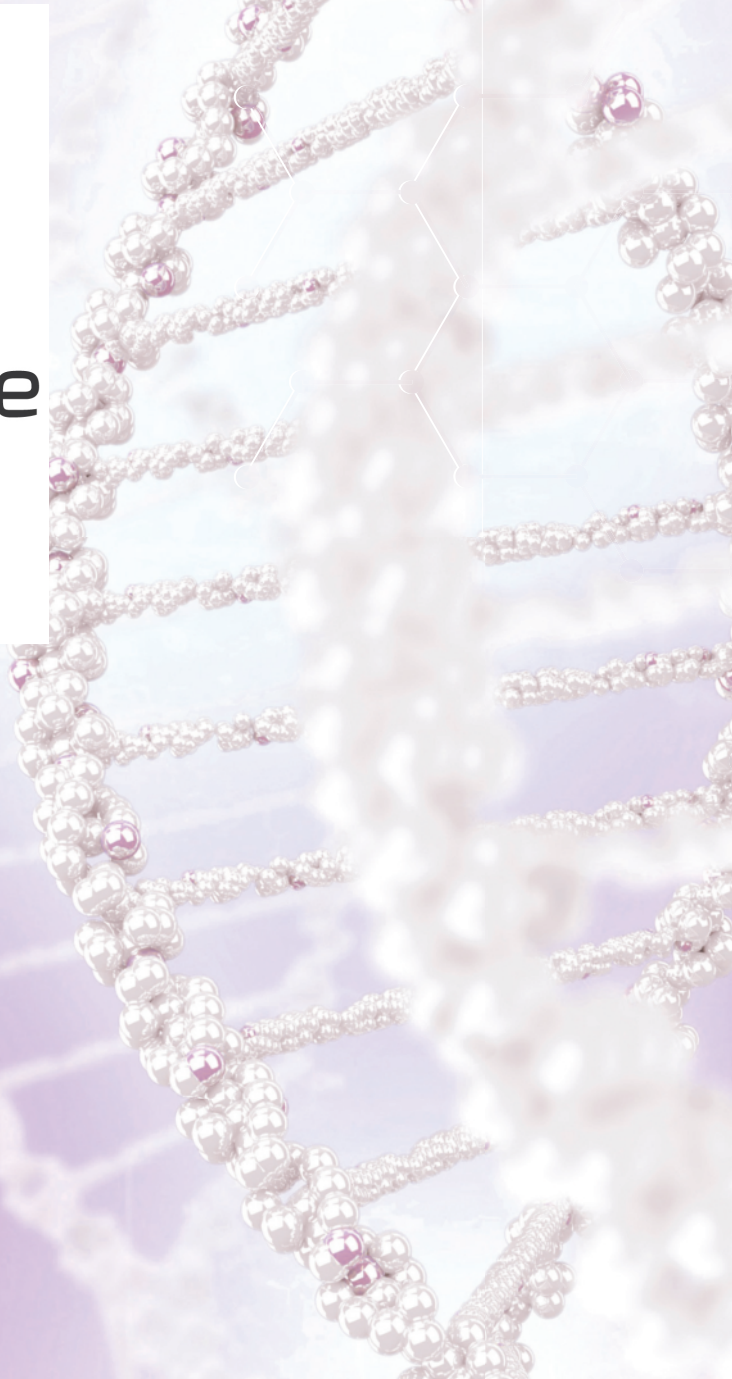




DNA life



Doença Celíaca

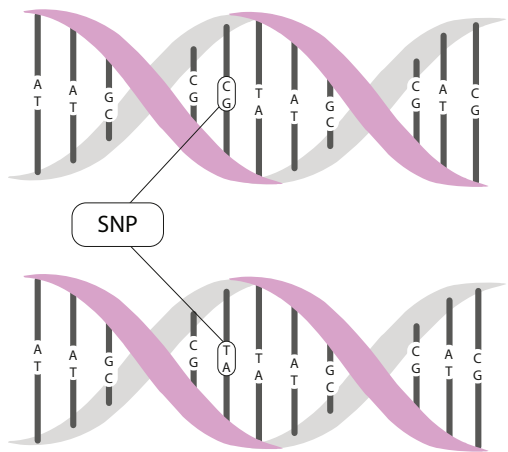
Rastreamento de polimorfismos para diagnóstico

