeste do Brasil e recomendaram sua utilização no lugar da técnica *PCR-SSP* convencional, reduzindo assim os custos em áreas com recursos financeiros limitados.

A chave da patogênese da DC é a célula T CD4 e o gene mais importante para definição do risco pertence à região dos genes HLA. A maior associação imunogênica encontra-se nos portadores dos alelos para DQ2.5(DU PRÉ; SOLLID, 2015). As diferenças étnicas das populações estudadas são consideradas no estudo de Vatta e colaboradores (2011) que realizam com a técnica por *Tag-SNP*, uma quantidade maior de alelos. Considera-se uma limitação do presente estudo o fato de não pesquisar outros alelos como DQA1*0201/DQB1*0202 para DQ2.2 e DQA1*0505/DQB1*0301 para DQ7, que possivelmente estejam relacionados com a ancestralidade europeia existente na região sul do país. Dessa forma, a inclusão dos alelos para DQ 2.2 e DQ7 poderá aumentar a sensibilidade e a especificidade da investigação do risco para DC, em especial nas regiões sul e sudeste do Brasil.

11 CONCLUSÕES

11-Conclusões:

- Os polimorfismos de suscetibilidade não HLA pesquisados no presente estudo apresentaram alelos de risco em frequência semelhante nas pessoas com DM1 com ou sem diagnóstico de DC.
- Sintomas gastrointestinais como diarreia, dor e distensão abdominal foram mais prevalentes entre as pessoas com DM1 e DC associada.
- A idade da introdução do glúten, o tempo de aleitamento materno e a idade do diagnóstico da DM1 foi semelhante entre pessoas com DM1 que apresentam ou não DC associada.
- Os polimorfismos nos genes *RGS1* e *IL18RAP* foram mais prevalentes entre as pessoas com DM1 com sintomas gastrointestinais, independente de ter ou não DC.
- A relação entre a idade do diagnóstico de DM1 com a presença dos alelos de risco para os polimorfismos não HLA nas com DM1 não foi confirmada com nenhum dos alelos estudados.
- A presença do alelo DQ2.5 foi mais prevalente entre os indivíduos com DC enquanto que o alelo DQ8 foi mais prevalente entre os indivíduos com DM1.
- A pesquisa dos alelos DQ2.5 e DQ8 pela técnica Tag-SNP permitiu determinar um alto valor preditivo negativo no diagnóstico de DC na população de pessoas com DM1 e com DC, semelhante ao descrito na literatura com a técnica convencional.

12 APÊNDICES

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento

(Pessoas com DM1)

Você, na condição de pai/mãe ou representante legal de (nome da criança)

_____ está sendo convidado a participar de uma pesquisa de cunho acadêmico do Curso de Pós- Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente /Universidade Federal do Rio Grande do Sul intitulada: “**Polimorfismos de Suscetibilidade a Doença Celíaca em uma Amostra de Pessoas com Diabetes Mellitus Tipo 1**”.

A doença celíaca é um problema de saúde que ocorre de forma silenciosa e consiste na intolerância a alimentos que contenha glúten como: farinha de trigo, cevada e centeio. Pessoas com doença celíaca podem apresentar, com o passar do tempo, diarreia crônica, dificuldades no ganho de peso, anemia, inflamação no intestino, entre outras complicações. O tratamento consiste em realizar uma dieta especial, sem alimentos com as farinhas citadas anteriormente.

O objetivo do presente estudo é saber se pessoas que são portadoras de Diabetes tipo 1 apresentam maior predisposição para essa doença e quais marcadores genéticos estão presentes(polimorfismos).

Caso haja concordância de seu filho participar desse estudo, serão realizados os seguintes procedimentos:

- Com o sangue já coletado para realização dos exames de rotina, será encaminhada amostra do soro restante para realizar os exames específicos para detectar a doença celíaca e para avaliação de marcadores genéticos.
- Na impossibilidade de coleta de sangue, será realizada coleta de saliva.
- Preenchimento de um formulário por um dos pesquisadores com informações necessárias para identificar características da criança ou adolescente que se identifique maior ou menor risco de ser portador da Doença Celíaca.
- Após obter o resultado dos exames, os pais das crianças com resultados positivos serão avisados e orientados a realizar acompanhamento médico caso os exames apresentem alterações sugestivas da doença para confirmação do diagnóstico bem como para encaminhar o tratamento, se for indicado.

EU _____, (pai/mãe ou representante legal) da criança/adolescente acima descrita, recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e autorizo a participação da mesma (o) na pesquisa.

Declaro que também fui informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa;
- De que a participação da criança/adolescente é voluntária e terei a liberdade de retirar o meu consentimento, a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo para a minha vida pessoal e nem para o atendimento prestado a criança/adolescente.
- Da garantia que não serei identificado quando da divulgação dos resultados e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa.
- Sobre o projeto de pesquisa e a forma como será conduzido e que em caso de dúvida ou novas perguntas poderei entrar em contato com a pesquisadora: Marília Dornelles Bastos, telefone (51)3715-8177, mdbastos@unisc.br e endereço Rua Ramiro Barcelos 2400-2º andar– Porto Alegre ou com a médica responsável Márcia Puñales, telefone 33572698 e 33414511.
- Também que, se houverem dúvidas quanto a questões éticas, poderei entrar em contato com Daniel Demétrio Faustino da Silva, Coordenador-geral do Comitê de Ética em Pesquisa do GHC pelo telefone 3357-2407, endereço Av. Francisco Trein 596, 3º andar, Bloco H, sala 11.
- Declaro que recebi cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, ficando outra via com a pesquisadora.

Porto Alegre, ____, de _____ de 20_____.

Assinatura do pai/mãe ou representante legal

Concordo em participar do estudo em que foi explicado a mim e aos meus responsáveis. Serão feitas perguntas sobre a minha saúde e, quando eu coletar os exames que já costumo realizar, os pesquisadores irão usar uma parte desse sangue para fazer outros exames que podem ser importantes para o meu futuro.

Assinatura da criança ou adolescente (se maior de 7 anos)

Pesquisador responsável

APÊNDICE B

Protocolo de Pesquisa- Pessoas com DM1

Protocolo de Pesquisa número: _____

Iniciais do nome: _____ Registro: _____

Data de Nascimento: ___/___/____. Sexo: 1- Masculino () 2- Feminino ()

Responsável pelas informações: 1- () pai 2- () mãe 3- () paciente

4- () outro- especificar: _____

Telefone(s) para contato: _____ Data da entrevista: _____

História alimentar:

Tempo de aleitamento materno exclusivo: _____ meses. () Não realizou () Não sabe

Introdução de fórmulas: _____ meses. () Não realizou () Não sabe

Introdução de leite de vaca pura ou caixinha: _____ meses. () Não realizou () Não sabe

Introdução de alimentos com glúten : _____ meses. () Não sabe

Idade do diagnóstico da Diabetes (anos e meses):

Apresenta outra doença além da Diabetes?

() -Doença de Crohn, () Colite Ulcerativa () Artrite Reumatóide,

() Tireoidite Autoimune () _____

() Não

Tem alguma queixa persistente de sintoma gastrointestinal?

() -Dor abdominal, () Diarréia () Vômitos () Constipação () Distensão abdominal

() Anorexia () outro: _____

() -Não

Resultado dos exames:

Dosagem de Antitransglutaminase IgA(U/ml): _____

IGA Total (mg/dl): _____

Biopsia duodenal (Marsh): _____

3-Avaliação genética:

	A	B
<i>RGS1</i>		
<i>IL2/IL21</i>		
<i>BACH2</i>		
<i>TLR7/TLR8</i>		
<i>IL18RAP</i>		
<i>HLA</i>		

APÊNDICE C

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

(Pessoas com Doença Celíaca)

A Doença Celíaca é um problema reconhecidamente de natureza genética, podendo ocorrer em familiares de pessoas portadoras dessa doença. Por outro lado, pessoas com Doença Celíaca podem ter outras doenças associadas, de natureza genética, como é o caso da Diabetes tipo 1.

O objetivo do presente estudo é conhecer os marcadores genéticos para Doença Celíaca de crianças e adolescentes com Diabetes tipo 1 e comparar com pessoas que já tenham o diagnóstico de Doença Celíaca.

Você _____ está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa de cunho acadêmico do Curso de Pós- Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente /Universidade Federal do Rio Grande do Sul intitulada *Polimorfismos de Suscetibilidade a Doença Celíaca em uma amostra de Pessoas com Diabetes Mellitus Tipo 1*.

Caso haja concordância de participar desse estudo, serão realizados os seguintes procedimentos:

- Será coletada sua saliva em um frasco especial, que será encaminhado para realização dos exames genéticos específicos.
- Será preenchido um formulário por um dos pesquisadores com informações necessárias para compreender como foi feito o diagnóstico da Doença Celíaca, se existem outros casos na sua família, e se você sabe ser portador(a) de alguma doença genética.
- Após obter o resultado dos exames, você será devidamente orientado(a) sobre o resultado, podendo repassar tal informação a seu médico assistente.

Eu _____, recebi as informações sobre os objetivos e a importância desta pesquisa de forma clara e concordo em participar da pesquisa.

Declaro que também fui informado:

- Da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos assuntos relacionados a esta pesquisa.
- De que a participação é voluntária, e que terei liberdade de retirar o meu consentimento, a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo para a minha vida pessoal, ou para o atendimento prestado à criança/adolescente.
- Da garantia que não serei identificado(a) quando da divulgação dos resultados, e que as informações serão utilizadas somente para fins científicos do presente projeto de pesquisa.
- O estudo não causa riscos à pessoa, uma vez que será coletada somente saliva espontaneamente eliminada, sem necessidade de coleta com agulha ou qualquer tipo de equipamento que tenha contato direto com a boca.
- Sobre o projeto de pesquisa e a forma como será conduzido. Em caso de dúvida ou novas perguntas, poderei entrar em contato com a pesquisadora: **Marília Dornelles Bastos**, telefone (51)3715-8177, mdbastos@unisc.br e endereço Rua Ramiro Barcelos 2400-2º andar– Porto Alegre.
- Declaro que recebi cópia deste ***Termo de Consentimento Livre e Esclarecido***, ficando outra via com a pesquisadora.

Porto Alegre, ____, de _____ de 20_____.

Assinatura do(a) participante da pesquisa
(Caso seja menor de idade, do seu responsável)

Pesquisador responsável

APÊNDICE D

Protocolo de Pesquisa das pessoas com Doença Celíaca

Protocolo de Pesquisa número: _____

Iniciais do nome do paciente: _____

Data de Nascimento: ____/____/____. Sexo: () Masculino, () Feminino

Responsável pelas informações: () pai, () mãe, () paciente () outro

(especificar): _____

Telefone(s) para contato: _____

Data da realização do estudo (questionário): _____

1-Apresenta outra doença além da Doença Celíaca?

1-() Sim:

() Diabetes tipo 1, () Doença de Crohn, () Colite Ulcerativa, () Artrite Reumatoide,

() Tireoidite Autoimune () Outra(s): _____

2-() Não

2-Exames realizados para confirmação diagnóstica de Doença Celíaca:

Anti-TtG IgA: () sim () não () não sabe

Anti-EMA IgA: () sim () não () não sabe

Anti-AGA-IgA () sim () não () não sabe

IgA sérica: () sim () não () não sabe

EDA com biópsias: () sim () não () não sabe

Outro (Qual): _____

3-Avaliação genética:

	A	B
<i>RGS1</i>		
<i>IL2/IL21</i>		
<i>BACH2</i>		
<i>TLR7/TLR8</i>		
<i>IL18RAP</i>		
<i>HLA</i>		

13 ANEXOS

ANEXO A- Artigo Original 1 em inglês

Elsevier Editorial System(tm) for Gene
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Non-HLA Polymorphisms and Clinical Characteristics of Patients with Type 1 Diabetes and Celiac Disease

Article Type: Research Paper

Keywords: celiac disease; type 1 diabetes mellitus; polymorphisms; tag SNP; risk alleles

Corresponding Author: Ms. Marília Dornelles Bastos,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Marília Dornelles Bastos

Order of Authors: Marília Dornelles Bastos; Luiza M Mariath; Márcia Puñales; Balduino Tschiedel; Thayne W Kowalski; Lavínia Schuler-Faccini; Themis R Silveira

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Background: To compare the prevalence of five non-HLA polymorphisms with risk of type 1 diabetes mellitus (T1D) and celiac disease (CD) among T1D patients with and without CD, and to investigate the correlation of the genotypes with the clinical characteristics and haplotype combinations for DQ2 and DQ8.

Methods and Results: Mixed design with retrospective and prospective evaluations of 312 patients with T1D who were investigated for CD with transglutaminase IgA (TTG-IgA) and with duodenal biopsy. Genotyping of the genes RGS1, IL2-IL21, BACH2, TLR7/TLR8, and IL18RAP was done by real-time PCR, while the haplotypes for HLA-DQ2.5 and DQ8 was done using the tag single nucleotide polymorphism technique. The allelic and genotypic frequencies were in 273 patients with negative TTG-IgA and 39 patients with CD, and they did not indicate a significant difference. The presence of gastrointestinal symptoms was more frequent in carriers of the polymorphisms of the genes RGS1 and IL18RAP. The duration of breastfeeding, the age at introduction to gluten, and the age at diagnosis of T1D were similar. The comparison of the five polymorphisms together with the combination of the haplotypes indicated no significant difference.

Conclusions: The presence of the polymorphisms studied does not contribute to differentiating the patients with T1D from those with or without associated CD. We observed a higher frequency of gastrointestinal symptoms in patients with risk alleles for the polymorphisms in the RGS1 and IL18RAP genes. The different combinations of haplotypes DQ2 and DQ8 did not influence the results of the non-HLA polymorphisms studied.

Suggested Reviewers: Ludovica Segat
Genetics Service, IRCCS Burlo Garofolo Trieste, Italy
segat@burlo.trieste.it

Non-HLA Polymorphisms and Clinical Characteristics of Patients with Type 1 Diabetes and Celiac Disease

Marília Dornelles Bastos MD^{1 2}

Luiza Monteavaro Mariath MSc³

Márcia Puñales MD PhD⁴

Balduino Tschiedel MD⁴

Thayne Kolwalski MSc³

Lavínia Schüler-Faccini MD PhD^{1 3 5}

Themis Reverbel da Silveira MD PhD^{1 6}

¹ Post-Graduation Program in Adolescent and Child Health, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² University of Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil.

³ Department of Genetics, University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

⁴ Institute for Children with Diabetes- Children's Hospital, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Brazil

⁵ INaGeMP—Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brazil

⁶ Children's Hospital Santo Antônio, Porto Alegre, Brazil

Address correspondence and reprint request:

Marília Dornelles Bastos

Telephone number: 555192263336

Fax number: 555137158177

mdbastos@unisc.br

Short title: Non-HLA Polymorphisms, T1D and CD

The authors report no conflicts of interest

Source of funding : This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente - Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e Universidade de Santa Cruz do Sul (UNISC).

Abbreviations:

BACH 2- BTB domain and CNC homolog 2

CD-Celiac disease

CNPQ- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

HLA- Human leukocyte antigen

ICD -Institute for Children with Diabetes

IgA- Immunoglobulin A

IL18 RAP- Interleukin 18 receptor accessory protein

IL2/IL21- Interleukin 2 and 21

NK- Natural Killer

PCR- Polymerase Chain Reaction

RGS1- Regulator of G protein signaling 1

SNP- Single Nucleotide Polymorphisms

T1D- Type 1 diabetes mellitus

Tag-SNP-Tag single -nucleotide polymorphisms

TLR- Toll-like receptors

TTG-IgA- Transglutaminase IgA antibody

UFRGS- Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UNISC-Universidade de Santa Cruz do Sul

Abstract

Background: To compare the prevalence of five non-HLA polymorphisms with risk of type 1 diabetes mellitus (T1D) and celiac disease (CD) among T1D patients with and without CD, and to investigate the correlation of the genotypes with the clinical characteristics and haplotype combinations for DQ2 and DQ8.

