

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ROSA HARUMI UENISHI

TAXA DE INCIDÊNCIA DE SOROCONVERSÃO DOS ANTICORPOS IGA-  
ANTIENDOMÍSIO NUMA COORTE DE PACIENTES COM ALELOS ANTÍGENO  
LEUCOCITÁRIO HUMANO PREDISPONENTE PARA A DOENÇA CELÍACA

Dissertação apresentada como  
requisito parcial para a obtenção do  
Título de Mestre em Ciências da  
Saúde pelo Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde da  
Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Lenora Gandolfi

BRASÍLIA

2013

ROSA HARUMI UENISHI

TAXA DE INCIDÊNCIA DE SOROCONVERSÃO DOS ANTICORPOS IgA ANTI-ENDOMÍCIO NUMA COORTE DE PACIENTES COM ALELOS ANTÍGENO LEUCOCITÁRIO HUMANO PREDISPONENTE PARA A DOENÇA CELÍACA

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 06 de março de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lenora Gandolfi (presidente)  
Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra. Ana Carolina Acevedo Poppe  
Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra. Ines Cristina dos Santos Modelli  
Escola Superior de Ciências da Saúde (ESCS)

Prof. Dr. Riccardo Pratesi (suplente)  
Universidade de Brasília (UnB)

*Dedico este trabalho aos meus amores Luiz, Filipe, Júlia, Toyoji e Yoshiko.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pelo seu amor e misericórdia e possibilitou esta conquista;

À minha família amada, Luiz, Filipe e Júlia por me apoiarem incondicionalmente;

Aos meus Professores Doutores Lenora Gandolfi e Riccardo Pratesi por me ensinarem sobre a ciência e a vida;

Aos meus pais e irmãos por me ensinarem a nunca desistir de um objetivo;

Aos meus amigos/professores do Laboratório de Pediatria e do Ambulatório de Doença Celíaca pelas aulas, apoio e carinho: Inês, Yanna, Lucas, Fernanda, Patrícia, Sandra, Priscila e etc.

Aos pacientes que participaram da pesquisa;

À minha amiga/irmã Elaine Corradini Belém e família.

Aos Professores Doutores Pedro Luiz Tauil e Raul Yukihiro Matsushita;

A todos que me apoiaram neste processo contínuo de aprendizagem.

*“Como é feliz o homem que acha a sabedoria,  
o homem que obtém entendimento”*

*(Provérbios 3:13)*

## RESUMO

**CONTEXTO:** A doença celíaca (DC) é uma enteropatia imunomediada do intestino delgado desencadeada por intolerância permanente ao glúten em indivíduos geneticamente predispostos pelos alelos do Antígeno Leucocitário Humano (HLA) classe II HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8, sendo o marcador sorológico para anticorpos da classe IgA Antiendomísio (IgA-EMA) utilizado para detecção e auxiliar na confirmação de novos casos de DC por ter especificidade e sensibilidade próximo a 100%, considerado como valor preditivo positivo (VPP).

**OBJETIVO:** Determinar a taxa de incidência (TI) pessoa-período de soroconversão dos anticorpos IgA-EMA numa coorte de pacientes com alelos HLA predisponente pertencentes aos grupos de risco alto para desenvolvê-la, atendidos no Ambulatório de Doença Celíaca do Hospital Universitário de Brasília (AmbDC/HUB) em até 14 anos de acompanhamento (1998 até 2012).

**MÉTODO:** 456 frequentadores do AmbDC/HUB com alelos HLA predisponente para a DC, os quais atendiam aos critérios de inclusão e exclusão estabelecidos no estudo, compuseram a coorte (245 masculino e 310 feminino; idade entre 2 a 85 anos, média de idade:  $28,9 \pm 16,7$ ) identificados nos dados cadastrais do Laboratório de Pesquisas em Pediatria e Centro de Estudos da Doença Celíaca (LabDC/FMUnB) convidados a repetirem o exame sorológico para a DC por apresentarem risco elevado de desenvolvê-la por: ser parente de 1º grau, ser portador de síndromes genéticas, de doenças autoimunes, de sintomas atípicos ou por ter fortes suspeitas clínicas, laboratorial, histológica. O teste imunoenzimático (ELISA) de pesquisa do anticorpo da classe IgA Antitransglutaminase (IgA-tTG) foi inicialmente utilizada para triagem dos pacientes. Aqueles com resultado positivo foram testados para o teste IgA-EMA. A soroconversão foi considerada em indivíduos com resultados positivo para IgA-EMA, na sequência foi solicitado exame complementar, biópsia endoscópica duodenal, para confirmar a enfermidade.