DO LABORATORIO PARA O CONSULTÓRIO

A Medicina Personalizada se utiliza dos novos métodos de análise molecular do genoma humano permitindo que tanto critérios diagnósticos quanto a terapia medicamentosa assumam um caráter individualizado, desta forma, a sequência genômica de cada paciente torna-se determinante para a tomada de decisões clínicas.¹

A partir de dados do sequenciamento do DNA humano, constatou-se que, apesar das profundas diferenças existentes entre os indivíduos quanto a seus fenótipos (cor da pele, peso, altura), seus genomas apresentam similaridade de cerca de 99,9%. A pequena variação interindividual de 0,1% se dá, principalmente, por meio de variações na sequência do DNA conhecidas como polimorfismos de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism; SNP), que existem aos milhões no genoma humano. Muitas vezes, os SNPs podem levar a mudanças na estrutura, função, quantidade ou localização das proteínas codificadas, alterando inúmeros processos fisiológicos. Além de interferirem em características físicas, os SNPs também podem influenciar o risco para doenças crônicas não-transmissíveis, necessidades de nutrientes e resposta aos alimentos.²





Duas sequências de fragmentos do DNA de diferentes indivíduos demonstrando uma variação na localização de um nucleotídeo único (polimorfismo C-T).⁴

Figura 1. Polimorfismo de nucleotídeo único (single nucleotide polymorphism; SNP).⁴

Com relação à terminologia, SNP descreve uma variação genética que existe na população humana em frequência $\geq 1\%$, enquanto que o termo MUTAÇÕES corresponde às variações genéticas existentes em $< 1\%$ da população humana.²

TESTES GENÉTICOS EM AMOSTRA DE SALIVA POSSUEM SENSIBILIDADE E PRECISÃO SEMELHANTES AO TESTE PADRÃO COM AMOSTRA DE SANGUE

Os testes genéticos são realizados em uma variedade de amostras biológicas, incluindo sangue, saliva, fezes, tecidos corpóreos, ossos ou cabelos.³

Estudos epidemiológicos para desenvolvimento de biobancos de DNA tem utilizado métodos de coleta menos invasivos, como as células epiteliais bucais coletadas da saliva.³⁻⁷

O DNA isolado de amostras da saliva em comparação ao DNA isolado do sangue não apresenta quantidade e pureza significativamente diferentes. Entretanto, o rendimento do DNA extraído da saliva é significativamente menor quando comparado ao extraído do sangue. Isto ocorre por conta do maior volume de sangue coletado (8.5 ml) em comparação com o volume de saliva (0.5 ml).⁵

DNA	Pureza (A260/A280)	Rendimento (µg)
Sangue (n = 45)	1.85 ± 0.004	253.63 ± 26.6
Saliva (n= 42)	1.85 ± 0.02	21.09 ± 3.64
T-test P-value	0.709	1.32142 x 10 ⁻¹¹

Tabela 1. Pureza e rendimento do DNA coletado de amostras de sangue em comparação com amostras de saliva.⁵

Apesar do menor rendimento do DNA extraído da saliva, a concordância genotípica para todos os marcadores analisados por Microarray é alta, com concordância de 98,7% em ambos os tecidos.⁵ No estudo de comparação do desempenho genotípico entre DNA extraído da saliva e o extraído do sangue, a maioria das amostras de saliva (90%), contendo 31,3% de DNA humano amplificável, tiveram uma porcentagem de genótipos válidos (genotyping call rate) superior a 96%.⁵

Um outro estudo comparativo demonstrou que a porcentagem de genótipos válidos (genotyping call rate) para o DNA extraído do sangue foi de 99%, comparável com a porcentagem de genótipos válidos para o DNA extraído da saliva, de 97%.⁶

FIGURA 2. Associação entre a porcentagem de DNA humano na saliva e a porcentagem de genótipos válidos.⁵