Methods and Results: Mixed design with retrospective and prospective evaluations of 312 patients with T1D who were investigated for CD with transglutaminase IgA (TTG-IgA) and with duodenal biopsy. Genotyping of the genes *RGS1*, *IL2-IL21*, *BACH2*, *TLR7/TLR8*, and *IL18RAP* was done by real-time PCR, while the haplotypes for HLA-DQ2.5 and DQ8 was done using the tag single nucleotide polymorphism technique. The allelic and genotypic frequencies were in 273 patients with negative TTG-IgA and 39 patients with CD, and they did not indicate a significant difference. The presence of gastrointestinal symptoms was more frequent in carriers of the polymorphisms of the genes *RGS1* and *IL18RAP*. The duration of breastfeeding, the age at introduction to gluten, and the age at diagnosis of T1D were similar. The comparison of the five polymorphisms together with the combination of the haplotypes indicated no significant difference.

Conclusions: The presence of the polymorphisms studied does not contribute to differentiating the patients with T1D from those with or without associated CD. We observed a higher frequency of gastrointestinal symptoms in patients with risk alleles for the polymorphisms in the *RGS1* and *IL18RAP* genes. The different combinations of haplotypes DQ2 and DQ8 did not influence the results of the non-HLA polymorphisms studied.

Keywords: celiac disease; type 1 diabetes mellitus; polymorphisms; tag SNP; risk alleles.

HIGHLIGHTS:

- We evaluated polymorphisms in genes *RGS1*, *IL2-IL21*, *BACH2*, *TLR7/TLR8*, and *IL18RAP*.
- The polymorphisms do not modify the probability of an individual with T1D develop CD.
- We observed an interaction of *RGS1* and *IL18RAP* with gastrointestinal symptoms.
- We can reaffirm *RGS1* and *IL18RAP* role in intestinal injury and pain mediation processes.
- HLA DQ2.5 and DQ8 does not seem to influence on the effect of non-HLA polymorphisms.

INTRODUCTION

The higher incidence of celiac disease (CD) in individuals with type 1 diabetes mellitus (T1D) is already known, with a prevalence of between 1.6 and 16.4% [1–3]. The prevalence of CD in the south of Brazil is 5.1% [4]. The main genetic risk factor is the presence of molecules of class II human leukocyte antigen (HLA) [5–7]. The alleles HLA DQ2.5 and DQ8 have a high negative predictive value; however, approximately 40% of the population has one or both alleles [8,9].

Genome-wide association studies identify polymorphisms that are susceptible to CD and T1D — most of these non-HLA loci are involved in the signaling pathways of immune cells, as well as maturation and differentiation of T cells and chemokines [10]. The regulator of G protein signaling 1 (*RGS1*) gene is responsible for the activation and proliferation of B cells and the blocking of intraepithelial lymphocytes [11]. The genes related to interleukin 2 and 21 (*IL2/21*) act as a growth factor for the T cells, and in the proliferation of natural killer (NK) cells, monocytes, and macrophages, as well as in the differentiation of B cells [12, 13]. The rs6822844 polymorphism of the *IL-2* gene has been linked to the pathogenesis of T1D in a Polish study [14]. The *BACH2* gene acts on T helper cells (T CD4⁺) and as a regulator of the antibody response elicited by viral infections [12, 15]. The genes related to toll-like receptors (TLR), *TLR7/TLR8* are involved in innate immunity for the detection of viral infections, as well as in the recognition of receptors for autoimmunity [12, 16, 17]. The interleukin 18 receptor accessory protein (*IL18RAP*) gene is involved in the production of interferon gamma [13, 18]. The association with susceptibility to CD was observed in the Italian study, when compared to healthy subjects [19]. The identification and comparison of susceptibility polymorphisms in the two diseases could help in understanding the pathophysiology and their clinical variability.

The objectives of this present study are to: compare the presence of the risk alleles for five non-HLA polymorphisms in patients with T1D who either have or do not have CD; compare the presence of the risk alleles of the non-HLA polymorphisms with haplotypes HLA DQ2 and DQ8; and evaluate the clinical characteristics in the two groups, related to the presence or absence of the risk alleles.

METHODS

Design of the study and population

This study consisted of a mixed design with retrospective and prospective evaluations. It was done between August, 2012 and October, 2014. The study involved 312 patients with a T1D diagnosis being treated at the Institute for Children with Diabetes (ICD) at the Conceição Children's Hospital, located in the city of Porto Alegre, which is the capital of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Patients with T1D are treated from 0 to 21 years of age and remain in treatment in the ICD until adulthood. They are evaluated every three months and are subjected to the collection of examinations for the control of diabetes. From two years of age onwards, the presence of tissue transglutaminase IgA antibody (TTG-IgA) and immunoglobulin A (IgA) is evaluated. The seropositive patients are referred for duodenal biopsy. CD was confirmed by the presence of histological alterations based on the Marsh classification modified by Oberhuber [20, 21].

For evaluation of the clinical characteristics and the CD risk polymorphisms in the population of patients with T1D, after authorization to participate in the study the research protocol was filled in and the collection of blood and/or saliva samples was done. The results of the serology examinations and duodenal biopsies were obtained by studying the medical records. Information on the research protocol is available in the supplementary materials.

Included in the study were patients with TTG-IgA less than 9.0 U/ml (T1D without CD), and patients with TTG-IgA greater than 16 U/ml and a duodenal biopsy compatible with a histopathological Marsh score of 2 or more (T1D with CD). Excluded from the evaluation were patients with TTG-IgA values between 9.0 and 16 U/ml, and those with values above 16 U/ml who did not do a duodenal biopsy or who had a histopathological Marsh score lower than 2.

Laboratory Methods

DNA Extraction: A peripheral blood sample (10 ml of total blood with anticoagulant) was collected for later DNA extraction by the [22]. When collection of the blood was not possible, a saliva sample was collected via the Oragene kit (DNA Genotek®) and subjected to DNA extraction in accordance with the manufacturer's instructions.

Genotyping of the polymorphisms: The real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) technique was used for genotypic determination of the polymorphisms investigated through TaqMan® genotyping assays (Applied Biosystems, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. The assays utilized in the real-time PCR for all the polymorphisms had previously been deposited in the Custom TaqMan Genotyping Assay (Applied Biosystems) and include: C__15810686_10 (rs2816316 A>C of RGS1), C__28983601_10 (rs6822844 G>T of IL2/IL21), C___2014214_10 (rs11755527 C>G of BACH2), C__11532957_10 (rs5979785 C>T of TLR7/TLR8), and C____345197_1_ (rs917997 A>G IL18RAP). The assays C_58662585_10 (rs2187668 C>T of HLA-DQA1) and C_29817179_10 (rs7454168 C>T of HLA-DQB1) were used to predict the haplotypes HLA-DQ2.5 and HLA-DQ8, respectively.

Analysis of the results was done via the StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems). Genotypic

determination of the non-HLA polymorphisms was done with the aid of the same software, while haplotypic determination of DQ2.5 and DQ8 was obtained through the tag single nucleotide polymorphism (tag SNP) approach [23, 24].

Statistical Analyses

The comparison of the clinical variables in the groups was done through the tests: chi-square test, Fisher's test, Kruskal-Wallis test and ANOVA.

All the polymorphisms were tested for the Hardy-Weinberg equilibrium using chi-square test. Allelic and genotypic frequencies were compared using the chi-square test or Fisher's exact test. The same tests were used to compare the frequency of the risk alleles of the polymorphisms with the haplotypes of DQ2.5 and DQ8. Further analysis evaluated the influence of non-HLA polymorphisms in clinical characteristics of patients with T1D. Binary logistic regression was used to explore possible gene-gene interactions (epistasis) between polymorphisms that were associated with same(s) variable(s) dependent(s).

Ethical considerations:

The study was approved by the Ethics Committee at the Conceição Children's Hospital and, upon completion of the protocol, authorization for participation in the study was requested from the patient or the person responsible for the patient, through the reading and signing of the terms of consent.

RESULTS

The average age of the 312 patients was 14 ± 5 years and 170 (54.5%) were male. Table 1 describes the clinical characteristics observed in the groups, in which a higher average age and higher frequency of gastrointestinal complaints among the patients with a CD diagnosis can be seen. No significant difference was observed in the duration of breastfeeding, age at which gluten was introduced into the diet, and age at time of T1D diagnosis. Abdominal pain was the most reported symptom — it was most prevalent in the group with CD — followed by diarrhea and constipation. The allelic and genotypic frequencies of the polymorphisms analyzed, the description of the risk alleles for each gene, and the comparison of the frequencies for patients with and without CD, are shown in Table 2 — no statistically significant difference was seen in the five genes surveyed.

The haplotypes for DQ2.5 and DQ8 were evaluated in: 264 patients who had T1D but not CD, and 32 patients with both T1D and CD. Among the patients with CD, 96.9% had at least one of the alleles, while in the patients without CD this frequency was 82.6% ($P = 0.027$).

Table 3 shows the comparison between the presence of the risk alleles for the non-HLA polymorphisms and the combinations of the haplotypes for DQ2.5 and DQ8, in which no significant difference was determined. Further analysis comparing carriers and noncarriers of risk haplotypes DQ2.5 and / or DQ8 were held. Again, there were no significant differences between the groups (supplementary table).

The presence of the risk allele for the polymorphism of the *RGS1* gene occurred in all of the patients with gastrointestinal complaints ($P=0.023$). The risk allele for the polymorphism of the *IL18RAP* gene occurred at a slightly higher frequency in patients with

gastrointestinal complaints ($P=0,048$). With the other polymorphisms there was no difference observed, as shown in Table 4. When comparing the presence of the risk alleles and the gastrointestinal complaints exclusively in the patients with a diagnosis of CD, it was observed that all of the patients with gastrointestinal symptoms had the risk allele for the polymorphism of *RGS1*. Moreover, in patients with symptoms, for the polymorphism of *IL18RAP* the proportion of carriers of the risk allele remained higher; however, it was not possible to establish a statistical correlation. These data are presented as supplementary material.

DISCUSSION

Genome-wide association studies describe the sharing of at least seven genes in patients with T1D and CD, in the search for a better understanding of the pathophysiology of these diseases [12]. We compared the polymorphisms in five genes and found no difference between T1D patients with or without CD.

There was a higher frequency of the risk allele for the polymorphism of the *RGS1* gene in patients with gastrointestinal symptoms, independent of the serological status of the individual. This gene is associated with villous atrophy through the decreased signaling of the G cells for blocking intraepithelial lymphocytes, which are essential for inducing the epithelial damage caused by gluten [11, 25]. Smyth et al. [26] suggest that there are common biological mechanisms that cause intolerance to dietary antigens, as well as tissue damage. The association of this gene with multiple sclerosis, T1D, and CD — diseases mediated by T cells — was studied by Gibbons et al. [27], who concluded that there is a clear link between this gene and the presence of gastrointestinal lesions. Therefore, the participation of the *RGS1* gene in the pathophysiology of these diseases may justify the higher incidence of gastrointestinal symptoms in carriers of this polymorphism.

The gene related to *IL18RAP* was demonstrated by Smyth et al [26]. to have a negative association with T1D and a positive association with CD. Myhr et al. [18] relate such associations to the production of interferon gamma and the activity of the T cells and the NK cells. Some authors suggest that it has a major role in inflammatory diseases and as a mediator of the chronic pain related to peripheral neuropathies [28, 29] Such considerations might explain the slight difference encountered in the presence of gastrointestinal symptoms for carriers of the risk allele among patients with T1D, regardless of having or not having CD.

Howson et al.[30]investigated the relationship between the age at T1D diagnosis for 38 non-HLA polymorphisms. They identified two susceptibility loci in the genes *rs2069763* (IL2/4q27) and *rs10509540* (*RNLS*/10q23.31), which would be related to the increase in the age of the diagnosis, and considered this finding to be a protective factor. The median age of the T1D diagnosis was similar among the patients with or without CD, with no influence from the polymorphisms studied.

The search for environmental factors that justify the occurrence of CD in patients with genetic predisposition is being researched; however, dietary history has not been confirmed by recent scientific evidence [31, 32]. Catassi, Gatti, and Fasano [33] reported aspects of the new epidemiology of CD and they suggested that further studies be done to clarify the role of: breastfeeding, gluten intake, and other environmental factors, taking into consideration that there are new geographical regions with increasing prevalence of the disease. A cohort study conducted recently in Spain followed HLA DQ2 positive children from the time of their birth. The authors considered the introduction of gluten during the breastfeeding period to be a protective factor against CD for this group [34]. In this present study, the age at which gluten was introduced into the diet and the duration of breastfeeding did not indicate a statistical difference either among the groups or in the comparison with the presence of the risk alleles.

Tsouka et al. [6] evaluated 41 children who had CD associated with T1D, and 55 children who only had CD. They found that the symptomatic cases occur more among patients with isolated CD, and they suggested that the children with T1D who develop CD have a milder phenotype of the disease. In Brazil, a study of children and adolescents with T1D and Down syndrome found little association between the symptoms and histopathological findings, and it indicated screening in the populations at risk, independent of the presence of gastrointestinal complaints [35]. In this present study, although there was a higher prevalence of gastrointestinal symptoms among the patients with CD, 54.1% of them had no such symptoms.

Khatib et al. [36] described a clinical pattern for the manifestation of the disease in 165 patients with CD, in which abdominal pain was the most prevalent symptom, followed by constipation and diarrhea. Similarly, the symptoms described by patients with CD were: abdominal pain in 36.9%, diarrhea in 15.8%, and constipation in 10.5%. We observed that 19% of the patients with T1D but not CD had abdominal pain. Gastrointestinal symptoms in patients with T1D may be associated with various pathophysiological mechanisms such as autoimmunity, inflammation, hyperglycemia, dysmotility, and sensory and functional alterations [37].

A multicenter study conducted in Spain with 39 centers and 974 cases found that, from the age of 6 onwards, non-classical and asymptomatic cases are prevalent [38]. However, it was found that despite the average age of patients with CD being 16 years, among the symptomatic patients, the symptoms that prevailed were considered to be classic for the disease.

The higher prevalence of risk alleles DQA1*0501 and DQB1* 0201 for DQ2.5, and DQB1*0302 for DQ8, was also demonstrated by Mergioni and Pizzuti [39], in a study using the tag SNP technique. The technique has already been validated in patients with T1D and CD and is considered to be effective and less costly, thus enabling population screening studies [23, 24, 40] In this present study, it was possible to confirm the high negative predictive value of the test, thereby reinforcing its usefulness in assessing people at risk of CD; for example, relatives of patients with CD, and patients with T1D and other autoimmune and genetic conditions.

In a study in Sweden involving the research of HLA haplotypes in 6,403 children, Liu et al. [41] concluded that the presence of homozygotes for DQ2 (DQ2/DQ2), or heterozygotes for DQ2 and DQ8 (DQ2/DQ8) equates to a higher risk of developing the disease in comparison with other allele combinations. Romanos et al. recommend studies with the combination of HLA and non-HLA genes to assist in the diagnosis of these patients [8]. This present study involved the comparison of different allele combinations with the presence of non-HLA polymorphisms; however, no significant differences were found between the groups.

The limitations to be considered in this present study are related to: the miscegenation in Brazil, which hinders us from making a comparison of polymorphisms in the studies of other specific populational groups.

CONCLUSION

The presence of risk polymorphisms in the non-HLA genes studied does not appear to influence the simultaneous occurrence of T1D and CD. On the other hand, variations in the *RGS1* and *IL18RAP* genes may be associated with a higher occurrence of gastrointestinal manifestations and pain in people with these diseases. Moreover, our study points to an independent action of these genes and the presence of the haplotypes DQ2.5 and DQ8 in the simultaneous occurrence of T1D and CD.

Acknowledgments: We would like to thank the patients and their relatives for the participation in this study. We also wish to thank Universidade de Santa Cruz do Sul UNISC), Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente – Universidade Federal do Rio Grande do Sul(UFRGS), Instituto da Criança com Diabetes (ICD) staff and Laboratório Endocrimeta for the support.