**RESULTADO:** 197 portadores de alelos HLA predisponente (95 masculino e 102 feminino, idade entre 4 a 75 anos, média de idade:  $29,9 \pm 16,8$ ) participaram da pesquisa e encontrou-se 11 casos de soroconversão para os anticorpos IgA-EMA.

A TI pessoa-período de soroconversão de anticorpos IgA-EMA em até 14 anos de acompanhamento encontrada no presente estudo foi, com 95% de confiança,  $1,1 \pm 0,2$  caso de soroconversão por 100 pessoas-ano acompanhadas num período de observação de 1 a 14 anos, média de  $4 \pm 3,7$  anos.

**CONCLUSÃO:** A TI pessoa-período de soroconversão dos anticorpos IgA-EMA de 1,1 casos por 100 pessoas-ano sugere repetição esporádica de exames sorológicos entre pacientes portadores de alelos HLA predisponente para a DC pertencentes ao grupo de risco de desenvolvê-la.

**Palavras Chave:** Doença celíaca, soroconversão dos anticorpos IgA-EMA, predisposição genética, HLA, acompanhamento.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Celiac disease (CD) is an immune-mediated enteropathy of the small intestine triggered by permanent intolerance to gluten in genetically predisposed individuals by the alleles of the human leukocyte antigen (HLA) class II HLA-DQ2 and / or HLA-DQ8, and the serological marker for IgA antibodies Anti-endomysium (IgA-EMA) used for detection and confirmation of new cases of CD to have sensitivity and specificity close to 100% considered positive predictive value.

**OBJECTIVE:** To determine the incidence rate person-period of seroconversion of IgA-EMA antibodies in a cohort of patients with HLA alleles predisposing in groups with high risk to develop it in the Outpatient Celiac Disease, University Hospital of Brasília (AmbDC/HUB) by up to 14 years follow-up (1998 to 2012).

**METHOD:** 456 subjects from AmbDC/HUB with HLA alleles predisposing to CD, who met the inclusion and exclusion criteria established in the study, comprised the cohort (245 male and 310 female, aged 2-85 years, mean age:  $28,9 \pm 16,7$ ) identified in the registration data Laboratory for Research in Pediatrics and Center for Studies of Celiac Disease (LabDC/FMUnB) were asked to repeat the serologic test for DC for presenting high risk of developing it to be a 1st degree relative, be a carrier of genetic syndromes, autoimmune diseases, atypical symptoms or have strong suspicions clinical, laboratory, histological. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) search antibody of IgA anti-transglutaminase (IgA-tTG) was initially used to screen patients. Those testing positive were tested for IgA-EMA test. Seroconversion was seen in subjects with positive results for IgA-EMA, following further examination was requested like endoscopic duodenal biopsy to confirm the disease.

**RESULTS:** 197 patients with HLA alleles predisposing (95 male and 102 female, aged 4-75 years, mean age:  $29,9 \pm 16,8$ ) participated in the study and was found 11 cases of seroconversion for IgA-EMA. IT person-time of seroconversion of IgA-EMA within 14 years of follow-up was found in this study, with 95% confidence interval,  $1.1 \pm 0.2$  cases of seroconversion per 100 person-years accompanied by an observation period of 1 to 14 years, average  $4 \pm 3.7$  years.

CONCLUSION: The incidence rate of seroconversion of IgA-EMA of 1.1 cases per 100 person-years suggests repetition of sporadic serological tests among patients with HLA alleles predisposing to DC belonging to the risk group of developing it.

Keywords: Celiac disease, seroconversion of IgA-EMA antibodies, genetic predisposition, HLA, follow-up.