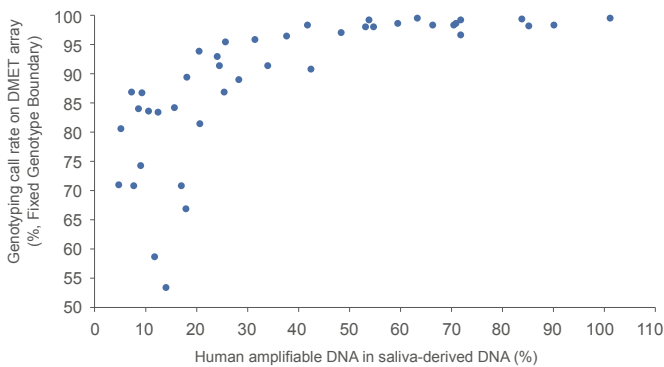
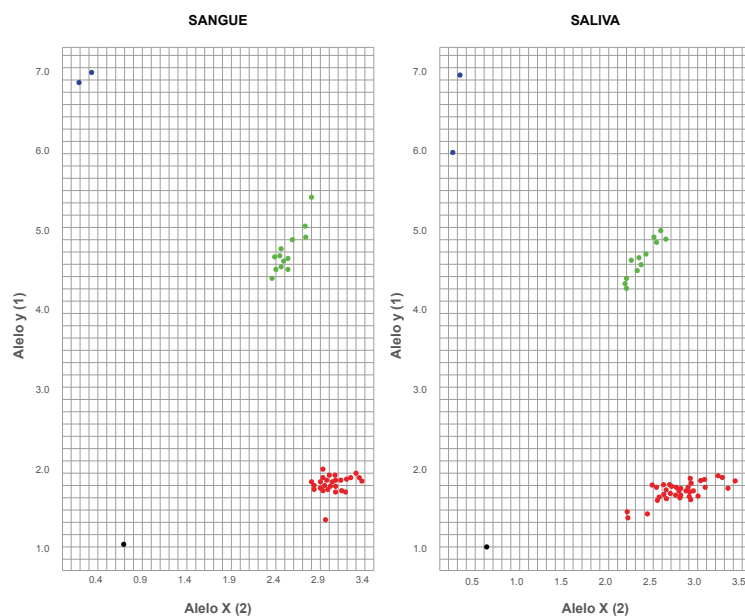


FIGURA 3. Plot Tagman da amplificação representativa para SNP (polimorfismos de nucleotídeo único) ilustrando a correspondência da força do sinal e da definição dos clusters para o DNA de ambas as fontes, sangue e saliva.⁶



A análise do DNA extraído da saliva possui várias vantagens em relação ao padrão ouro de coleta em sangue, dentre elas: menor custo, facilidade da coleta, facilidade de manuseio das amostras, estabilidade das amostras coletadas em temperatura ambiente, procedimento não invasivo.³⁻⁷

ASPECTOS GENÉTICOS ASSOCIADOS À DOENÇA CELÍACA

A suscetibilidade genética da doença celíaca (DC) é determinada pelo antígeno de histocompatibilidade - HLA (Human leukocyte antigen). Os genes do sistema HLA estão presentes no braço curto do cromossomo 6 (6p21.3) e são divididos em três classes: I, II e III. Os genes HLA de classe I e II codificam proteínas MHC de classe I e II que apresentam antígenos peptídicos para reconhecimento pelos linfócitos T. Já os genes HLA de classe III codificam proteínas do sistema complemento.^{8,9}

Os genes HLA que originam as moléculas MHC de classe II e estão associados à DC, codificam heterodímeros formados por duas cadeias α e β que formam a molécula de MHC presente na membrana de células apresentadoras de antígenos ou (Antigen Presenting Cells - APCs).^{8,9}

Esses genes HLA compreendem três conjuntos de genes polimórficos denominados HLA-DR (HLA-DRA e HLA-DRB1), HLA-DP (HLA-DPA1 e HLA-DPB1) e HLA-DQ (HLA-DQA1 e HLA-DQB1). A designação do loci dos genes HLA de classe II no cromossomo 6 consiste de três letras: a primeira (D) indica a classe (II), a segunda (Q, P ou R) a família, e a terceira (A ou B) indica a cadeia do heterodímero (α ou β , respectivamente).^{8,9,10}