REFERENCES:

1. Donaghue KC, Ambler G, Phelan H, et al (2015) Screening for Celiac Disease in Type 1 Diabetes: A Systematic Review. *Pediatrics* 136:e170–e176. doi: 10.1542/peds.2014-2883
2. Elfström P, Sundström J, Ludvigsson JF (2014) Systematic review with meta-analysis: associations between coeliac disease and type 1 diabetes. *Aliment Pharmacol Ther* 40:1123–1132. doi: 10.1111/apt.12973
3. Diniz-Santos D, Machado A, Silva L (2012) Doença Celíaca. In: Carvalho E de, Silva LR, Ferreira CT (eds) *Gastroenterol. e Nutr. em Pediatr.* Manole, São Paulo, pp 359–403
4. Ramos ARL, Pinto RB, Bastos MD, et al (2015) Rastreamento de Doença Celíaca em Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 1. IV Simp. Latinoam. *Enferm. Celíaca*
5. Kahaly GJ, Schuppan D (2015) Celiac Disease and Endocrine Autoimmunity. *Dig Dis* 33:155–161. doi: 10.1159/000369535
6. Tsouka A, Mahmud FH, Marcon MA (2015) Celiac Disease Alone and Associated With Type 1 Diabetes Mellitus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 61:297–302. doi: 10.1097/MPG.0000000000000789
7. Troncone R, Discepolo V (2014) Celiac Disease and Autoimmunity. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 59:S9–S11. doi: 10.1097/01.mpg.0000450394.30780.ea

8. Romanos J, Rosen A, Kumar V, et al (2014) Improving coeliac disease risk prediction by testing non-HLA variants additional to HLA variants. *Gut* 63:415–422. doi: 10.1136/gutjnl-2012-304110
9. Wijmenga C, Gutierrez-Achury J (2014) Celiac Disease Genetics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 59:S4–S7. doi: 10.1097/01.mpg.0000450392.23156.10
10. Gutierrez-Achury J, Coutinho de Almeida R, Wijmenga C (2011) Shared genetics in coeliac disease and other immune-mediated diseases. *J Intern Med* 269:591–603. doi: 10.1111/j.1365-2796.2011.02375.x
11. Izzo V, Pinelli M, Tinto N, et al (2011) Improving the Estimation of Celiac Disease Sibling Risk by Non-HLA Genes. *PLoS One* 6:e26920. doi: 10.1371/journal.pone.0026920
12. Trynka G, Wijmenga C, van Heel DA (2010) A genetic perspective on coeliac disease. *Trends Mol Med* 16:537–550. doi: 10.1016/j.molmed.2010.09.003
13. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B (2011) Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 29:493–525. doi: 10.1146/annurev-immunol-040210-092915
14. Fichna M, Zurawek M, Fichna P, et al (2013) Polymorphic variant at the IL2 region is associated with type 1 diabetes and may affect serum levels of interleukin-2. *Mol Biol Rep* 40:6957–6963. doi: 10.1007/s11033-013-2815-9
15. Roychoudhuri R, Hirahara K, Mousavi K, et al (2013) BACH2 represses effector programs to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. *Nature* 498:506–510. doi: 10.1038/nature12199

16. Cooper JD, Walker NM, Smyth DJ, et al (2009) Follow-up of 1715 SNPs from the Wellcome Trust Case Control Consortium genome-wide association study in type I diabetes families. *Genes Immun* 10:S85–S94. doi: 10.1038/gene.2009.97
17. Kim SK (2015) Recent update of autism spectrum disorders. *Korean J Pediatr* 58:8. doi: 10.3345/kjp.2015.58.1.8
18. Myhr CB, Hulme MA, Wasserfall CH, et al (2013) The autoimmune disease-associated SNP rs917997 of IL18RAP controls IFN γ production by PBMC. *J Autoimmun* 44:8–12. doi: 10.1016/j.jaut.2013.06.001
19. Zupin L, Catamo E, Polesello V, et al (2015) Interleukin-18 gene promoter polymorphisms and celiac disease in Italian patients. *Mol Biol Rep* 42:525–533. doi: 10.1007/s11033-014-3796-z
20. Marsh M (1992) Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine: a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (“celiac sprue”). *Gastroenterology* 102:330–54.
21. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H (1999) The histopathology of CD: time for standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11:1185–94.
22. Lahiri DK, Nurnberger JI (1991) A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res* 19:5444.
23. Monsuur AJ, de Bakker PIW, Zhernakova A, et al (2008) Effective Detection of Human Leukocyte Antigen Risk Alleles in Celiac Disease Using Tag Single Nucleotide Polymorphisms. *PLoS One* 3:e2270. doi: 10.1371/journal.pone.0002270

24. Brandao L C, Vatta S, Guimaraes R, et al (2010) Rapid genetic screening for major human leukocyte antigen risk haplotypes in patients with type 1 diabetes from Northeastern Brazil. *Hum Immunol* 71:277–280. doi: 10.1016/j.humimm.2009.12.008
25. Galatola M, Izzo V, Cielo D, et al (2013) Gene Expression Profile of Peripheral Blood Monocytes: A Step towards the Molecular Diagnosis of Celiac Disease? *PLoS One* 8:e74747. doi: 10.1371/journal.pone.0074747
26. Smyth DJ, Plagnol V, Walker NM, et al (2008) Shared and Distinct Genetic Variants in Type 1 Diabetes and Celiac Disease. *N Engl J Med* 359:2767–2777. doi: 10.1056/NEJMoa0807917
27. Gibbons DL, Abeler-Dorner L, Raine T, et al (2011) Cutting Edge: Regulator of G Protein Signaling-1 Selectively Regulates Gut T Cell Trafficking and Colitic Potential. *J Immunol* 187:2067–2071. doi: 10.4049/jimmunol.1100833
28. Vasudeva K, Vodovotz Y, Azhar N, et al (2015) In vivo and systems biology studies implicate IL-18 as a central mediator in chronic pain. *J Neuroimmunol* 283:43–49. doi: 10.1016/j.jneuroim.2015.04.012
29. Motavaf M, Safari S, Alavian SM (2014) Interleukin 18 gene promoter polymorphisms and susceptibility to chronic hepatitis B infection: a review study. *Hepat Mon* 14:e19879. doi: 10.5812/hepatmon.19879
30. Howson JMM, Walker NM, Clayton D, Todd J a (2009) Confirmation of HLA class II independent type 1 diabetes associations in the major histocompatibility complex including HLA-B and HLA-A. *Diabetes, Obes Metab* 11:31–45. doi: 10.1111/j.1463-1326.2008.01001.x

31. Ludvigsson JF, Green PHR (2014) The Missing Environmental Factor in Celiac Disease. *N Engl J Med* 371:1341–1343. doi: 10.1056/NEJMe1408011
32. Vriezinga SL, Auricchio R, Bravi E, et al (2014) Randomized Feeding Intervention in Infants at High Risk for Celiac Disease. *N Engl J Med* 371:1304–1315. doi: 10.1056/NEJMoa1404172
33. Catassi C, Gatti S, Fasano A (2014) The New Epidemiology of Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 59:S7–S9. doi: 10.1097/01.mpg.0000450393.23156.59
34. Cilleruelo ML, Fernández-Fernández S, Jiménez-Jiménez J, et al (2015) Prevalence and Natural History of Celiac Disease in a Cohort of at-Risk Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Epub ahead of print]. doi: 10.1097/MPG.0000000000001007
35. Costa Gomes R, Cerqueira Maia J, Fernando Arrais R, et al (2016) The celiac iceberg: from the clinical spectrum to serology and histopathology in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus and Down syndrome. *Scand J Gastroenterol* 51:178–185. doi: 10.3109/00365521.2015.1079645
36. Khatib M, Baker RD, Ly EK, et al (2016) Presenting Pattern of Pediatric Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 62:60–63. doi: 10.1097/MPG.0000000000000887
37. Rodrigues MLC, Motta MEFA (2012) Mechanisms and factors associated with gastrointestinal symptoms in patients with diabetes mellitus. *J Pediatr (Rio J)* 88:17–24. doi: 10.2223/JPED.2153

38. Cilleruelo ML, Roman-Riechmann E, Sanchez-Valverde F, et al (2014) Spanish National Registry of Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 59:522–526. doi: 10.1097/MPG.0000000000000446
39. Megiorni F, Pizzuti A (2012) HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *J Biomed Sci* 19:88. doi: 10.1186/1423-0127-19-88
40. de Bakker PIW, McVean G, Sabeti PC, et al (2006) A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. *Nat Genet* 38:1166–1172. doi: 10.1038/ng1885
41. Liu E, Lee H-S, Aronsson C a, et al (2014) Risk of Pediatric Celiac Disease According to HLA Haplotype and Country. *N Engl J Med* 371:42–49. doi: 10.1056/NEJMoa1313977

Table 1- Comparison of the clinical characteristics of the patients

Characteristics	Type 1 diabetes without celiac disease n = 273	Type 1 diabetes with celiac disease n = 39	P value
Average age (years)	13 ±5.4	16±6.7	0.006*
Gender:			
Male			
n(%)	147(53.8)	23(59)	0.547**
Duration of breastfeeding:			
Median in months	4	4	
(IQ 25–75)	(2–6)	(2–6)	0.294**
Age at T1D diagnosis:			
Median in years	7	6.5	
(IQ 25–75)	(4.5–10)	(4–10.5)	0.999***
Age at introduction of gluten into the diet:			
Median in months	6	6	
(IQ 25–75)	(6–9)	(4–7)	0.145***
Gastrointestinal complaint:			
n (%)	67 (25.0)	17 (45.9)	0.004**
Type of complaint	n(%)	n(%)	
Abdominal pain	51(19)	14(36.8)	0.012**
Vomiting	21(7.8)	2(5.3)	0.573**
Diarrhea	12(4.5)	6(15.8)	0.015****
Reflux	14(5.2)	2(5.3)	1.000****
Constipation	9(3.4)	4(10.5)	0.063****
Abdominal distension	3(1.1)	3(7.9)	0.005**
Anorexia	1(0.4)	1(2.6)	0.233****
Milk intolerance	0(0.0)	1(2.6)	0.124****

IQ=interquartile range. * ANOVA — comparison of multiple means with the Bonferroni test. ** Chi-square test. *** Kruskal-Wallis test.

****Fisher's test.

Table 2- Allelic and genotypic frequencies of the polymorphisms

Gene (Polymorphism)	Risk allele	Type 1 diabetes without celiac disease n = 273					Type 1 diabetes with celiac disease n = 39					P Allelic frequencies	P Genotypic frequencies
		Allelic frequencies		Genotypic frequencies			Allelic frequencies		Genotypic frequencies				
RGS1 (rs2816316)	A	A	C	AA	AC	CC	A	C	AA	AC	CC	0.297**	0.666*
n(%)	431(81.6)	97(18.1)	179 (67.8)	73(27.7)	12(4.5)	59(86.8)	9(13.2)	26(75.6)	7(20.6)	1(1.9)			
IL2/IL21 (rs6822844)	G	G	T	GG	GT	TT	G	T	GG	GT	TT	0.697**	0.921*
n(%)	465(87.7)	65(12.6)	207(78.1)	51(19.2)	7(2.6)	59(89.4)	7(10.6)	26(78.8)	7(21.2)	0(0)			
BACH2 (rs11755527)	C	C	G	CC	CG	GG	C	G	CC	CG	GG	0.170**	0.336**
n(%)	274(52.1)	252(47.9)	64(24.3)	146(55.5)	53(20.2)	38(61.3)	24(38.7)	11(35.5)	16(51.6)	4(12.9)			
TLR7/TLR8 [§] (rs5979785)	T	T	C	TT	TC	CC	T	C	TT	TC	CC	0.580**	0.562*
Male	n(%)	101(42.3)	138(57.7)	0(0)	101(73.2)	37(26.8)	14(41.2)	20(58.8)	0(0.0)	14(82.4)	3(17.6)		
Female	n(%)	183(75.6)	59(24.4%)	66(54.5)	51(42.1)	4(3.3)	18(72.0)	7(24.1)	6(46.2)	6(46.2)	1(7.7)		
IL18RAP (rs917997)	A	A	G	AA	AG	GG	A	G	AA	AG	GG	0.847**	0.707*
n(%)	150(28.4)	378(71.6)	27(10.2)	96(36.4)	141(53.4)	18(27.3)	48(72.7)	2(6.1)	14(42.4)	17(51.5)			

*Fisher's exact test. **Chi-square test.

Table 3- Non-HLA polymorphisms among the combinations of haplotypes for DQ2.5 and DQ8

	Risk allele ^a	DQ2.5/DQ2.5	DQ2.5/DQX ^a	DQ2.5/DQ8	DQ8/DQ8	Q8/DQX ^b	DQX ^b /DQX ^b	Total	P value
RGS1 (rs2816316)	A n(%)	30(10.7)	53(18.9)	76(27.1)	15(5.4)	59(21.1)	47(16.8)	280(100)	0.351*
L2/IL21 (rs6822844)	G n(%)	29(10.1)	55(18.9)	81(28.1)	15(5.2)	62(21.5)	46(16.00)	288(100)	0.089*
BACH2 (rs11755527)	C n(%)	22(9.3)	47(19.9)	73(30.9)	13(5.5)	47(19.9)	34(14.4)	236(100)	0.138*
TLR7/TLR8 (rs5979785)	C n(%)	23(9.6)	48(20.0)	69(28.8)	11(4.6)	52(21.7)	37(15.4)	240(100)	0.790*
IL18RAP (rs917997)	A n(%)	10(7.3)	30(21.9)	36(26.3)	8(5.8)	32(23.4)	21(15.3)	137(100)	0.603*

*Fisher's exact test. **Chi-square test.^aCarriers of risk allele in homo or heterozygosity ^bDQX = absence of the haplotypes DQ2.5 or DQ8

Table 4- Presence of risk alleles and gastrointestinal symptoms in patients with T1D

Gene (Polymorphism)		Presence of gastrointestinal symptoms		Absence of gastrointestinal symptoms		P
RGS1 (rs2816316)	AA [§] /AC	n	%	n	%	0.023*
	CC	79	100	201	93.9	
		0	0.0	13	6.1	
IL2/IL21 (rs6822844)	GG [§] /GT	n	%	n	%	0.387*
	TT	77	96.2	209	98.1	
		3	3.8	4	1.9	
BACH2 (rs11755527)	CC [§] /CG	n	%	n	%	0.834**
	GG	62	80.5	173	81.6	
		15	19.5	39	18.4	
TLR7/TLR8 (rs5979785)	TT [§] /TC	n	%	n	%	0.954**
	CC	65	84.4	175	84.1	
		12	15.6	33	15.9	
IL18RAP (rs917997)	AA [§] /A	n	%	N	%	0.048*
	G	44	55.7	91	42.7	
	GG	35	44.3	122	57.3	

[§]Risk allele. *Fisher's exact test. **Chi-square test.

Supplementary Material 1

Research Protocol number: _____

Initials of the name: _____ Registry: _____

Date of Birth: ____/____/____ .Sex: 1- Male () 2- Female ()

Person responsible for the information: 1- ()father 2-()mother 3-()patient 4-() other
— specify:

Dietary history:

Duration of breastfeeding exclusively: _____ months. () Was not undertaken () Don't know

Introduction of formulas: _____ months. () Was not undertaken () Don't know

Introduction of cow's milk: _____ months. () Was not undertaken () Don't know

Introduction of foods with gluten: _____ months. () Don't know

Age at diagnosis of diabetes: _____ Years

Do you have any persistent complaints of gastrointestinal symptoms?

() -Abdominal pain () Diarrhea () Vomiting () Constipation () Abdominal
distension () Anorexia () _____

() -No

Result of the examinations:

Transglutaminase IgA (U/ml): _____

IGA Total: _____

Duodenal biopsy (Histopathological Marsh score):

Supplementary Material 2

Presence of risk alleles and gastrointestinal symptoms in patients with CD

Gene (Polymorphism)		Presence of gastrointestinal symptoms		Absence of gastrointestinal symptoms		P**
		n	%	n	%	
RGS1 (<i>rs2816316</i>)	AA [§] /AC	15	100	18	94.7	1.000*
	CC	0	0	1	5.3	
IL2/IL21 (<i>rs6822844</i>)	GG [§] /GT	15	100	18	100	NA
	TT	0	0	0	0	
BACH2 (<i>rs11755527</i>)	CC [§] /CG	11	84.6	16	88.9	1.000*
	GG	2	15.4	2	11.1	
TLR7/TLR8 (<i>rs5979785</i>)	TT [§] /TC	13	92.9	13	81.2	0.602*
	CC	1	7.1	3	18.8	
IL18RAP (<i>rs917997</i>)	AA [§] /AG	9	60	7	38.9	0.227**
	GG	6	40	11	61.1	

§Risk allele. *Fisher test. **Chi-square test. NA = not assessed.