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – O modelo do Iceberg celíaco.....	21
Figura 2 – Resposta imune adaptativo ao glúten na DC.....	25
Figura 3 – Classificação de Marsh-Oberhuber.....	30
Figura 4 – Mucosa duodenal normal.....	33
Figura 5 – Fluxograma da escolha da coorte e composição da amostragem.....	36
Figura 6 – IgA-EMA negativo (A) e positivo (B).....	42
Figura 7 – Fluxograma da conduta laboratorial e clínica da pesquisa.....	44
Figura 8 – Exemplo hipotético da proporção 1,1 caso por 100 pessoas-ano.....	48
Figura 9 – Gradiente de risco da DC.....	50
Figura 10 – Categoria de risco para realizar o exame de HLA.....	52

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Classificação histológica de Marsh.....	29
Tabela 2 – Sistema de escore para o diagnóstico da DC.....	31
Tabela 3 – Parentes (FM) da coorte .....	37
Tabela 4 – Parentes (FM) da amostragem.....	39
Tabela 5 – Resultado da pesquisa.....	47
Tabela 6 – Características dos pacientes com soroconversão.....	55
Tabela 7 – Sugestões de intervalo de repetição de exames séricos na literatura.....	69

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Amb/DC-HUB – Ambulatório de Doença Celíaca do Hospital Universitário de Brasília

CAP/HUB – Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário de Brasília

CEP/FS UnB – Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

CLSI – Clinical Laboratory and Standards Institute

d.C. – Depois de Cristo

DC – Doença celíaca

DM1 – Diabetes Mellitus Tipo 1

DNA – Ácido desoxirribonucleico

D.O. – Densidade óptica

EJ – Epitélio juncional

ELISA – Ensaio Imunoenzimático ou Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EMA – Antiendomísio

ESPGAN – Sociedade Européia de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica

ESPGHAN – Sociedade Européia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

FNT- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral Alfa

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

htTG – Transglutaminase tecidual humana

HUB – Hospital Universitário de Brasília

IC – Intervalo de Confiança

IgA – Imunoglobulina

IFN- $\gamma$  – Interferon- $\gamma$

IL – Interleucina

LIE – Linfócitos Intra-epiteliais

Lab DC/FMUnB – Laboratório de Pesquisas em Pediatria e Centro de Estudos da Doença Celíaca

MHC – Complexo Principal Histocompatibilidade

ml – mililitro

$\mu$ l – microlitro

$\mu$ m – micrometro

min – minutos

nm – nanômetro

PBS – Tampão fosfato-salino ou Phosphate Buffered Saline

PCR – Reação de Polimerase em cadeia ou Polymerase Chain Reaction

RBC – Red Blood Cell lysis

rpm – rotações por minuto

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Th1 – Células T-helper tipo 1

Th2 – Células T-helper tipo 2

TI – taxa de incidência

tTG – Antitransglutaminase tecidual

UnB – Universidade de Brasília

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. Definição.....	17
2.2. História da DC.....	17
2.3. Prevalência.....	19
2.4. Manifestação clínica.....	22
2.5. Fisiopatologia.....	24
2.6. Diagnóstico.....	27
2.7. Tratamento.....	32
3. OBJETIVO.....	34
4. MÉTODO.....	35
4.1. Delineamento da pesquisa.....	35
4.2. Seleção da coorte, abordagem e amostragem obtida.....	35
4.2.1. Critérios de inclusão.....	39
4.2.2. Critério de exclusão.....	39
4.3. Coleta, processamento e armazenamento de sangue.....	39
4.4. Identificação dos genes HLA predisponente.....	40
4.5. Exames sorológicos.....	40
4.5.1. Análise de anticorpos IgA Antitransglutaminase (IgA-tTG).....	41
4.5.2. Análise de anticorpos IgA Antiendomísio (IgA-EMA).....	41
4.6. Biópsia endoscópica duodenal.....	43
4.7. Conduta laboratorial e clínica.....	43
4.8. Cálculo da taxa de incidência.....	44
4.9. Cálculo estatístico dos resultados.....	45
4.10. Abordagem ética.....	46
5. RESULTADOS.....	47
6. DISCUSSÃO.....	49
7. CONCLUSÃO.....	68
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
9. REFERÊNCIAS.....	70