Predisposição Genética à Doença Celíaca^{9,10,11,12}

A suscetibilidade genética para DC está associada aos heterodímeros HLA-DQ2 e HLA DQ8. O heterodímero DQ2 é codificado pelos alelos DQA1*05 (cadeia α) e DQB1*02 (cadeia β); já o DQ8 é codificado pelos alelos DQA1*03:01 (cadeia α) e DQB1*03:02 (cadeia β).^{8,9,10}

Pelo menos 95% dos pacientes com DC estão associados com o HLA-DQ2, enquanto que o resto, que não apresenta HLA DQ2, apresenta HLA do tipo DQ8.^{9,10,11,12}



TABELA 2. Risco de Predisposição Genética à Doença Celíaca.^{9,10,11,12}

Condição	Risco
População geral	1/100
Indivíduos com HLA-DQ2 ou HLA-DQ8	1/5
Parentes de primeiro-grau com HLA desconhecido	1/10
Parentes de primeiro grau com DQ2 ou DQ8+	1/3
Parentes de segundo-grau com HLA desconhecido	1/39
Gêmeos idênticos	75%
Pacientes assintomáticos	1/56
Grupos sem risco	1/133
Portadores de Diabetes Tipo 1	8 a 10%
Portadores de Diabetes Tipo 1 +DQ2/DQ2	33%
Síndrome de Down ou de Williams ou de Turner	5 a 10%

Aplicabilidade clínica do teste genético para a DC^{11,12}

Vale ressaltar que a DC é uma doença autoimune que é desencadeada somente em presença de glúten na dieta. A presença dos genes associados (HLA DQ2/DQ8) à DC não pode ser considerado um diagnóstico definitivo desta doença, porém a sua ausência essencialmente exclui o diagnóstico da DC. A análise molecular não substitui a biópsia de intestino delgado que continua sendo a propedêutica padrão ouro para o diagnóstico de DC. Mais de 95% dos celíacos sintomáticos diagnosticados pelo padrão ouro possuem o perfil genético HLA DQ2/DQ8 associado à DC.^{11,12}

TABELA 3. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva para o diagnóstico da DC.¹²

“A DC é uma importante candidata a triagem neonatal, do ponto de vista saúde-pública, baseando-se nos alelos HLA-DQ”.	Devido à natureza da DC e a sua alta prevalência em grupos de risco (grau de parentesco, Diabetes, Síndrome de Down. (Ver Tabela 2).
“Se após testes sorológicos negativos ainda há forte suspeita de DC, pode-se proceder com o HLA do paciente. Se DQ2 ou DQ8 estiverem presentes, deve-se realizar a biópsia duodenal”.	Cerca de 95 - 98% dos celíacos sintomáticos diagnosticados pelo padrão ouro, possuem o perfil genético HLA DQ2/DQ8 associado à DC. Em caso de HLA DQ2/DQ8 positivo e sorologia negativa, o paciente pode ter deficiência de IgA. Os testes laboratoriais mais comumente encontrados no mercado detectam IgA. O indivíduo pode ser IgA negativo e, neste caso, a DC pode ser mediada por IgG. Caso haja o perfil genético positivo em casos com sorologia negativa, recomendam-se novos testes sorológicos para análise de IgG.
“Testes sorológicos e HLA positivos são apenas indicativos de DC. A biópsia do duodeno é que faz o diagnóstico definitivo”.	Apesar da sensibilidade e da especificidade da genotipagem do HLA para DC serem tecnicamente de 100%, existem casos de celíacos que não possuem este perfil genético (<1%). Por isso, ainda se faz necessário a combinação de mais de uma técnica de laboratório para a confirmação da DC.

ANÁLISE DE MUTAÇÃO DO DNA POR PCR E SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS

A partir de uma amostra de DNA genômico de células da mucosa bucal, seguem-se os seguintes procedimentos:

- Genotipagem de tag-SNPs associados aos alelos HLA classe II que correspondem aos haplótipos DQ2 (DQ2.2 e DQ2.5), DQ4, DQ7 e DQ8.
- A análise determina:
 - A presença ou ausência dos alelos relacionados acima no par de cromossomos do indivíduo e, por isso, determina homozigose ou heterozigose.
 - A genotipagem que corresponde às cadeias alfa e beta das proteínas do HLA classe II relacionados acima.