Supplementary Material 3

Non-HLA polymorphisms among the combinations of haplotypes for DQ2.5 and/or DQ8

Gene (Polymorphism)	Risk allele	DQ2.5/ DQ8 ^b	DQX ^a /DQX ^a	Total	P Value
RGS1 (rs2816316)	A n(%)	233(83.2)	47(16.8)	280(100)	0.235
L2/IL21 (rs6822844)	G n(%)	242(84.0)	46(16.0)	288(100)	0.595
BACH2 (rs11755527)	C n(%)	202(85.6)	34(14.4)	236(100)	0.217
TLR7/TLR8 (rs5979785)	C n(%)	203(84.6)	37(15.4)	240(100)	0.507
IL18RAP (rs917997)	A n(%)	116(84.7)	21(15.3)	137(100)	0.874

*Fisher test. **Chi-square test.

^aDQX = absence of the haplotypes DQ2.5 or DQ8

^b DQ2.5/ DQ8=presence of the haplotypes DQ2.5 and /or DQ8

ANEXO B- Artigo Original 2 em inglês

Elsevier Editorial System(tm) for Human

Immunology

Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Allelic Frequency for DQ2.5 and DQ8 with the Tag Single Nucleotide Polymorphism Technique in Patients with Type 1 Diabetes and Celiac Disease in a Population from the South of Brazil

Article Type: Research paper

Keywords: Type 1 diabetes; Celiac disease; Tag SNP; HLA haplotypes

Corresponding Author: Ms. Marília Dornelles Bastos,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul

First Author: Marília Dornelles Bastos

Order of Authors: Marília Dornelles Bastos; Thayne W Kowalski; Márcia Puñales; Balduino Tschiedel; Luiza Mariath; Ana LUiza G Pires; Lavínia Schuler-Faccini; Themis R Silveira

Abstract: The objective of this study was to evaluate the frequency of the alleles for DQ2.5 and for DQ8 with the tag single nucleotide polymorphism (tag SNP) technique, in patients with type I diabetes (T1D) and celiac disease (CD) from the south of Brazil. Three hundred and sixty-three individuals were evaluated, distributed as follows: 264 patients with T1D but without CD, 32 with both T1D and CD, and 66 with CD but without T1D. In 97% of the patients with T1D and CD, and in 76% of those with CD but without T1D, alleles DQ2.5 and/or DQ8 were identified. DQ2.5 was more frequent in patients with CD, while DQ8 was more frequent in patients with T1D. The prevalence of celiac patients without diabetes and with no DQ2.5 and DQ8 alleles present (24.2%) can be explained by the European ancestry existing in the region surveyed, for which there is an increased frequency of other risk alleles in patients with the disease. We concluded that there is a high negative predictive value for CD in patients with T1D when we research with the tag SNP technique; however, the high number of individuals with the DQ8 allele among the diabetics does not enable differentiation of those who are at greatest risk of CD. For greater sensitivity and specificity of the tests for patients from the south and southeast of Brazil, we recommend the inclusion of the DQ2.2 and DQ7 alleles.

Suggested Reviewers: Ludovica Segat

Genetics Service, IRCCS Burlo Garofolo Trieste, Italy
segat@burlo.trieste.it

Margarida Maria Castro-Antunes
Federal University of Pernambuco
margarida.mmcastro@gmail.com

Sergio Crovella
Federal University of Pernambuco

**Allelic Frequency for DQ2.5 and DQ8 with the Tag Single Nucleotide Polymorphism
Technique in Patients with Type 1 Diabetes and Celiac Disease in a Population from the
South of Brazil**

Marília Dornelles Bastos MD^{a b}

Thayne Kolwalski MSc^c

Márcia Puñales MD PhD^d

Balduino Tschiedel MD^d

Luiza Monteavaro Mariath MSc^c

Ana Luiza Guedes Pires MD PhD^a

Lavínia Schüler-Faccini MD PhD^{a c e}

Themis Reverbel da Silveira MD PhD^{a f}

^a Post-Graduation Program in Adolescent and Child Health, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b University of Santa Cruz do Sul - UNISC, Santa Cruz do Sul, RS, Brazil.

^c Department of Genetics, University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^d Institute for Children with Diabetes- Children's Hospital, Grupo Hospitalar Conceição, Porto Alegre, Brazil

^e INaGeMP—Instituto Nacional de Genética Médica Populacional, Porto Alegre, Brazil

^f Children's Hospital Santo Antônio, Porto Alegre, Brazil

Address correspondence and reprint request:

Marília Dornelles Bastos

Telephone number: 555192263336

Fax number: 555137158177

mdbastos@unisc.br

The authors report no conflicts of interest

Abstract

The objective of this study was to evaluate the frequency of the alleles for DQ2.5 and for DQ8 with the tag single nucleotide polymorphism (tag SNP) technique, in patients with type I diabetes (T1D) and celiac disease (CD) from the south of Brazil. Three hundred and sixty-three individuals were evaluated, distributed as follows: 264 patients with T1D but without CD, 32 with both T1D and CD, and 66 with CD but without T1D. In 97% of the patients with T1D and CD, and in 76% of those with CD but without T1D, alleles DQ2.5 and/or DQ8 were identified. DQ2.5 was more frequent in patients with CD, while DQ8 was more frequent in patients with T1D. The prevalence of celiac patients without diabetes and with no DQ2.5 and DQ8 alleles present (24.2%) can be explained by the European ancestry existing in the region surveyed, for which there is an increased frequency of other risk alleles in patients with the disease. We concluded that there is a high negative predictive value for CD in patients with T1D when we research with the tag SNP technique; however, the high number of individuals with the DQ8 allele among the diabetics does not enable differentiation of those who are at greatest risk of CD. For greater sensitivity and specificity of the tests for patients from the south and southeast of Brazil, we recommend the inclusion of the DQ2.2 and DQ7 alleles.

Keywords:

Type 1 diabetes, Celiac disease, Tag SNP, HLA haplotypes

Abbreviations:

ACELBRA- Associação dos Celíacos do Brasil (Celiac Association of Brazil)

CD- Celiac Disease

HLA- Human leukocyte antigen

ICD- Instituto da Criança com Diabetes (Institute for Children with Diabetes)

IgA- Immunoglobulin A

PCR- Polymerase chain reaction

PPG-SCA- Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente (Pós Graduate Program in Child and Adolescent)

SBT- Sequence based typing

SSO- Sequence-specific probes

SSP- Sequence-specific primers

T1D- Type 1 Diabetes

Tag-SNP- Tag-single-nucleotide polymorphism

TTG- Tissue Transglutaminase

UFRGS- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Federal University of Rio Grande do Sul)

UNISC- Universidade de Santa Cruz do Sul (University of Santa Cruz do Sul)

1. Introduction

Celiac disease (CD) is a chronic and permanent enteropathy caused by an intolerance to the gluten proteins of wheat, rye, and barley in genetically predisposed individuals[1]. The immunological basis of CD results from an imbalance in the innate and adaptive immune system. Under these conditions, the gliadin (main toxic component of gluten) crosses the intestinal epithelium, subsequently activating the adaptive immune system and causing an increase in intestinal permeability. The peptides contained in the gluten cross the lamina propria, where they can be stripped by the tissue transglutaminase (TTG) enzyme. Such peptides are displayed by the HLA class II (DQ2 and DQ8) molecules that promote the activation of the effector cells of the tissue inflammation seen in CD: CD4 T helper lymphocytes [2]. The alleles HLA-DQA1*05 and DQB1*02 have a high negative predictive value; however, approximately 40% of the population has one or both alleles[3][4].

There is a great variation in the prevalence of CD in different countries. In Europe and the United States, the prevalence varies between 1 and 3% in the general population [5]. The prevalence of biopsy-proven CD in studies conducted in Brazil up until now has varied between 0.15 and 1.94% [6].

Individuals with type 1 diabetes (T1D) have a higher prevalence of CD. A recent systematic review described prevalence of between 1.6 and 16.4% for CD in individuals with T1D — screening from the age of two onwards was recommended for this population [7]. The prevalence of CD in individuals with T1D included in this study is 5.1% [8].

HLA genes play an important role in autoimmune diseases like CD and T1D. Thus, their identification in patients with such diseases is very important for understanding aspects related to higher or lower susceptibility, as well as in understanding the different clinical presentations. Genotyping is performed using methods based on polymerase chain reaction

with: sequence-specific oligonucleotide probing (PCR-SSO), with sequence specific primers (PCR-SSP), or sequence-based typing (PCR-SBT). However, these traditional techniques for genotyping involve many reactions, thus making them complicated and expensive. Monsuur et al. [9] validated a technique using tag single nucleotide polymorphisms (tag SNP), which enables the tests to be performed with a high degree of sensitivity and specificity, and at a lower cost.

The HLA system is very polymorphic and varies between different geographical areas and ethnicities. Brazil is a country with a high level of miscegenation and large variations between regions. A recent study identified African ancestry in 50% of the northeast population and European ancestry in 70% of the south and southeast of the country [10]. There are no studies on the investigation of the HLA DQ2 and DQ8 genes in individuals with CD and T1D in the country's south region.

The objective of this study was to evaluate the frequency of the alleles for DQ2.5 and for DQ8 with the tag SNP technique, in patients with both T1D and CD, in a population from the south of Brazil.

2. Methods

2.1. Study design and population

The prospective design, which was developed in the period between August, 2012 and October, 2014, involved: patients with a T1D diagnosis being treated in the Institute for Children with Diabetes (ICD) at the Conceição Children's Hospital, located in the city of Porto Alegre, which is the capital of the state of Rio Grande do Sul, Brazil; and people with a

CD diagnosis, confirmed by duodenal biopsy, who are living in Porto Alegre and participate in the Celiac Association of Brazil (ACELBRA).

Of the patients with T1D, on the day that they underwent periodic evaluation for diabetes control, after authorization to participate in the study, samples of blood and/or saliva were collected. Among these patients, those who had TTG-IgA less than 9.0 U/ml or TTG-IgA greater than 16 U/ml and a duodenal biopsy compatible with a histopathological Marsh score of 2 or more, were identified[11,12]. Excluded from the evaluation were: patients with TTG-IgA values between 9.0 and 16 U/ml; and those with values above 16 U/ml who not had a duodenal biopsy done or who had a histopathological Marsh score lower than 2.

During an event sponsored by ACELBRA, authorization to participate in the study was requested from the people diagnosed with CD. Saliva samples were collected and an interview was done to identify those who had the diagnosis confirmed by biopsy. Excluded from the evaluation were patients who had not done a duodenal biopsy or for whom the diagnosis was doubtful.

2.2. Laboratory Methods

2.2.1. DNA extraction

A peripheral blood sample (10 ml of total blood with anticoagulant) was collected for later DNA extraction by the salting out method [13]. When collection of the blood was not possible, a saliva sample was collected via the Oragene kit (DNA Genotek®) and subjected to DNA extraction in accordance with the manufacturer's instructions.

2.2.2. Haplotypic determination of HLA-DQ2.5 and HLA-DQ8

Prediction of the haplotypes of HLA-DQ2.5 and HLA-DQ8 was done based on the tag SNP approach. The real-time polymerase chain reaction (real-time PCR) technique was performed through TaqMan® genotyping assays (Applied Biosystems, USA), in accordance with the manufacturer's instructions. The assays utilized had previously been deposited in the custom TaqMan Genotyping Assay (Applied Biosystems) and included: C_58662585_10 (rs2187668 C>T of HLA-DQA1) and C_29817179_10 (rs7454168 C>T of HLA-DQB1). Analysis of the results and the genotypic determination of the SNPs were done via the StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems). The haplotypes of DQ2.5 and DQ8 were predicted based on the genotypes identified, as described by Monsuur et al. [9] and Brandão et al.[14]

2.3. Statistical Analyses

The statistical analyses were done in SPSS v.20. The chi-square test or Fisher's exact test were used to compare the frequencies of the haplotypes HLA-DQ2.5 and DQ8 between the groups of patients with T1D, with CD, and with both (T1D +CD) — bicaudal P values less than 0.05 were considered to be significant.

2.4. Ethical considerations

The study was approved by the ethics committees of both the Conceição Children's Hospital and the Federal University of Rio Grande do Sul. At the time of filling in the protocol, authorization for participation in the study was requested from the patient or the person responsible for the patient, through the reading and signing of the terms of consent.

3. Results

Three hundred and sixty-three (363) individuals were evaluated, distributed into three groups as follows: 264 with T1D and negative antibodies for CD (group 1), 32 with T1D and with a diagnosis of CD (group 2), and 66 with CD but without a diagnosis of T1D (group 3).

Table 1 shows the distribution of the combined haplotypes of DQ2.5 and DQ8 in the three groups, in which the presence of at least one allele (DQ2.5 or DQ8) can be seen in 97% of the patients of the group with T1D and CD (group 2) and in 76% of the individuals with CD but without a diagnosis of T1D (group 3).

The presence of the alleles of DQ2.5 occurred in 170 (57.4%) of individuals with T1D (groups 1 and 2), being more frequent in the group with a diagnosis of CD (group 2). The presence of the alleles of DQ8 occurred in 160 (54.1%) individuals with T1D, and there was no difference between the groups with or without CD (Table 2).

When we compared the patients who have T1D and a CD diagnosis (group 2) with the CD patients who do not have a T1D diagnosis (group 3), there was no significant difference observed between the groups for the alleles of DQ2. However, the patients of group 2 had a significantly higher frequency for the allele DQ8 (Table 3).

Table 4 shows the comparison between: patients who have T1D and negative serology for CD (group 1), and the patients with a CD diagnosis who may or may not have T1D (groups 2 and 3). We observed that the DQ2 allele had greater prevalence in all of the groups, while the DQ8 allele was more prevalent only in the group which has T1D.

4. Discussion

Our study aimed to evaluate the distribution of HLA DQ2.5 and DQ8 in patients with T1D and patients with CD in a population in the south of Brazil, for which it was possible to confirm the high negative predictive value of the test in the group of patients with T1D. In a review of the practical implications of identifying HLA risk alleles in patients with CD, Margiorni & Pissuti [15] reaffirmed the importance of the negative tests as a more significant valuation. Performing the genotyping using the tag SNP technique has already been validated in patients with T1D and CD, and is considered to be effective and less costly, thus allowing the realization of population screening studies [9,16,17]. Brandão et al. [14] used the same technique on patients in northeast Brazil and noted the increased risk of developing T1D with the DQ2.5 and DQ8 combination. In a study conducted in Italy with 1,005 patients who have CD, genotyping of the haplotypes DQ2.5, DQ8, DQ2.2, and DQ7 was done and then compared with the traditional technique by PCR-SSP. High sensitivity and specificity were obtained, thus the process was recommended for population screening, and it was suggested that studies in other population groups be done [18].

Mergiorni et al. [19] established a risk gradient for CD based on the HLA DQ, and they also defined as a greater risk the combination of haplotypes DQ2 and DQ8. We found that 27% of the patients with T1D (group 1) and 31% of the patients with T1D and CD (group 2) had this combination of haplotypes; while in the group with CD but without T1D (group 3), the concomitant haplotypes occurred in 7.6% — in this group there was a higher number of individuals with only DQ2.5 alleles.

Patients with T1D have a higher risk of CD, regardless of their age; however, because both diseases are associated with the HLA DQ genotypes, the research on HLA-DQ2 and

DQ8 is not always useful for identifying predisposed groups [20]. The difference in the frequency of the DQ8 alleles verified in Table 4 confirms this difficulty encountered in the search for risk alleles for CD in the three groups studied. We found that the alleles for DQ2.5 were more prevalent among patients with CD; however, the DQ8 alleles are more frequent in patients with T1D, and it is not possible to differentiate between the group with and without CD.

Despite us observing a high negative predictive value in patients with T1D and CD, in the group with CD but without T1D, 24% did not have the haplotypes for DQ2.5 and DQ8. Karel et al. [21] evaluated populations from different European countries and researched the haplotypes DQA1*05 and DQB1*02 for DQ2, and DQA1*03 DQB1*0302 for DQ8, and they found a heterogeneous distribution with a higher prevalence of negative DQ2 and DQ8 in Italy, when compared with France, Finland, and England. Koskinen et al. [22] evaluated risk haplotypes for CD in three countries, and in the group of Italian patients they identified the presence of the alleles for DQ2.2 (DQB1*0202 and DQA1*0201) and DQ7 (DQB1*0301) in 27% and 18%, respectively. In a study done in southeast Brazil, Kotze et al. [23] found that 8.9% of individuals with CD had negative DQ2 and/or DQ8 alleles, which alerts to the high rate of miscegenation in Brazil. Considering that this present study was conducted in a region of Brazil with a high prevalence of Italian immigrants, and remembering the higher rate of European ancestry in the south and southeast of the country [10], the possibility of an increased occurrence of other DQ risk alleles, different from DQ2.5, should be considered. The investigation of the alleles DQA1*0501 and DQB1*0201 allowed us to identify the DQ2.5 patients, but we did not identify the DQ2.2 and DQ7 patients.