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença Celíaca (DC) é uma afecção sistêmica imunomediada do intestino delgado (inflamação da mucosa intestinal, hiperplasia de cripta e atrofia das vilosidades) elicitado pelo glúten presente nos cereais consumidos na dieta regular (trigo, cevada e centeio) e ocorre em indivíduos geneticamente predispostos (Husby *et al.*, 2012). A prevalência da DC na população mundial é de aproximadamente 1% e comum em caucasianos (Katz *et al.*, 2011). Entretanto existem grupos de risco com prevalência aumentada como parentes de primeiro grau e especialmente gêmeos univitelínicos (Dubé *et al.*, 2005; Almeida *et al.*, 2008), pacientes portadores de síndromes genéticas (Wouters *et al.*; Frost *et al.*, 2009), assim como pacientes com doenças autoimunes (Volta *et al.*, 2011).

Para auxiliar no processo de diagnóstico da DC existem vários tipos de exames, tais como: o genético pela amplificação dos alelos Antígeno Leucocitário Humano (HLA), o sorológico pela investigação dos anticorpos séricos da classe IgA Antitransglutaminase (IgA-tTG) e Antiendomísio (IgA-EMA) e pela biópsia da mucosa jejunal pela análise histológica seguindo a classificação de Marsh. Atualmente segue-se o protocolo de diagnóstico estipulados pela Sociedade Européia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica, a ESPGHAN de 2012 (Husby *et al.*, 2012).

A predisposição genética ocorre pelos alelos HLA de classe II expressos como HLA-DQ2 (DQA1\*0501/DQB1\*0201) e/ou HLA-DQ8 (DQA1\*0301/DQB1\*0302) e são responsáveis por apresentarem a fração tóxica do glúten para o sistema imune adaptativa e desencadearem o processo inflamatório deletério da enfermidade (Meresse *et al.*, 2012). A grande maioria (90%) dos pacientes portadores de DC amplificam alelos HLA-DQ2 e o restante possuem os alelos HLA-DQ8 ou parte dos alelos do HLA-DQ2, que pode ser o DQA1\*0501 ou o DQB1\*0201 (Sollid; Greco *et al.*, 2002; Bonamico *et al.*, 2006). O teste de rastreamento genético para a DC tem Valor Preditivo Negativo (VPN), o qual atua como coadjuvante no processo de definição dos casos em que necessitam de acompanhamento clínico e laboratorial por pertencerem a algum grupo de risco de desenvolverem a DC no

futuro e apresentarem soroconversão dos anticorpos IgA-EMA (Karell *et al.*, 2003., Bonamico *et al.*, 2006).

O marcador sorológico para a detecção da DC de maior sensibilidade e especificidade de aproximadamente 100% e com Valor Preditivo Positivo (VPP) é realizada pela análise dos anticorpos IgA-EMA feita pela técnica de imunofluorescência indireta em lâminas com cortes criostáticos de esôfago de primata sensibilizados com o antígeno endomísio (Godfrey *et al.*, 2010, Husby *et al.*; Fasano *et al.*, 2012). E o exame sorológico para detecção de anticorpos IgA-tTG pela técnica imunoenzimática de alta sensibilidade e especificidade, tem custo menor e é relativamente de fácil execução, é comumente utilizado para triagem de pacientes com suspeita de DC ou acompanhamento de pacientes DC após o início do tratamento, que é a total exclusão do glúten da dieta regular (Goldberg *et al.*, 2010).

Bonamico e a sua equipe propuseram o acompanhamento de indivíduos baseados no tipo de alelo predisponente para a DC (HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8), com repetição esporádica de exames sorológicos em indivíduos que tenham risco de desenvolver a mesma (Bonamico *et al.*, 2006; Husby *et al.*, 2012).

Alguns pesquisadores relatam a soroconversão para a DC pela detecção dos anticorpos da classe IgA-EMA entre pacientes que apresentem condições genéticas favoráveis ao aparecimento da DC, especialmente parentes de primeiro grau e portadores de Diabetes Mellitus Tipo 1 (DM1). Por isso, para evitar consequências do diagnóstico tardio como evolução com infertilidade, osteoporose, anemia, e até mesmo o câncer do intestino delgado, muitos estudos sugerem a repetição esporádica dos exames sorológicos específicos para a DC em indivíduos portadores de alelos HLA predisponente, principalmente nos grupos com risco elevado de desenvolver a enfermidade. Nesse grupo estariam parentes de primeiro (1º) grau de pacientes celíacos, portadores de síndromes genéticas, de doenças autoimunes, de sintomas atípicos. E também aqueles pacientes com fortes suspeitas clínicas, laboratorial, histológica, pois o resultado do exame sorológico prévio negativo não exclui a possibilidade de desenvolver a DC no futuro quando a dieta habitual contiver glúten (Niveloni *et al.*, 2000; Pittschieler *et al.*, 2003, Poulain *et al.*, 2007).