REEMBOLSO PLANOS DE SAÚDE

A tabela TUSS (Terminologia Unificada da Saúde Suplementar) foi instituída pela Agência Nacional de Saúde Suplementar (ANS), através de sua Instrução Normativa nº 38, de 13 de novembro de 2009 e tem por objetivo padronizar os códigos e nomenclaturas dos procedimentos médicos.¹³

A tabela TUSS inclui o procedimento de testes genéticos, como o DNALIFE, e os classifica pela doença que se pretende diagnosticar ou pela tecnologia de análise genética utilizada. Assim, é possível orientar o paciente para que ele solicite o reembolso dos Exames Genéticos DNALIFE facilitando assim o acesso a esta nova tecnologia.

Orientações para solicitar reembolso

Colocar no pedido de exames:

- Os dados necessários do paciente;
- Especificação do EXAME solicitado;
- O código e a descrição da Tabela TUSS.

Solicite que o paciente entre em contato com o seu plano de saúde e confirme a cobertura destes códigos e o valor do reembolso, podendo estas informações facilitar o pedido de reembolso por parte do paciente. Informe que o reembolso, contudo, continuará seguindo as mesmas normas (de acordo com a modalidade e regulamento do plano), **não significando que o usuário terá as despesas reembolsadas integralmente.**

TABELA 4. Tabela de codificação do Exame DNALIFE:

Nome Comercial DNALIFE	Cód TUSS	Descrição TUSS
Doença Celíaca por Genotipagem do Sistema HLA	40306887	Genotipagem do Sistema HLA

Referências:

1. B S Shastry. Pharmacogenetics and the concept of individualized medicine. The Pharmacogenomics Journal (2006) 6, 16–21.
2. Miae Doo and Yangha Kim. Obesity: Interactions of Genome and Nutrients Intake. Prev. Nutr. Food Sci. 2015;20(1):1-7.
3. Fanyue Sun, Ernst J Reichenberger. Saliva as a Source of Genomic DNA for Genetic Studies: Review of Current Methods and Applications. Oral Health Dent Manag 2014 Jun;13(2):217-22.
4. Ana P Nunes, et al. Quality of DNA extracted from saliva samples collected with the Oragene™ DNA self-collection kit. BMC Medical Research Methodology 2012, 12:65.
5. Hu Y, Ehli EA, Nelson K, Bohlen K, Lynch C, et al. (2012) Genotyping Performance between Saliva and Blood-Derived Genomic DNAs on the DMET Array: A Comparison. PLoS ONE 7(3): e33968. doi:10.1371/journal.pone.0033968.
6. Jean E Abraham, et al. Saliva samples are a viable alternative to blood samples as a source of DNA for high throughput genotyping. BMC Medical Genomics 2012, 5:19.
7. Küchler EC, et al. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. J Appl Oral Sci. 2012 Jul-Aug;20(4):467-71.
8. NCBI Gene Reviews. [Online] 2010. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1727/>. Acesso em 29 de maio de 2015.
9. Francesca Megiorni and Antonio Pizzuti. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. Journal of Biomedical Science 2012, 19:88
10. Bourgey M et al. HLA related genetic risk for coeliac disease. Gut 2007 Aug;56(8):1054-9.
11. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. Celiac disease. April 2012. Disponível em: < <http://www.worldgastroenterology.org/site-search.html>>. Acesso em 29 de maio de 2015.
12. SOBED. Projeto Diretrizes. Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva. Gestão 2009-2010. Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva. [Online] 2009. http://www.sobed.org.br/web/pdf/DOEN%C3%87A_CEL%C3%8DACA.pdf. Acesso em 29 de maio de 2015.
13. Instrução Normativa 38 de 13 de novembro de 2009 da Agencia Nacional de Saúde.

Caso tenha interesse em receber algum dos artigos listados acima, solicite ao representante que o visita ou entre em contato através do email contato@dnalife.com.br



DNA life

Rua Lauro Vicuna, 489 - Alto de Pinheiros - CEP
05454-090- São Paulo/SP - Brasil

www.dnalife.com.br
Tel.: 11 3021-3704
contato@dnalife.com.br