5. Conclusions

The investigation of the DQ2.5 and DQ8 alleles by the technique described enables a high negative predictive value to be attained for the diagnosis of CD in the population of patients with T1D, similar to that described in the literature for the conventional technique.

We observed a high frequency of the allele for DQ8 in individuals with T1D when compared with individuals who have CD but not T1D. Thus, the presence of this allele in patients with T1D does not indicate increased risk of CD in the population studied.

Considering the miscegenation of the existing population in Brazil, we recommend the inclusion of the investigation of the alleles for DQ2.2 and DQ7 in the south and southeast regions of Brazil, in order to increase the sensitivity and specificity in the investigation of risk for CD.

6. References:

- [1] D. Schuppan, Y. Junker, D. Barisani, Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies, *Gastroenterology*. 137 (2009) 1912–1933. doi:10.1053/j.gastro.2009.09.008.
- [2] A. Rubio-Tapia, J.A. Murray, Celiac disease, *Curr. Opin. Gastroenterol.* 26 (2010) 116–122. doi:10.1097/MOG.0b013e3283365263.
- [3] J. Romanos, A. Rosen, V. Kumar, G. Trynka, L. Franke, A. Szperl, et al., Improving coeliac disease risk prediction by testing non-HLA variants additional to HLA variants, *Gut*. 63 (2014) 415–422. doi:10.1136/gutjnl-2012-304110.
- [4] C. Wijmenga, J. Gutierrez-Achury, Celiac Disease Genetics, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 59 (2014) S4–S7. doi:10.1097/01.mpg.0000450392.23156.10.
- [5] J. Gutierrez-Achury, R. Coutinho de Almeida, C. Wijmenga, Shared genetics in coeliac disease and other immune-mediated diseases, *J. Intern. Med.* 269 (2011) 591–603. doi:10.1111/j.1365-2796.2011.02375.x.
- [6] D. Diniz-Santos, A. Machado, L. Silva, Doença Celíaca, in: E. de Carvalho, L.R. Silva, C.T. Ferreira (Eds.), *Gastroenterol. E Nutr. Em Pediatr.*, Manole, São Paulo, 2012: pp. 359–403.
- [7] K.C. Donaghue, G. Ambler, H. Phelan, S. Twigg, M.E. Craig, Screening for Celiac Disease in Type 1 Diabetes: A Systematic Review, *Pediatrics*. 136 (2015) e170–e176. doi:10.1542/peds.2014-2883.
- [8] A.R.L. Ramos, R.B. Pinto, M.D. Bastos, V. Provenzi, C. Geremia, M.A. Soledade, et al., Rastreamento de Doença Celíaca em Pacientes com Diabetes Mellitus Tipo 1, in: *IV Simp. Latinoam. Enferm. Celíaca*, Buenos Aires-Argentina, 2015. <http://enfermedadesintestinales2015.com/>.

- [9] A.J. Monsuur, P.I.W. de Bakker, A. Zhernakova, D. Pinto, W. Verduijn, J. Romanos, et al., Effective Detection of Human Leukocyte Antigen Risk Alleles in Celiac Disease Using Tag Single Nucleotide Polymorphisms, *PLoS One*. 3 (2008) e2270. doi:10.1371/journal.pone.0002270.
- [10] F.S.G. Kehdy, M.H. Gouveia, M. Machado, W.C.S. Magalhães, A.R. Horimoto, B.L. Horta, et al., Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112 (2015) 8696–8701. doi:10.1073/pnas.1504447112.
- [11] M. Marsh, Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine: a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (“celiac sprue”), *Gastroenterology*. 102 (1992) 330–54.
- [12] G. Oberhuber, G. Granditsch, H. Vogelsang, The histopathology of CD: time for standardized report scheme for pathologists., *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 11 (1999) 1185–94.
- [13] D.K. Lahiri, J.I. Nurnberger, A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies., *Nucleic Acids Res.* 19 (1991) 5444. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=328920&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [14] Brandao L C, S. Vatta, R. Guimaraes, L. Segat, J. Araujo, J.L. De Lima Filho, et al., Rapid genetic screening for major human leukocyte antigen risk haplotypes in patients with type 1 diabetes from Northeastern Brazil, *Hum. Immunol.* 71 (2010) 277–280. doi:10.1016/j.humimm.2009.12.008.

- [15] F. Megiorni, A. Pizzuti, HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing, *J. Biomed. Sci.* 19 (2012) 88. doi:10.1186/1423-0127-19-88.
- [16] E.H. Lavant, D.J. Agardh, A. Nilsson, J.A. Carlson, A new PCR-SSP method for HLA DR-DQ risk assessment for celiac disease, *Clin. Chim. Acta.* 412 (2011) 782–784. doi:10.1016/j.cca.2010.12.033.
- [17] P.I.W. de Bakker, G. McVean, P.C. Sabeti, M.M. Miretti, T. Green, J. Marchini, et al., A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC, *Nat. Genet.* 38 (2006) 1166–1172. doi:10.1038/ng1885.
- [18] S. Vatta, A. Fabris, L. Segat, T. Not, S. Crovella, Tag–single nucleotide polymorphism–based human leukocyte antigen genotyping in celiac disease patients from northeastern Italy, *Hum. Immunol.* 72 (2011) 499–502. doi:10.1016/j.humimm.2011.03.008.
- [19] F. Megiorni, B. Mora, M. Bonamico, M. Barbato, R. Nenna, G. Maiella, et al., HLA-DQ and risk gradient for celiac disease., *Hum. Immunol.* 70 (2009) 55–9. doi:10.1016/j.humimm.2008.10.018.
- [20] I.R. Korponay-Szabó, R. Troncone, V. Discepolo, Adaptive diagnosis of coeliac disease, *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 29 (2015) 381–398. doi:10.1016/j.bpg.2015.05.003.
- [21] K. Karell, A.S. Louka, S.J. Moodie, H. Ascher, F. Clot, L. Greco, 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, *Hum. Immunol.* 64 (2003) 469–477. doi:10.1016/S0198-8859(03)00027-2.

- [22] L. Koskinen, J. Romanos, K. Kaukinen, K. Mustalahti, I. Korponay-Szabo, D. Barisani, et al., Cost-effective HLA typing with tagging SNPs predicts celiac disease risk haplotypes in the Finnish, Hungarian, and Italian populations., *Immunogenetics*. 61 (2009) 247–56. doi:10.1007/s00251-009-0361-3.
- [23] L.M. da S. Kotze, R. Nisihara, S.R. da R. Utiyama, L.R. Kotze, Letters to the Editor, *Rev. Esp. Enfermedades Dig.* 106 (2014) 561–562.

Table 1- Combination of haplotypes for DQ2.5 e DQ8

Haplotypes	Group 1	Group 2	Group 3
	T1D without CD	T1D with CD	CD without T1D
	n(%)	n(%)	n(%)
DQ2.5/DQ2.5	23(8.7)	7(21.9)	9(13.6)
DQ2.5/DQX ^a	50(18.9)	9(28.1)	28(42.4)
DQ2.5/DQ8	71(26.9)	10(31.3)	5(7.6)
DQ8/DQ8	16(6.1)	0(0.0)	1(1.5)
DQ8/DQX ^a	58(22.0)	5(15.5)	7(10.6)
DQX ^a /DQX ^a	46(17.4)	1(3.1)	16(24.2)
Total	264(100)	32(100)	66(100)

n=number of individuals analyzed ^aDQX= non-HLA DQ2.5 ou DQ8 haplotypes

P<0.001

Table 2- Presence of alleles DQ2.5 and DQ8 among patients with T1D

HLA	Group 1 T1D without CD n(%)	Group 2 T1D with CD n(%)	P
DQX ^a	120 (45.5)	6 (18.8)	0.004
DQ2.5	144 (54.5)	26 (81.2)	
DQX ^a	119(45.1)	17 (53.1%)	0.388
DQ8	145 (54.9)	15(46.9%)	

n=number of individuals analyzed ^aDQX= non-HLA DQ2.5 ou DQ8 haplotypes

Table 3- Presence of alleles DQ2.5 and DQ8 among patients with T1D with CD and CD without T1D

HLA	Group 2 T1D with CD n(%)	Group 3 CD without T1D n(%)	P
DQX ^a	6(18.8)	24(36.4)	0.102
DQ2.5	26(81.2)	42(63.6)	
DQX ^a	17(53.1)	53(80.3%)	0.008
DQ8	15(46.9)	13(19.7%)	

n=number of individuals analyzed ^a DQX= non-HLA DQ2.5 ou DQ8 haplotypes

Table 4- Presence of alleles DQ2.5 and DQ8 among patients with T1D without CD and patients with a CD diagnosis who may or may not have T1D

HLA	Group 1 T1D without CD n(%)	Group 2 and 3 CD n(%)	P
DQX ^a	120(45.5)	30(30.6)	0.011
DQ2.5	144(54.5)	68(69.4)	
DQX ^a	119(45.1)	70(71.4)	<0.001
DQ8	145(54.9)	28(28.6)	

n=number of individuals analyzed ^a DQX= non-HLA DQ2.5 ou DQ8 haplotypes

Anexo C – Produção Científica Durante o Doutorado

Bastos MD, da Silveira TR. Doença celíaca e alterações hepáticas: uma revisão. Bol Cient Pediatr. 2013;02(3):83-8. Artigo submetido em 07.11.13, aceito em 22.01.14

Doença Celíaca e alterações hepáticas: uma revisão

Celiac disease and liver disorders: a review

Marília Dornelles Bastos¹

Themis Reverbel da Silveira²

1-Gastroenterologista e Endoscopista pediátrica. Mestre em Pediatria pela UFRGS. Professora do Curso de Medicina UNISC.2-Doutora em Genética e Biologia Molecular pela UFRGS. Professora dos Programas de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente e de Ciências em Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da UFRGS. Diretora Médica do Hospital da Criança Santo Antônio.

Resumo

As alterações hepáticas são algumas das manifestações extraintestinais que podem ocorrer na Doença Celíaca (DC). Pode haver uma base imunológica ou estar relacionada com o aumento da permeabilidade intestinal. Há evidências que o reconhecimento precoce e o tratamento da DC nas crianças e adolescentes com hepatopatias podem melhorar a função do fígado e prevenir complicações futuras. Por outro lado, a pesquisa das enzimas hepáticas em pacientes portadores de DC pode levar ao diagnóstico precoce de hepatopatias com seu conseqüente tratamento adequado. As principais alterações hepáticas relacionadas com a DC se dividem em Lesão Hepática Criptogênica, Doença Hepatobiliar Autoimune e outras como: Hepatites virais, Doenças Hepática Gordurosa não alcoólica, Hemocromatose e Doença de Wilson. Dessa forma, a pesquisa de hepatopatias em pacientes portadores de DC e vice-versa é uma recomendação atual.

Descritores: Doença Celíaca, Hepatopatias, Aminotransferases, Transglutaminase Tecidual.

Abstract

Hepatic changes are some of the extraintestinal manifestations that may occur in celiac disease (CD). It may have an immunological basis, or be related to increased intestinal permeability. There is evidence that early recognition and treatment of CD in children and adolescents with liver disease may improve liver function and prevent future complications. On the other hand, the research of liver enzymes in patients with CD can lead to early diagnosis of liver disease with its consequent treatment. The main hepatic changes related to DC are divided in Cryptogenic Liver Injury, Hepatobiliary Autoimmune Disease and other diseases such as: viral hepatitis, nonalcoholic fatty liver disease, hemochromatosis and Wilson's disease. Thus, the research of liver disease in patients with DC and vice versa is a current recommendation.

Keywords: Celiac Disease, Liver Disease, Aminotransferases, Tissue Transglutaminase.

A Doença Celíaca (DC) é uma enteropatia crônica e permanente provocada por intolerância às proteínas do glúten do trigo, centeio, cevada em sujeitos geneticamente predispostos. A ingestão desses cereais por pacientes celíacos ocasiona inflamação intestinal, atrofia nas vilosidades, hiperplasia de criptas, com diferentes tipos de sintomas e condições que afetam diversos órgãos. Devido aos sintomas extraintestinais e às formas silenciosas, a doença frequentemente não é diagnosticada e pode acarretar graves complicações.(1,2)

A base imunológica da Doença Celíaca resulta de um desequilíbrio do sistema imune inato e adaptativo. Nessas condições, a gliadina (principal componente tóxico do glúten) atravessa o epitélio intestinal ativando o sistema imune adaptativo, resultando em aumento da permeabilidade intestinal. A partir da dieta com glúten, os peptídeos atravessam a lâmina própria, onde podem ser deamidados pela enzima transglutaminase tecidual (TTG). Tais peptídeos são apresentados pelas moléculas HLA classe II que promovem a ativação das células efectoras da inflamação tecidual vista na DC: linfócitos CD4 T helper. (3). A patogênese dessa doença está demonstrada na Figura 1.

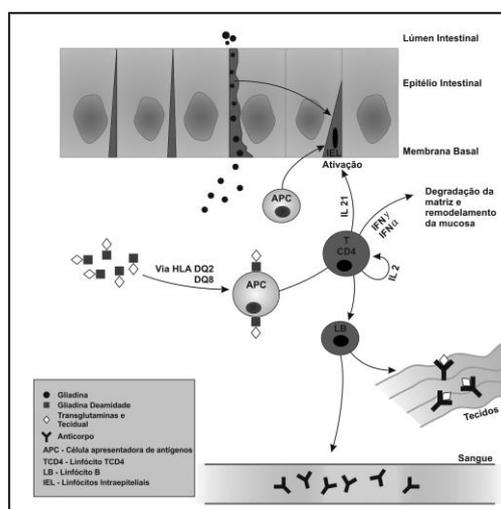


Figura 1 Patogênese da Doença Celíaca

A região do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), especificamente os genes HLA de classe II, representa o principal fator genético de risco para desenvolvimento de DC. Esses genes correspondem a aproximadamente 35% da herdabilidade genética, sendo que 95% dos pacientes celíacos expressam o heterodímero HLA-DQ2 e os 5% restantes expressam o HLA-DQ8. (Ghawil et al.,2012) (5)(6). Segundo Megiorni e colaboradores (7), a associação entre essas moléculas e o desenvolvimento de DC é explicada pela alta afinidade de ligação que elas possuem pelos peptídeos derivados da gliadina, existentes no glúten. A ocorrência dessa ligação resulta em uma resposta imune que leva à geração de anticorpos específicos e à secreção de citocinas inflamatórias, fator de necrose tumoral e interferon, os quais ocasionam as manifestações clínicas da doença (8).

Diversas classificações têm sido usadas, principalmente com a distinção entre Doença Celíaca clássica, atípica, assintomática, latente e potencial. Porém, atualmente, os sintomas atípicos têm sido considerados mais frequentes que os sintomas clássicos e, por tal motivo, a Sociedade Europeia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN) recomenda a utilização da seguinte nomenclatura em casos de DC(9):

- **Sinais e sintomas gastrointestinais:** Diarreia crônica, constipação, distensão abdominal, vômitos, anorexia, dor abdominal e irregularidade de hábito intestinal.
- **Sinais e sintomas extraintestinais:** Anemia, neuropatia, diminuição da densidade óssea, perda de peso, baixa estatura, irritabilidade, aumento de enzimas hepáticas e fadiga crônica.

- **Doença Celíaca Silenciosa:** Presença de anticorpos específicos. HLA e biópsia intestinal compatível com Doença Celíaca, porém sem sinais e sintomas suficientes para provocar uma suspeita clínica.
- **Doença Celíaca Latente:** Presença de HLA compatível, sem enteropatia, mas que apresentará enteropatia em outro momento de sua vida. Poderá ou não ter sintomas e/ou anticorpos específicos positivos.
- **Doença Celíaca Potencial:** Presença de anticorpos específicos e HLA compatível, mas sem anormalidades histológicas na biópsia duodenal. O paciente pode ou não apresentar sinais e sintomas, assim como desenvolver enteropatia posteriormente.