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 DEFINIÇÃO

A DC é uma desordem imunomediada do intestino delgado provocada pela constante sensibilização do sistema imune contra os peptídeos glúten e acomete indivíduos geneticamente predispostos. A proteína glúten é encontrada em cereais como trigo, cevada e centeio. É uma desordem multifatorial que envolve fatores genéticos, ambientais e imunológicos, por esta razão a enfermidade possui várias manifestações clínicas até mesmo de forma sistêmica (Husby *et al.*; Meresse *et al.*, 2012).

### 2.2 HISTÓRIA DA DC

O cultivo dos cereais iniciou-se no período Neolítico na região conhecida como “Crescente Fértil” próximo aos rios Tigre, Eufrates e alto do Nilo. A história da DC remete ao Século II d.C em que a primeira citação da alteração gastrointestinal, semelhante à DC, foi atribuída a um médico grego, o Arateus da Capadócia (Losolwsky, 2008). Já o referencial, no Século XIX, refere ao médico inglês Samuel Gee, em 1888, que descreveu uma doença chamada de “Afecção Celíaca”, cujos sintomas eram diarreia, fraqueza muscular, distensão abdominal, perda ou pouco ganho de peso, cronicidade do curso da doença e afetava todas as idades, especialmente crianças (Dowd, 1974). Em 1924, Sidney Haas descreveu um tratamento, dieta à base de bananas, que foi aplicado por aproximadamente cinquenta anos (Paveley, 1988).

Durante a Segunda Guerra Mundial, em 1941, houve na Holanda grande escassez de alimentos disponíveis, especialmente pães. O pediatra holandês, Willem Dicke, observou a melhora clínica surpreendente das crianças celíacas com a exclusão de trigo, centeio, cevada e aveia da dieta. Assim, em 1953, os colegas de

Dicke, Weijers e Van de Kamer, identificaram a fração tóxica deletéria do glúten, a gliadina, contida nos cereais causadores da DC (Losowsky, 2008).

E em 1954, Paulley reportou a correlação entre manifestação clínica da enfermidade e destruição da parede do intestino delgado, a partir destes achados, os estudos histológicos passaram a ser cruciais no diagnóstico da enfermidade. Em 1956, Shiner e Royer descreveram a primeira referencia bem sucedida de biópsia jejunal *per oral*, mas a técnica ainda apresentava muitas desvantagens e dificuldades (Paveley, 1988). Em 1957, Crosby e Kugler publicaram detalhes de um instrumento flexível pouco invasivo equipado com ar pressurizado, a cápsula de Crosby, técnica adotada por muitos anos, mas permitia a obtenção de apenas um fragmento (Losowsky, 2008).

Em 1969, a Sociedade Européia de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica (ESPGAN) estabeleceu critério para diagnóstico da DC com a recomendação da realização de três biópsias: uma no momento da suspeita clínica, outra após um ano sem glúten na dieta e a última com a reintrodução do componente tóxico na alimentação no intuito de verificar o reaparecimento das lesões na mucosa intestinal (Auricchio *et al*, 1996).

De 1970 a 1980 houve início dos exames sorológicos pela dosagem de anticorpos específicos como antigliadina e antireticulina. Mais tarde, Chorzelski e colaboradores, em 1983, iniciaram uma nova era de diagnóstico com a detecção do anticorpo específico, o antiendomísio, no músculo liso do esôfago de macaco. Um exame sorológico de imunofluorescência indireta de alta sensibilidade e especificidade para a DC utilizado até os dias atuais (Chorzelski *et al.*, 1983).

O avanço dos métodos de diagnóstico e conseqüentemente o aumento dos estudos epidemiológicos permitiu evidenciar a alta prevalência da DC entre gêmeos e parentes de primeiro grau indicando a suspeita de um componente genético envolvido. Em 1986, Strobe, Cooke e outros pesquisadores descreveram a suscetibilidade genética ao demonstrarem regiões específicas dos alelos HLA associados com doença (Stokes *et al.*; Falchuk *et al.*, 1972). Na seqüência Ferguson e Mac Donald reportaram a relação do glúten com a imunidade linfócito mediada e com a destruição da mucosa intestinal (Ferguson *et al.*, 1975).

Em 1990 novas normas de diagnóstico foram sugeridas no ESPGAN por Walker-Smith, embora os exames sorológicos tenham sido incorporados, a biópsia jejunal ainda era o padrão-ouro na determinação do diagnóstico (Walker-Smith *et al.*, 1990). Em 1992, Marsh estabeleceu uma classificação histológica das lesões, a qual varia entre hiperplasia de criptas com aumento dos linfócitos intraepiteliais e atrofia das vilosidades intestinais (Marsh, 1992).

Anos depois, em 1997, Dieterich identificou a enzima Transglutaminase tecidual (tTG) como sendo o autoantígeno capaz de induzir o aumento da permeabilidade tecidual. Na mesma época, Sulkanen e Dieterich desenvolveram o método de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para quantificação dos anticorpos IgA antitransglutaminase (IgA-tTG) (Dieterich *et al.*, 1998). Paralelamente outros pesquisadores relataram a deamidação do glúten pela tTG e consequente desencadeamento da patogênese da DC (van der Wal *et al.*; Molberg *et al.*, 1998).

Em 2012, a nova revisão dos critérios de diagnóstico foi publicada pela Sociedade Européia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica (ESPGHAN), pelo novo critério de diagnóstico a biópsia deixou de ser considerada como padrão-ouro. A diretriz ancorou-se em analisar os sintomas, a sorologia, a genética, a biópsia e a melhora clínica com o início do tratamento (Husby *et al.*, 2012).

### 2.3 PREVALÊNCIA

Quanto à prevalência, a DC é considerada como intolerância alimentar mais comum entre os ocidentais, e até a década de 70, o diagnóstico ancorava-se apenas em sinais e sintomas clínicos de má absorção e esteatorreia como afecção comum entre crianças. A prevalência da enfermidade era de aproximadamente 0,03% (Lohi *et al.*, 2007). Mas na década de 80, com o advento dos exames sorológicos de alta sensibilidade e especificidade o aspecto epidemiológico ampliou sua abordagem de forma global inclusive no que se refere às manifestações clínicas da doença.

Atualmente, a prevalência na população em geral é de aproximadamente 1% com predominância entre caucasianos (West *et al.*, 2003; Dubé *et al.*, 2005; Katz *et al.*, 2011), mas se compará-la entre os gêneros é duas a três vezes maior entre as mulheres (Bai *et al.*, 2005). Em relação à faixa etária, de 30 a 64 anos, houve algumas diferenças entre os países: 2,4% na Finlândia, 0,3% na Alemanha, e 0,7% na Itália (Mustalahti *et al.*, 2010). Outros estudos feitos na Finlândia, evidenciam que entre crianças, a prevalência constatada foi de 1,5% (Mäki *et al.*, 2003) e entre idosos de 2,13% (Vilppula *et al.*, 2008).

A DC tem sido diagnosticada em diferentes países e etnias, reconhecida em continentes com descendentes de europeus como a Austrália, Nova Zelândia, Estados Unidos, Canadá e países da América do Sul (Gandolfi *et al.*, 2000; Hovell *et al.*, 2001; Cummins *et al.*, 2009). Aqui no Brasil foi encontrada a prevalência entre doadores de sangue (adultos saudáveis) de 1:214 a 1:681, sendo este último constatada em estudo desenvolvido em Brasília (Gandolfi *et al.*, 2000; Melo *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007). Também tem sido verificado entre os povos nativos no Chile (Araya *et al.*, 2000) e entre os adultos mestiços doadores de sangue no México 2,6% (Remes-Troche *et al.*, 2006).