A associação entre DC e manifestações hepáticas foi relatada pela primeira vez em 1977. Hagander e colaboradores (10) realizaram um estudo com 74 pacientes adultos com diagnóstico de DC dos quais 16% apresentavam evidência histológica de lesão hepática e 39% com elevação de aminotransferases. Os autores sugeriram que a origem de tais alterações fosse causada tanto por reações autoimunes como pelo dano da mucosa intestinal..

A patogênese de lesão hepática na DC ainda necessita de estudos. A hipótese mais aceita é baseada na permeabilidade intestinal que favorece a absorção de toxinas, antígenos e substâncias inflamatórias via circulação portal.(11). Outros mecanismos citados são: má absorção ou desnutrição crônica; (sobrecrescimento bacteriano intestinal; inflamação crônica intestinal; predisposição genética(12). Em uma revisão realizada no período de 1977 a 2010 (13), os autores também

atribuíram o mecanismo de tal relação a fatores de permeabilidade intestinal. No entanto, em doenças como *sprue tropical*, onde também ocorre aumento da permeabilidade intestinal, foi observada elevação de enzimas hepáticas.

Volta e colaboradores alertam que o reconhecimento precoce e o tratamento da DC em pacientes com comprometimento hepático podem melhorar a função hepática e prevenir complicações (12). Uma prevalência de 17,5% de elevação de aminotransferases foi observada em 245 pacientes entre 15 a 80 anos com DC (11).

Na população pediátrica, a relação entre anormalidades hepáticas e DC também é observada. Newton e Singer (14) incluem a elevação de aminotransferases como uma das indicações clínicas de se realizar triagem para DC em crianças e adolescentes (**Tabela 1**). Vajro e colaboradores (15) realizaram uma meta-análise para avaliar a prevalência de DC em crianças com lesão hepática criptogênica e vice-versa. Encontraram uma prevalência de 12% de DC confirmada por biópsia em um estudo com pacientes com lesão hepática criptogênica e quatro estudos demonstraram prevalência de elevação de enzimas hepáticas em 26 a 40% das crianças portadoras de DC.

Tabela 1: Achados clínicos de DC pediátrica e indicações para triagem

Manifestações gastrointestinais	Manifestações extraintestinais	Condições associadas	Síndromes genéticas associadas
Dor abdominal recorrente	Estomatite aftosa	Diabetes tipo 1	Síndrome de Down
Diarreia Crônica ou recorrente	Hipoplasia do esmalte dentário	Doenças autoimunes da tireoide	Síndrome de Turner
Constipação	Dermatite Herpetiforme	Hepatite Autoimune	Síndrome de Williams
Vômitos	Baixa estatura/baixo peso	História Familiar de DC	Deficiência Seletiva de IGA
Anorexia	Puberdade retardada		
Perda de peso	Redução da densidade mineral óssea/osteoporos e		
Déficit de crescimento	Anemia		
	Elevação de aminotransferases		

Adaptado de Newton e Singer(14)

De acordo com a Tabela 2, a caracterização das doenças hepáticas relacionadas com DC pode ser dividida em três grupos: criptogênicas, autoimunes e outras.

Tabela 2: caracterização das doenças hepáticas relacionadas a DC. Zali et al. 2011, R(16)

1-Lesão Hepática Criptogênica	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatite induzida pelo glúten: <ul style="list-style-type: none"> ○ Forma leve ○ Forma severa
2-Doença Hepatobiliar Autoimune	<ul style="list-style-type: none"> • Cirrose Biliar Primária (CBP) • Colangite Esclerosante primária (CEP) • Hepatite Autoimune (HAI) • Colangite Autoimune
3-Outras doenças hepáticas	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatite Viral • Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) • Esteato-hepatite não alcoólica(EHNA) • Hemocromatose • Doença de Wilson •

1- **Lesão hepática Criptogênica:** É conhecida como “hepatite induzida pelo glúten” ou “hepatite celíaca” e é caracterizada por inflamação periportal, hiperplasia de células de Kupffer, infiltrado mononuclear na ausência de achados clínicos de doença hepática crônica, ausência de hipergamaglobulinemia e ou autoanticorpos. Essa forma é reversível se o paciente realizar dieta isenta de glúten, observando-se uma normalização das enzimas hepáticas em 6 a 12 meses (13)(17).

2- **Doença hepatobiliar Autoimune:** A relação entre Cirrose biliar primária (CBP) e DC tem sido relatada na literatura desde 1978, sendo recomendada a realização de triagem sorológica para DC. Sugere-se a presença de mecanismos autoimunes que agridem o epitélio biliar e o intestino delgado. A resposta à dieta isenta de glúten é variável, tendo sido observada a persistência dos títulos de anticorpo antimitocôndria mesmo nos pacientes que realizam dieta isenta de glúten (13). Casella e colaboradores (11), em um estudo abordando as causas de função hepática alterada em pacientes com DC, encontrou 43 pacientes com alterações hepáticas e entre eles havia dois pacientes com CBP confirmada por biópsia hepática. Tais pacientes estavam no grupo que não respondeu à dieta isenta de glúten. Outro fator importante em relação a essa doença é o fato de haver casos descritos de falsos positivos na triagem sorológica para DC devido à reação cruzada com os antígenos mitocondriais e à anti-transglutaminase tecidual (anti tTG).

A associação entre Colangite Esclerosante Primária (CEP) e DC não está bem

esclarecida devido ao pequeno número de pacientes avaliados até o momento. Parece haver associação com os fenômenos imunológicos específicos de cada doença.

Três estudos descritos em uma meta-análise que envolveu 206 pacientes pediátricos com hipertransaminasemia criptogênica e HAI, a prevalência de DC foi de 3,6% a 12,5%. Os autores concluem que a pronta investigação de DC em pacientes com HAI pode proporcionar um tratamento dietético precoce prevenindo ou atenuando complicações da DC. Da mesma forma, a detecção de estigmas de HAI em pacientes com DC poderá antecipar um tratamento imunossupressor prevenindo assim a piora da lesão hepática (15). Os estudos realizados em adultos foram revisados em uma meta-análise (18) que encontrou uma prevalência de DC em 2 a 4% dos pacientes com HAI, recomendando a triagem para DC nesses pacientes.

3- **Outras doenças hepáticas:** Relatamos inicialmente algumas considerações especiais sobre as hepatites virais. No caso da Hepatite B, a maior preocupação encontra-se na resposta vacinal inadequada. Várias hipóteses existem para explicar tal fenômeno, mas a predisposição genética é a principal. Pacientes com haplótipos específicos de HLA (HLA B8,DR e DQ2) respondem mal à vacina, mesmo sem ter manifestações clínicas da doença.(19). Em estudo realizado na China, os autores identificaram polimorfismos específicos entre indivíduos não respondedores à vacina da Hepatite B e sugerem mais estudos para otimizar as estratégias de vacinação em

populações específicas (20). Na Tabela 3 estão as recomendações de Vitaliti e colaboradores em revisão recente.

Tabela 3: Recomendações de vacinação contra Hepatite B em portadores de DC. (19) .

-
- Todo paciente com DC deve ser revacinado para atingir a meta de proteção universal;
 - A revacinação deve ocorrer após um ano de dieta isenta de glúten;
 - A via de administração mais indicada para a dose de reforço é a intradérmica, por apresentar resposta imune satisfatória com menor dose da vacina,
 - Revacinar a cada 10 anos todo paciente celíaco, independente de seu estado imunológico.
-

Apesar de não haver uma explicação clara para a relação entre a Hepatite C e a doença celíaca, é observada uma maior prevalência de DC em pacientes portadores de Hepatite C, quando comparado com a população em geral (16). A lesão hepática causada pelo vírus C pode estar relacionada com a perda de tolerância aos próprios antígenos, desencadeando reações autoimunes como também acontece nos casos de Crioglobulinemia, Liquen Plano, Glomerulonefrite Membranoproliferativa, Porfíria e Tireoidite (21),(22). No Brasil se pesquisou autoanticorpos em indivíduos com Hepatite C crônica e se identificou 5,8% de anticorpo antiendomísio positivo, mas não se encontrou nenhum caso de transglutaminase positiva, concluindo-se que essa associação entre DC e Hepatite C crônica ainda permanece pouco definida.(23). Porém, a relação melhor estabelecida até o momento está com o tratamento da Hepatite C, pelo qual pessoas com predisposição genética (HLA DQ2 e DQ8) ,

diante de um estímulo imunológico proporcionado pelo Interferon Gama e Ribavirin, desenvolvem sintomas de DC.(24) (16). Zali e colaboradores (13) recomendam que a DC deva ser pensada antes de se iniciar o tratamento da Hepatite C com Interferon e Ribavirin. Lembram também que a ocorrência de diarreia, após o início do tratamento com as referidas drogas, pode estar relacionada com a DC até então silenciosa.

A Doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é considerada uma das formas mais frequentes de doença crônica do fígado tanto em crianças como em adultos. Seu espectro histológico varia desde o acúmulo exclusivo de gordura nos hepatócitos sem outro fenômeno associado (esteatose hepática simples) até presença de lesões necroinflamatórias associadas ou não a fibrose (esteato-hepatite não alcoólica) (EHNA)(25) .A associação dessa condição com DC anda não está bem estabelecida, apesar de diversos estudos relatarem DHGNA em portadores de DC. Sugere-se que possa haver coincidência, uma vez que a presença de fígado gorduroso afeta 10 a 24% da população em geral.(16)(11).Para esclarecer melhor essa associação Kälisch e colaboradores (26) realizaram um estudo com pacientes portadores de DC e pacientes portadores de EHNA, sugerindo que a patogênese comum entre essas doenças seja o "stress" presente em ambas, avaliado a partir de marcadores específicos: Complexo Maior de Histocompatibilidade A e B, marcadores de apoptose e adiponectina. A Figura 3 apresentada pelos mesmos autores,

ilustra essa relação com a permeabilidade intestinal e o papel das adipocinas na promoção da apoptose e das adiponectinas na proteção das células hepáticas.

A hemocromatose é uma doença genética autossômica recessiva associada a mutações do gene HFE, localizado no braço curto do cromossoma 6, que codifica a proteína que interage com receptor da transferrina na absorção intestinal do ferro (27). Paradoxalmente, a DC é associada à anemia por deficiência de ferro. Porém, existem estudos que relatam uma associação entre essas doenças, identificando as mutações descritas na hemocromatose, como sendo mais frequentes entre pacientes celíacos. Além disso, a ocorrência de sobrecarga de ferro após o tratamento da DC em portadores de mutações do gene HFE suportaria essa relação. Na revisão apresentada por Zali e colaboradores, os autores também identificaram estudos com maior frequência de mutações do gene HFE em portadores de DC, mas não demonstraram uma correlação clínica que suportasse essa relação (13).

A Doença de Wilson também tem origem genética autossômica recessiva que afeta o gene ATP7B no cromossomo 13, interferindo na excreção biliar do cobre. Os pacientes portadores dessa doença apresentam acúmulo progressivo de cobre no fígado, no soro e em outros tecidos, causando hepatomegalia, hemólise, icterícia, insuficiência hepática, lesão cerebral, lesão renal e alterações oculares típicas, conhecidas como anéis de Keischer-

Fleicher.(28). Não se identificam muitos estudos estabelecendo a relação entre a Doença de Wilson e DC, mas existem trabalhos que descrevem alterações no metabolismo e na excreção urinária de cobre (29). Drastich e colaboradores encontraram uma incidência surpreendentemente maior de DC em portadores de Doença de Wilson(9,7%), instigando mais estudos para comprovar essa associação(30).

Em conclusão, o espectro de alterações hepáticas que podem estar associadas com a DC não deve ser desprezado, assim como a relação da intolerância ao glúten como uma explicação na fisiopatologia de algumas doenças hepáticas. Dessa forma, a avaliação de enzimas hepáticas em pacientes com DC, assim como a triagem sorológica para tal doença em pacientes hepatopatas, é perfeitamente justificável.

Referências:

- Diniz-Santos D, Machado A, Silva L. Doença Celíaca. In: Carvalho E, Silva L, Ferreira C, editors. Gastroenterologia e Nutrição em Pediatria. São Paulo: Manole; 2012. p. 359–403.
- Schuppan D, Junker Y, Barisani D. Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies. Gastroenterology [Internet]. Elsevier Inc.; 2009 Dec [cited 2011 Jun 21];137(6):1912–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19766641>
- Rubio-Tapia A, Murray J. Celiac Disease. Curr Opin Gastroenterol. 2010;26(2):116–22.
- Ghawil M, Miotti V, Tonutti E, Tenore A, Hadeed I, Sindici C, et al. HLA-DQ types of celiac disease in Libyan children with type 1 diabetes mellitus. European journal of gastroenterology & hepatology [Internet]. 2012 Jan [cited 2012 Feb 2];24(1):59–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22002004>
- Hunt KA, Zernakova A, Turner G, Heap GAR, Bruinenberg M, Romanos J, et al. Novel celiac disease genetic determinants related to the immune response. Nat Genet. 2008;40(4):395–402.
- Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, et al. Hla types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the european genetics cluster on celiac disease. Human Immunology [Internet]. 2003 Apr [cited 2012 Jan 14];64(4):469–77. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S019885903000272>
- Megiorni F, Mora B, Bonamico M, Barbato M, Nenna R, Maiella G, et al. HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. Human immunology [Internet]. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics; 2009 Jan [cited 2012 Feb 19];70(1):55–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027045>
- Bodd M, Ráki M, Tollefsen S, Fallang LE, Bergseng E, Lundin KE a, et al. HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22. Mucosal immunology [Internet]. 2010 Nov [cited 2012 Jan 12];3(6):594–601. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20571486>