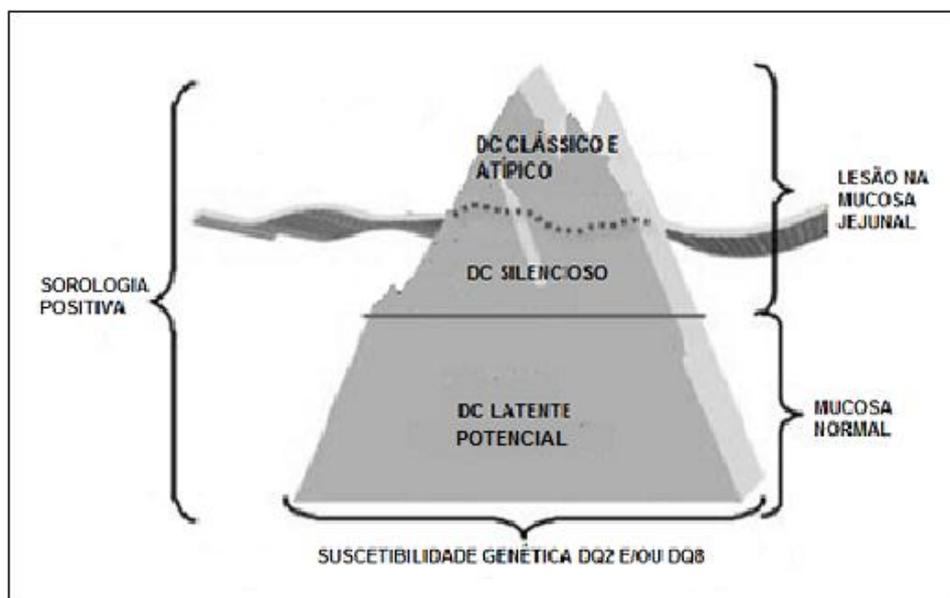
Embora casos de pacientes de origem asiática com a DC sejam raras, há relatos de estudos de prevalência oriundos da China (Freeman, 2003; Wu *et al.*, 2010). Na África Central é considerada como uma condição rara, verificada similarmente também entre afrodescendentes americanos e brasileiros (Brar *et al.*, 2005; Barada *et al.*, 2010; Almeida *et al.*, 2012). No Oriente Médio e no Norte da África a prevalência é a mais alta, principalmente entre as crianças Saharawi com prevalência de 5,6% (Catassi *et al.*, 1999). Na Turquia o valor encontrado foi relativamente alto 1,3% (Tatar *et al.*, 2004).

Em relação aos grupos de risco com prevalência maior de DC, tais como, pacientes com síndromes genéticas, especialmente a síndrome de Down de 5,2% (Wouters *et al.*, 2009), de Williams e de Turner 3,2% (Frost *et al.*, 2009), bem como crianças com desordens autoimunes, especialmente Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) 3% a 16% (Volta *et al.*, 2011), e ainda outras como deficiência de Imunoglobulina A (IgA) (Wang *et al.*, 2011), tireoidite autoimune (Metso *et al.*, 2012), hepatite autoimune (Panetta *et al.*, 2012), alopecia areata (Naveh *et al.*, 1999), dermatite

herpetiforme (Nieuwenhuis *et al.*, 2010), ataxia (Freeman, 2010). Na verdade, pela possibilidade de partilhar alelos HLA predisponentes, entre parentes a prevalência é aumentada e varia de aproximadamente 4,8% a 20% e de 75% entre gêmeos monozigóticos. (Greco *et al.*, 2002; Högberg, 2003; Dubé *et al.*, 2005). Em Brasília, entre parentes de primeiro grau a prevalência foi de 4,8% (Almeida *et al.*, 2008).

Nas últimas décadas, com o advento de métodos diagnósticos foi possível notar pacientes celíacos com diferentes manifestações sintomatológicas. Por causa disso, existe uma gama de indivíduos sem ainda terem sido diagnosticados com a enfermidade. Estudos recentes mostram o aumento da prevalência nos Estados Unidos e países da Europa em 2% a 4,5% (Lohi *et al.*, 2007; Rubio-Tapia *et al.*, 2009; Catassi *et al.*, 2010). Logo, a prevalência da DC foi esquematicamente comparada a um iceberg (Figura 1) (Mäki *et al.*, 1997; Fasano *et al.*, 2001; Lionetti *et al.*, 2011; Ludvigsson *et al.*, 2012).