9. Husby S, Koletzki S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips a., Shamir R, et al. ESPGHAN Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease in Children and Adolescents. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* [Internet]. 2011 Aug [cited 2011 Nov 1];54(1):1. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0005176-90000000-99259>
10. Hagander B, Berg N, Brandt L, Norden A. Hepatic injury in adult coeliac disease. *The Lancet* [Internet]. 1977 [cited 2013 Aug 14];2(8032):270–2. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673677909540>
11. Casella G, Antonelli E, Bella C. Prevalence and causes of abnormal liver function in patients with coeliac disease. *Liver International* [Internet]. 2013 [cited 2013 Aug 7];33:1128–31. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/liv.12178/full>
12. Volta U. Pathogenesis and clinical significance of liver injury in celiac disease. *Clinical reviews in allergy & immunology* [Internet]. 2009 Feb [cited 2013 Aug 14];36(1):62–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18496773>
13. Zali MR, Rostami Nejad M, Rostami K, Alavian SM. Liver complications in celiac disease. *Hepatitis monthly* [Internet]. 2011 May [cited 2013 Jul 28];11(5):333–41. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3212773&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
14. Newton KP, Singer SA. Celiac disease in children and adolescents: special considerations. *Seminars in immunopathology* [Internet]. 2012 Jul [cited 2013 Aug 9];34(4):479–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22549889>
15. Vajro P, Paoletta G. Pediatric Celiac Disease, Cryptogenic Hypertransaminasemia, and Autoimmune Hepatitis. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* [Internet]. 2013 [cited 2013 Aug 2];56:663–7. Available from: http://journals.lww.com/jpgn/Abstract/2013/06000/Pediatric_Celiac_Disease__Cryptogenic.17.aspx
16. Rubio-Tapia A, Murray JA. The liver in celiac disease. *Hepatology (Baltimore, Md.)* [Internet]. 2007 Nov [cited 2013 Aug 14];46(5):1650–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17969053>
17. Maggiore G, Caprai S. The liver in celiac disease. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2003 Nov;37:117–9.
18. Mirzaagha F, Azali SH, Islami F, Zamani F, Khalilipour E, Khatibian M, et al. Coeliac disease in autoimmune liver disease: a cross-sectional study and a systematic review. *Digestive and liver disease: official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver* [Internet]. 2010 Sep [cited 2013 Aug 14];42(9):620–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20236872>
19. Vitaliti G, Praticò A, Cimino C, Dio G Di. Hepatitis B vaccine in celiac disease: Yesterday, today and tomorrow. *World journal of gastroenterology: WJG...* [Internet]. 2013 [cited 2013 Aug 6];19(6):838–45. Available from: http://www.researchgate.net/publication/235322361_Hepatitis_B_vaccine_in_celiac_disease_Yesterday_today_andtomorrow/file/d912f510bce43cb49.pdf
20. Chen J, Liang Z, Lu F, Fang X, Liu S, Zeng Y, et al. Toll-like receptors and cytokines/cytokine receptors polymorphisms associate with non-response to hepatitis B vaccine. *Vaccine* [Internet]. 2011 Jan 17 [cited 2013 Aug 18];29(4):706–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2111021>
21. Rehermann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *The Journal of clinical investigation* [Internet]. 2009 Jul [cited 2013 Aug 18];119(7):1745–54. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2701885&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
22. Jadałi Z. Autoimmune thyroid disorders in hepatitis C virus infection: Effect of interferon therapy. *Indian journal of endocrinology and metabolism* [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Aug 20];17(1):69–75. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3659909&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
23. Marconcini M, Fayad L. Autoantibody profile in individuals with chronic hepatitis C. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [Internet]. 2013 [cited 2013 Jul 28];46(2):147–53. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86822013000200147&script=sci_arttext
24. Kagnoff MF. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *The Journal of clinical investigation* [Internet]. 2007 Jan [cited 2013 Aug 9];117(1):41–9. Available from: <http://www.jci.org/cgi/content/abstract/117/1/41>
25. Marques CFR, Silva LR. Doença hepática gordurosa não alcoólica. In: Carvalho E, Silva L, Ferreira C, editors. *Hepatologia em Pediatria*. 1ª ed. São Paulo: Manole; 2012. p. 197–218.
26. Kälsch J, Bechmann LP, Manka P, Kahraman a, Schlattjan M, Marth T, et al. Non-alcoholic steatohepatitis occurs in celiac disease and is associated with cellular stress. [Internet]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 2013. p. 26–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23315648>
27. Brandão MAB, Hessel G, Tommaso AMA De. Hemocromatose Hepática. In: Carvalho, E Silva, LR Ferreira C, editor. *Hepatologia em Pediatria*. 1ª ed. São Paulo: Manole; 2012. p. 443–9.
28. Vega PJ, Llanillo LH. Doença de Wilson. In: Carvalho, E Silva, LR Ferreira C, editor. *Hepatologia em Pediatria*. 1ª ed. São Paulo: Manole; 2012. p. 420–41.
29. Ince AT, Kayadibi H, Soylu A, Ovuğ O, Gültepe M, Toros AB, et al. Serum copper, ceruloplasmin and 24-h urine copper evaluations in celiac patients. *Digestive diseases and sciences* [Internet]. 2008 Jun [cited 2013 Aug 21];53(6):1564–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934856>
30. Drastich P, Honsová E, Lodererová A, Jarešová M, Pekáříková A, Hoffmanová I, et al. Celiac disease markers in patients with liver diseases: a single center large scale screening study. *World journal of gastroenterology: WJG* [Internet]. 2012 Nov 21 [cited 2013 Jun 8];18(43):6255–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3501774/>

[

**ANEXO D- PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO:
APRESENTAÇÃO DE RESULTADOS EM CONGRESSOS E SIMPÓSIOS**



C E R T I F I C A D O

Certificamos que

MARÍLIA DORNELLES BASTOS; THAYNE WOYCINCK KOWALSKI; LUIZA MONTEAVARO MARIATH;
ANA CAROLINA MOISÉS DA SILVA; MÁRCIA KHALED PUÑALES COUTINHO; LARA DIAS
COUTINHO; RAFAELA FERNANDES MUNDSTOCK; ANA LUIZA GUEDES PIRES; LAVÍNIA SCHÜLER-
FACCINI; THEMIS REVERBEL DA SILVEIRA

Participaram do 15º CONGRESSO BRASILEIRO DE GASTROENTEROLOGIA PEDIÁTRICA,
19º Congresso Latino Americano e 10º Congresso Ibero Americano de
Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição realizado no período de 26 a 29 de março
de 2014 no Centro de Convenções de Natal - RN.

REALIZAÇÃO/PROMOÇÃO



na qualidade de autores do Fórum de Pesquisa JORGE BEZERRA: ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE
SUSCEPTIBILIDADE A DIABETES MELLITUS TIPO I E DOENÇA CELÍACA

Natal, 29 de março de 2014

DR. EDUARDO DA SILVA VAZ
Presidente da Sociedade Brasileira de Pediatria

DR. MAURO BATISTA DE MORAES
Presidente do 15º Congresso Brasileiro
de Gastroenterologia Pediátrica

DRA. MARIANA ODO
Presidente da Sociedade Latinoamericana
de Gastroenterologia, Hepatologia e
Nutrição em Pediatria (SLGHP)

Trabalhos Científicos

- Título:** Análise De Polimorfismos De Susceptibilidade A Diabetes Mellitus Tipo I E Doença Celíaca
Autores: MARÍLIA DORNELLES BASTOS; THAYNE WOYCINCK KOWALSKI; LUIZA
MONTEAVARO MARIATH; ANA CAROLINA MOISÉS DA SILVA; MÁRCIA KHALED
PUÑALES COUTINHO; LARA DIAS COUTINHO; RAFAELA FERNANDES
MUNDSTOCK; ANA LUIZA GUEDES PIRES; LAVÍNIA SCHÜLER-
FACCINI; THEMIS REVERBEL DA SILVEIRA

Resumo: A diabetes mellitus tipo I (DM1) é uma doença caracterizada pela destruição das células beta-pancreáticas, hiperglicemia crônica e insulinoopenia progressiva, acometendo principalmente crianças e adolescentes predispostos. Cerca de 10% dos indivíduos com DM1 desenvolvem doença celíaca (DC), uma enteropatia de sensibilidade ao glúten. Ambas as doenças tem etiologia auto-imune. Estudos genéticos de associação identificaram polimorfismos de susceptibilidade às duas doenças, localizados nos genes: RGS1 (rs2816316), IL2-IL21 (rs6822844), BACH2 (rs11755527) e IL18RAP (rs917997). O objetivo desse trabalho é comparar as frequências alélicas e genotípicas dos polimorfismos dos genes mencionados em uma amostra de 90 indivíduos com DM1 e 72 com DC, verificando, assim, a existência de alelos de risco em ambos os grupos. Foram realizadas coletas de saliva ou sangue para posterior extração de DNA e a genotipagem foi realizada por PCR Real-Time. Todos os polimorfismos encontravam-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A comparação entre as frequências alélicas e genotípicas foram calculadas por Teste Exato de Fisher. As frequências dos alelos de risco não variaram entre os dois grupos. Para o gene RGS1, a frequência do alelo A foi de 81,25% no grupo DM1 e 86,36% no grupo DC (p=0,3). O alelo de risco G do gene IL2-IL21 teve ocorrência em 85,87% no DM1 e 89,55% no DC (p=0,42). O alelo C do BACH2 teve frequência de 50,56% no DM1 e 56,43% no grupo DC (p=0,35). Para o alelo T do gene IL18RAP as frequências foram de 73,08% no grupo DM1 e 70,83% no DC (p=0,74). Da mesma forma, as frequências genotípicas não variaram na comparação entre os grupos para os polimorfismos dos genes RGS1 (p=0,58), IL2-IL21 (p=0,62), BACH2 (p=0,44) e IL18RAP (p=0,64). Esses resultados demonstram que não há variação dos polimorfismos avaliados entre os dois grupos, o que pode ser um indicativo de uma mesma predisposição genética para as duas doenças.

TL-05



VII Congresso Gaúcho de
**Atualização
em Pediatria**

V Simpósio Sul-Americano de **Pediatria**
15 a 17 de maio de 2014 | PUCRS | Porto Alegre



Certificado

Certificamos que

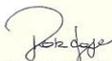
O Trabalho "**POLIMORFISMOS DE SUSCEPTIBILIDADE À DOENÇA CELÍACA EM UMA AMOSTRA DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO I.**",

dos autores: **MARÍLIA DORNELLES BASTOS; LUIZA MONTEAVARO MARIATH; THAYNE WOYCINCK KOWALSKI; ANA CAROLINA MOISÉS DA SILVA; MÁRCIA KHALED PUÑALES; LARA COUTINHO; BIBIANE ARMILIATO DE GODOY; BALDUÍNO TSCHIEDEL; THEMIS REVERBEL DA SILVEIRA; LAVÍNIA SCHULER FACCINI,**

foi premiado em **TERCEIRO LUGAR** no VII CONGRESSO GAUCHO DE ATUALIZAÇÃO EM PEDIATRIA e V SIMPÓSIO SUL-AMERICANO DE PEDIATRIA, realizados no período de 15 a 17 de Maio de 2014 na PUCRS em Porto Alegre - RS.

Porto Alegre, 17 de Maio de 2014


Dra. Helena Müller
Presidente do Congresso


Dra. Patrícia Miranda do Lago
Presidente da SPRS

TL-05 - POLIMORFISMOS DE SUSCEPTIBILIDADE À DOENÇA CELÍACA EM UMA AMOSTRA DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO I

Marília Dornelles Bastos^{1,2}, Luiza Monteavaro Mariath³, Thayne Woycinck Kowalski³, Ana Carolina Moisés da Silva³, Márcia Khaled Puñales⁴, Lara Coutinho⁵, Bibiane Armiliato de Godoy³, Balduino Tschiedel⁴, Themis Reverbel da Silveira^{1,6}, Lavínia Schuler Faccini³

¹UFRGS, ²UNISC, ³UFRGS, ⁴ICD, ⁵UFCSA, ⁶HCSA

Objetivo: Investigar a prevalência de polimorfismos de susceptibilidade à Doença Celíaca (DC) em uma amostra de pacientes com Diabetes mellitus tipo I (DM1) com sorologia positiva e negativa para DC.

Metodologia: Foram realizadas coletas de saliva ou sangue de 104 pacientes com DM1 (sendo 15 com sorologia positiva e 89 com sorologia negativa para DC) para posterior extração de DNA. A genotipagem dos polimorfismos rs2816316 do gene RGS1, rs11755527 do gene BACH2 e rs917997 do gene IL18RAP, previamente associados à DC, foi realizada por PCR Real-Time. As frequências alélicas foram comparadas através do teste Qui-Quadrado.

Resultados: Todos os polimorfismos encontravam-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. A análise estatística dos polimorfismos dos genes RGS1 e IL18RAP apresentou valores de p de 0.63 e 0.62, respectivamente, na comparação entre frequências alélicas dos dois grupos de diabéticos. A análise do polimorfismo do gene BACH2 apresentou um valor de p de 0.067, indicando que pode haver alguma associação entre a presença do alelo de risco desse polimorfismo e a ocorrência de sorologia positiva para DC na amostra estudada.

Conclusões: As próximas etapas do estudo consistem no aumento dos dois grupos de pacientes, em especial do grupo de pacientes diabéticos com sorologia positiva para DC. Assim, espera-se com o presente trabalho colaborar para a melhor compreensão dos fatores genéticos que possivelmente estão associados conjuntamente à DM1 e à DC.



122

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE SUSCEPTIBILIDADE À DOENÇA CELÍACA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 DO SUL DO BRASIL

LUIZA MONTEAVARO MARIATH; MARÍLIA DORNELLES BASTOS; THAYNE WOYCINCK KOWALSKI; ANA CAROLINA MOISÉS DA SILVA; MÁRCIA KHALED PUÑALES COUTINHO; RAFAELA FERNANDES MUNDSTOCK; BIBIANE ARMILIATO DE GODOY; BALDUÍNO TSCHIEDEL; THEMIS REVERBEL DA SILVEIRA; LAVÍNIA SCHULER FACCINI.

A diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é uma doença multifatorial que resulta da destruição auto-imune das células β pancreáticas produtoras de insulina em indivíduos geneticamente predispostos com regulação imune prejudicada. Comparados à população normal, os pacientes com DM1 apresentam uma prevalência maior de Doença Celíaca (DC), uma enteropatia crônica e permanente provocada por uma intolerância às proteínas do glúten do trigo, centeio e cevada em pessoas geneticamente predispostas. O objetivo do presente trabalho é investigar a prevalência de polimorfismos de susceptibilidade à DC em uma amostra de pacientes com DM1 com sorologia positiva e negativa para DC. Até o momento, a coleta de sangue periférico para posterior extração de DNA foi realizada em 104 pacientes com DM1 (15 com sorologia positiva e 89 com sorologia negativa para DC) de um serviço de referência regional em Diabetes do sul do Brasil. Os polimorfismos rs2816316 do gene RGS1, rs11755527 do gene BACH2 e rs917997 do gene IL18RAP, previamente associados à DC, foram investigados nesse estudo. A determinação genotípica dos pacientes da amostra foi realizada pela técnica de PCR em Tempo do teste do Qui-quadrado ou do teste exato de Fisher. Todos os polimorfismos avaliados estiveram em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Não foram encontradas diferenças significativas entre os resultados genotípicos dos pacientes diabéticos com sorologia positiva para DC quando comparados aos pacientes com sorologia negativa. A frequência do alelo A do polimorfismo do gene RGS1 foi de 73% no grupo de diabéticos com sorologia positiva para DC e de 79% no grupo com sorologia negativa ($p=0.63$). A ocorrência do alelo T do polimorfismo do gene IL18RAP foi de 20% no grupo com sorologia positiva e de 26% no grupo com sorologia negativa para DC ($p=0.62$). O alelo C do polimorfismo do gene BACH2 esteve presente em 68% dos diabéticos com sorologia positiva para DC e em 47% daqueles com sorologia negativa ($p=0.067$). Ainda que não tenha sido aqui demonstrada uma associação significativa, o valor de p da análise do gene BACH2 indica que pode haver alguma relação entre a presença do alelo C do polimorfismo e a ocorrência de sorologia positiva para DC. O pequeno número amostral de indivíduos com DM1 e sorologia positiva para DC pode ter sido um empecilho para demonstrar a existência de associação entre os polimorfismos testados e os grupos amostrais. As próximas etapas do estudo consistem no aumento dos dois grupos de pacientes, em especial do grupo de pacientes diabéticos com sorologia positiva para DC, e em novas análises dos resultados encontrados. Assim, espera-se com o presente trabalho colaborar para a melhor compreensão dos fatores genéticos que possivelmente estão associados conjuntamente à DM1 e à DC.



XII CURSO DE ENFERMEDADES
DEL INTESTINO DELGADO Y COLON
IV SIMPOSIO LATINOAMERICANO
DE ENFERMEDAD CELÍACA



Modalidad: Resúmenes Originales Oral

RASTREAMIENTO DE DOENÇA CELÍACA EM PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO

Dra. Ramos, Ana Regina Lima(1) | Borges Pinto, Raquel(1) | Bastos, Marília(2) | Provenzi, Valentina(3) | Geremia, Cesar(4) | Soledade, Maria Antônia(4) | Tschiedel, Balduino(4) | Ott, Eduardo(3) | Silveira, Themis Reverbel(2) | Puñales, Marcia(4)

HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO (1); UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (2); HOSPITAL NOSSA SENHORA DA CONCEIÇÃO (3); INSTITUTO DA CRIANÇA COM DIABETES (4)

Trabajo: Introducción: A prevalência de Doença Celíaca (DC) em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) é maior do que na população não-diabética (0,15 - 2,6%) e varia nas diferentes populações (2,4 -16,4%). O rastreamento de DC em indivíduos predispostos pode ser realizado através da dosagem de anticorpos antiendomísio (EMA), antitransglutaminase (TTG) e anti-gliadineaminada (AGD), pois apresentam boa sensibilidade e especificidade. No entanto, a confirmação diagnóstica é realizada através da endoscopia digestiva alta com biópsias de duodeno (atrofia de vilosidades, aumento de linfócitos e hiperplasia de criptas). Objetivo: Determinar a prevalência de Doença Celíaca (DC) em pacientes com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) através do rastreamento com dosagem de anticorpos antitransglutaminase tecidual humana IgA (TTG-IgA) e IgA total com confirmação por biópsias de duodeno. Material e Métodos: O rastreamento de DC foi realizado em 767 pacientes com DM1, com média de idade de $14,2 \pm 5,8$ anos. Valor de referência dos anticorpos TTG-IgA: não-reagente: 9,0 U/mL, indeterminado: 9-16 U/mL e reagente: >16 U/mL e confirmação diagnóstica realizada através de endoscopia digestiva alta com biópsias de duodeno, utilizando-se a classificação de Marsh modificada. Resultados: A prevalência de soro-positividade de TTG-IgA foi de 8% (62/767) e de DC de 5,1% (39/767). Dentre os pacientes com DC, a mediana de IgA sérica foi de 171mg/dL (IQ=120-228,5), não havendo nenhum caso de deficiência de IgA (<5 mg/dL), a média de idade foi $15 \pm 7,5$ anos, sendo 59% do sexo masculino. As manifestações clínicas gastrointestinais foram referidas em 37,1% (23/62) dos pacientes soropositivos e 48,7% (19/39) dos pacientes com DC. A classificação de Marsh foi: 25,6% (10/39) 3a, 35,9% (14/39) 3b e 38,5%(15/39) 3c. Conclusão: Nossos dados demonstram uma prevalência de DC em 5,0% dos pacientes e ressaltam a importância do rastreamento em indivíduos geneticamente predispostos como DM1, uma vez que uma parcela grande dos casos não apresentam manifestações clínicas.

Powered by EventGo Suite® (<http://www.eventgo.com.ar>)



XII CURSO DE ENFERMEZAS
DEL INTESTINO DELGADO Y COLON
IV SIMPOSIO LATINOAMERICANO
DE ENFERMEDAD CELÍACA



Modalidad: Resúmenes Originales Póster Oral

AVALIAÇÃO DE PACIENTES COM DIABETES MELLITUS TIPO 1 COM E SEM DOENÇA CELÍACA: CORRELAÇÕES CLÍNICAS E ANÁLISE DE HAPLÓTIPOS DQ2.5 E DQ8 COM A TÉCNICA TAG SNP

Dra. Bastos, Marília Dornelles(1) | Puñales, Márcia(2) | Ramos, Ana Regina(3) | Ott, Eduardo(3) | Provenzi, Valentina(3) | Tschiedel, Balduino(2) | Kowalski, Thayne(1) | Mariath, Luiza(1) | Faccini, Lavínia(1) | Silveira, Themis(1)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (1); INSTITUTO DA CRIANÇA COM DIABETES (2); HOSPITAL NOSSA SENHORA DA CONCEIÇÃO (3)

Trabajo: Introdução: Pacientes com Diabetes Mellitus tipo1(DM1) apresentam maior prevalência de Doença Celíaca (DC) quando comparados a população geral. A presença de características clínicas pode auxiliar no diagnóstico precoce da enteropatia. O locus HLA é o principal fator genético de risco para DM1 e DC e sua identificação é útil para os predispostos, podendo-se estimar um alto valor preditivo negativo. Porém, tais exames são de alto custo, tornando oneroso na prática clínica. Objetivos: Relacionar as características clínicas com a sorologia e o diagnóstico histológico de DC em pacientes com DM1. Avaliar a frequência dos haplótipos DQ2.5 e DQ8 a partir de uma técnica de menor custo. Métodos: O rastreamento de DC foi realizado através da dosagem de anticorpos antitransglutaminase IgA (TTG-IgA), considerando valores reagentes acima de 16U/mL. A confirmação diagnóstica foi feita com endoscopia digestiva e biópsia duodenal, utilizando-se a classificação de Marsh modificada. As variáveis clínicas foram pesquisadas através de entrevista. Os alelos DQA1* 0501 e DQB1* 0201 para DQ2.5 e o alelo DQB1*0302 para DQ8 foram pesquisados a partir da técnica de genotipagem de HLA Tag SNP. Indivíduos não DQ2.5 ou DQ8 foram classificados como DQx. A análise estatística foi realizada por meio do teste do Qui-quadrado ou do teste exato de Fisher. Resultados: Foram avaliados 333 indivíduos com DM1, divididos em 3 grupos: anticorpos negativos (grupo 1=273), anticorpos positivos sem biópsia positiva (grupo 2=21) e anticorpos positivos com biópsia positiva (grupo 3=39). A média de idade foi 13,4±5,4 anos, 15,3±6,2anos e 15,9±6,6 anos respectivamente para os grupos 1, 2 e 3(p=0,20). A prevalência do sexo masculino foi 53,8%; 66,7% e 60,5% (p=0,42). Não houve diferença significativa quanto ao tempo de aleitamento materno exclusivo (p=0,67), idade de introdução do glúten (p=0,34) e idade do diagnóstico de DM1 (p=0,83). Sintomas gastrointestinais foram relatados em 25%, 14% e 46% dos indivíduos (p=0,01). A presença de pelo menos um dos haplótipos ocorreu em 85,6%, 100% e 96,8% (p<0,01). Conclusões: Nossos resultados reforçam a importância de realizar a pesquisa de anticorpos para DC em indivíduos com DM1, independente das características clínicas e/ou presença de sintomas gastrointestinais. A pesquisa dos alelos DQ2.5 e DQ8 pela técnica descrita permite atingir um alto valor preditivo negativo, semelhante ao descrito na literatura com a técnica convencional.

<Powered by EventGo Suite © (<http://www.eventgo.com.ar>)



XII CURSO DE ENFERMEDEDES
DEL INTESTINO DELGADO Y COLON
IV SIMPOSIO LATINOAMERICANO
DE ENFERMEDAD CELÍACA



Modalidad: Resúmenes Originales Póster Oral

POLIMORFISMOS DE SUSCEPTIBILIDADE A DIABETES MELLITUS TIPO I E DOENÇA CELÍACA: AVALIAÇÃO DE ALELOS DE RISCO NÃO HLA E DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Dra. Bastos, Marília Dornelles(1) | Kowalski, Thayne(1) | Mariath, Luiza(1) | Silva, Ana Carolina Moisés(1) | Pires, Ana Luiza(1) | Puñales, Márcia(2) | Tschiedel, Balduino(2) | Faccini, Lavínia(1) | Silveira, Themis(1)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (1); INSTITUTO DA CRIANÇA COM DIABETES (2)

Trabajo: Introdução: A maior prevalência de doença celíaca (DC) em indivíduos com diabetes mellitus tipo I (DM1) é reconhecida. Ambas as doenças tem etiologia auto-imune, onde os genes HLA classe 2 representam o principal fator genético de risco. Estudos de associação genômica (GWAS) identificaram polimorfismos de susceptibilidade às duas doenças que poderão auxiliar na compreensão da etiologia e nas suas variabilidades clínicas. Objetivo: Avaliar o gênero, a idade do diagnóstico de DM1 e a presença de queixa gastrointestinal entre indivíduos diabéticos com e sem DC e sua relação com os polimorfismos de susceptibilidade nos seguintes genes: RGS1 (rs2816316), IL2-IL21 (rs6822844), BACH2 (rs11755527) e IL18RAP (rs917997). Métodos: O rastreamento de DC foi realizado através da dosagem de anticorpos antitransglutaminase IgA (TTG-IgA) e IGA total. A genotipagem foi realizada por PCR Real-Time com saliva ou sangue, após extração de DNA. Todos os polimorfismos encontram-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Variáveis clínicas foram pesquisadas através de entrevista. A comparação entre as frequências alélicas foram calculadas pelos testes Qui-quadrado e Exato de Fisher. Resultados: Foram avaliados 318 pessoas, não havendo diferença significativa entre a frequência dos alelos de risco para os genes RGS1(A); IL2-IL21(C); BACH2(C); IL18RAP(T) entre os 264 pacientes com sorologia negativa para DC e os 54 com sorologia positiva ($p > 0,05$). Na distribuição por gênero, também não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$). A mediana da idade do diagnóstico da DM1 foi de 8 anos (IQ= 4,6 e 11 anos) sem haver relação significativa com a presença dos alelos de risco ($p > 0,05$). A prevalência do alelo de risco para o gene RGS1 foi maior nos pacientes com queixa gastrointestinal ($p = 0,024$). Tal diferença não ocorreu com os outros polimorfismos: IL2/IL21($p = 0,387$); BACH2($p = 0,738$) e IL18RAP($p = 0,380$). A queixa gastrointestinal somente entre os pacientes com sorologia positiva para DC, não teve diferença significativa para RGS1($p = 0,475$); IL2/IL21($p = 1,000$); BACH2($p = 0,664$) e IL18RAP($p = 0,281$). Conclusão: Não foi identificada diferença significativa entre os pacientes com alelos de risco e a presença de sorologia positiva para DC ou variáveis clínicas como gênero e idade do início da DM1. Mais estudos relacionando os sintomas gastrointestinais com o polimorfismo rs2816316 no gene RGS1 devem ser executados, na busca de um maior entendimento dessas patologias relacionadas geneticamente.

CERTIFICADO

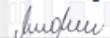


Certificamos que o trabalho

HAPLOTYPE ANALYSIS OF DQ2.5 AND DQ8 BY SIMPLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM TECHNIQUE (TAG-SNP) IN TYPE 1 DIABETES AND/OR CELIAC DISEASE PATIENTS.

dos autores: MARÍLIA DORNELLES BASTOS; THAYNE WOYCINCK KOWALSKI; LUIZA MONTEAVARO MARIATH; MÁRCIA KHALED PUÑALES; BALDUÍNO TSCHIEDEL; ANA CAROLINA MOISÉS DA SILVA; MARIA EDUARDA TAVARES; ANA LUIZA GUEDES PIRES; LAVÍNIA SCHÜLER FACCIINI; THEMIS REVERBEL DA SILVEIRA, foi apresentado, na modalidade Oral, no evento XX Congresso da Sociedade Brasileira de Diabetes ocorrido de 11 a 13 de novembro de 2015 no Fieigs em Porto Alegre/RS.

Porto Alegre, 13 de novembro de 2015


MARCELO CÁCERES BERTOLDO
Presidente de Comissão Científica


WALTER PINHEIRO
Presidente do SBD


BALDUINO TSCHIEDEL
Presidente do Congresso

Haplotype Analysis of DQ2.5 and DQ8 by Simple Nucleotide Polymorphism Technique (Tag-SNP) in Type 1 Diabetes and/or Celiac Disease Patients

MARÍLIA DORNELLES BASTOS (UNISC/UFRGS);
THAYNE WOYCINCK KOWALSKI (UFRGS);
LUIZA MONTEAVARO MARIATH (UFRGS);
MÁRCIA PUÑALES (GHC);
ANA CAROLINA MOISÉS DA SILVA (UFRGS);
MARIA EDUARDA TAVARES (UFRGS);
ANA LUIZA GUEDES PIRES (UFRGS);
BALDUÍNO TSCHIEDEL (GHC);
LAVÍNIA SCHÜLER-FACCIINI (UFRGS);
THEMIS REVERBEL DA SILVEIRA (UFRGS/ HCSA)

doi:10.1186/1758-5996-7-S1-A222

Cite this article as: Bastos et al.: Haplotype analysis of DQ2.5 and DQ8 by simple nucleotide polymorphism technique (TAG-SNP) in type 1 diabetes and/or celiac disease patients. *Diabetology & Metabolic Syndrome* 2015 7(Suppl 1):A222.

Introduction and aim: Celiac disease (CD) is a chronic and permanent enteropathy triggered by ingestion of gluten proteins, present in wheat, rye and barley, in genetically predisposed individuals, as type 1 diabetes mellitus (T1DM) patients, who have a higher prevalence of the disease compared to the general population. Both diseases have similar autoimmune origin, being associated to the histocompatibility complex class II antigen (HLA), mainly DQ2.5 and/or DQ8 haplotypes, allowing estimating negative predictive value accurately. Nevertheless, these genetic tests are expensive, making its implementation a challenge in routine clinical practice. The aim of the study was the evaluation of the frequency of DQ2.5 and DQ8 haplotypes in T1DM and CD patients, using a Simple Nucleotide Polymorphism technique (Tag-SNP).

Materials and Methods: The study enrolled 365 individuals, being 296 with T1DM (without CD=265 and with CD=31) and 69 with only CD. The HLA-DQA1* 0501 and DQB1* 0201 alleles of DQ2.5 and HLA-DQB1*0302 allele of DQ8 were analyzed by HLA Tag SNP and its frequency compared between T1DM and CD. **Results:** The presence of DQ2.5 alleles was found in 57.1% (169/296) among T1DM, being significantly more frequent among T1DM individuals with CD (without CD 54.3% and with CD 80.6 %, $p=0.006$). There was no significant difference in the comparison among T1DM with CD and CD individuals without diabetes (80.6% and 62.3%, $p=0.054$).

The presence of the DQ8 allele was found 54.2% (160/295) among all T1DM (without CD 51.6% and with CD 48.4%, $p=0.569$). The DQ8 allele was significantly higher among T1DM with CD when compared to CD individuals without diabetes (72.6% and 29.5%, $p<0.001$).

Conclusion: Our data evidenced a higher frequency of HLA-DQB1*0302 allele of DQ8 in T1DM than CD individuals without diabetes, which did not exclude CD in this group of patients. However, the analysis of HLA-DQA1* 0501 and DQB1* 0201 alleles of DQ2.5 is useful in the evaluation of the risk of CD in predisposed individuals as T1DM patients.



Polymorphisms and genetic susceptibility of type 1 diabetes mellitus and Celiac Disease

MARÍLIA DORNELLES BASTOS (UNISC/UFRGS);
 THAYNE WOYCINCK KOWALSKI (UFRGS);
 LUIZA MONTEAVARO MARIATH (UFRGS);
 MÁRCIA PUÑALES (ICD-RS (GHC);
 BIBIANE ARMILIATO DE GODOY (UFRGS);
 LARA DIAS COUTINHO (UFCSPA);
 RAFAELA FERNANDES MUNDSTOCK (UFCSPA);
 BALDUÍNO TSCHIEDEL (ICD-RS (GHC);
 LAVÍNIA SCHÜLER FACCINI (UFRGS);
 THEMIS REVERBEL DA SILVEIRA (UFRGS/HCSA)

doi:10.1186/1758-5996-7-S1-A216

Cite this article as: Bastos et al.: Polymorphisms and genetic susceptibility of type 1 diabetes mellitus and celiac disease.

Diabetology &
 Metabolic Syndrome 2015 7(Suppl 1):A216.

Introduction and aim: Type 1 diabetes mellitus (T1DM) is a chronic autoimmune disease characterized by pancreatic beta-cell destruction, hyperglycemia and progressive insulin deficiency, affecting mainly children and adolescents genetically predisposed. About 10% (2.4-16.4%) of T1DM individuals develop celiac disease (CD), an immune-mediated enteropathy triggered by gluten exposure. Both diseases have a common autoimmune origin and share a similar genetic background, the major histocompatibility complex class II antigen (HLA-DQ). Some genetic association studies have also identified susceptibility polymorphisms non-HLA associated to both diseases, located in different genes: RGS1 (rs2816316), IL2-IL21 (rs6822844), BACH2 (rs11755527) and IL18RAP (rs917997). The aim of the present study was to determine the allelic and genotypic frequencies of polymorphisms in RGS1, IL2-IL21, BACH2 and IL18RAP genes in a sample of 317 T1DM individuals and to compare the frequency of the risk alleles in patients with negative (N=264) or positive (N=53) serology for CD. **Materials and Methods:** Saliva or blood sample was collected and DNA extraction and genotyping performed by PCR Real-Time. All polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium. The comparison between the allele and genotype frequencies was calculate by Chi-square and Fisher's exact test. **Results:** The frequency of the allele risk for the genes RGS1 (allele A); IL2-IL21 (allele C); BACH2 (allele C) e IL18RAP (allele T) in T1DM individuals and negative serology for CD was respectively: 95.5%, 97.4%, 79.8% and 46.6%. In T1DM with seropositive, the frequency of the same alleles were: 98.1%(p=0.703), 100.0% (p=0.604), 86.0% (p=0.433) and 46.2%(p=1.000). Both genotype and allele frequencies were not significantly between T1DM with negative or positive serology for CD. **Conclusion:** Our data did not evidence differences between the polymorphisms non-HLA analyzed in T1DM with or without seropositive for CD, being not possible to assure that the presence of these polymorphism increase or decrease the predisposition to celiac disease.

ANEXO E- PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO:

Capítulo do Livro:

Bastos MD; Pires ALG, Silveira TR.

Doença Celíaca.

In: Lago PM, Ferreira CT, Mello ED,
Pinto LA, Epifanio M.

Pediatria Baseada em Evidências.

São Paulo: Manole

p.209-219.