Figura 1 – O modelo do Iceberg celíaco.



Fonte: Adaptação de Lionetti & Catassi, 2011.

Sendo acima da linha d'água, na parte visível, estão os pacientes com a forma clássica da doença, por apresentar sintomas gastrointestinais típicos são

facilmente diagnosticados e os que estão próximo à linha limítrofe, os pacientes atípicos. Entretanto a extensa base submersa abrange os casos complexos de serem reconhecidos, com pouco ou nenhum sinal e sintoma característicos da enfermidade, com ou sem lesões na parede da mucosa intestinal, mas geneticamente predisponentes pelos alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (Mäki *et al.*, 1997).

## 2.4 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA

A DC pode se manifestar de várias formas dependendo da duração e extensão da doença, da presença ou ausência de outras patologias extraintestinais e da idade do paciente. Por estas variações das características clínicas no momento da apresentação e por envolver, em paralelo, a análise das anormalidades sorológicas, histológicas e genéticas no momento do diagnóstico a DC pode ser dividido em várias formas (Husby *et al.*; Ludvigsson *et al.*; Sapone *et al.*, 2012 ).

A forma Clássica ou Típica apresenta genética predisponente, sorologia específica positiva e biópsia compatível sinais e sintomas clássicos, tais como, má absorção, diarreia crônica, anorexia, distensão abdominal, perda de massa muscular, nádegas plana, esteatorreia, edema por hipoalbuminemia, flatulências, fraqueza, irritabilidade (Mäki *et al.*, 1988; Fasano & Catassi, 2001; Ludvigsson *et al.*, 2004). Ocorre geralmente entre crianças (6 e 18 meses de idade) que apresentam o desenvolvimento normal até o início da introdução dos alimentos contendo prolaminas do glúten e evoluem com atraso pondero-estatural e síndrome de má absorção típicos da DC (Fasano & Catassi., 2005).

A forma Atípica ou Não-clássica ou Subclínica pode ser diagnosticada em qualquer idade, envolver outros órgãos e sistemas, e manifestar quadro clínico variado até mesmo com ausência de sintomas gastrointestinais (Fasano & Catassi, 2005; Ludvigsson *et al.*, 2012). Apresenta sorologia positiva, biópsia e genética compatível com a DC. As manifestações clínicas são variadas, tais como, anemia resistente ao tratamento (Baydoun *et al.*, 2012), epilepsia de difícil controle

(Licchetta *et al.*, 2011), defeitos de desenvolvimento do esmalte dentário (Aine *et al.*, 1990; Rashid *et al.*, 2011), osteoporose (Sambrook *et al.*, 2006), infertilidade em mulheres e em homens (Baker *et al.*, 1975; Molteni *et al.*, 1990), atraso de crescimento (Troncone *et al.*, 2010), abortos de repetição (Martinelli *et al.*, 2010), osteoporose (Larussa *et al.*, 2012), câncer intestinal (Elli *et al.*, 2012), alopecia areata (Naveh *et al.*, 1999), deficiência de Imunoglobulina A (Wang *et al.*, 2011), ataxia cerebelar (Freeman, 2008), dermatite herpetiforme (Salmi *et al.*, 2011), DM1 (Volta *et al.*, 2011) e outras doenças autoimunes e genéticas (Panetta *et al.*, Metso *et al.*, 2012).

A forma Silenciosa é caracterizada pela presença de alelos HLA predisponentes, alterações sorológicas e histológicas compatíveis com a DC, ocorre em um grupo de indivíduos aparentemente saudáveis sem sintomas relacionados ou os tem de forma subclínica, e diagnosticadas ao acaso ao participarem de programas de investigação por pertencer a algum grupo de risco como parentes de primeiro grau ou portador de síndromes genéticas e doenças autoimunes (Swigonski *et al.*, 2006; Barker *et al.*, 2008; Freeman, 2010; Husby *et al.*, 2012). Embora seja de forma silenciosa, os pacientes revelam, durante a anamnese, sintomas relacionados com a enteropatia e melhoram a qualidade de vida após o início do tratamento (Kneepkens *et al.*, 2012).

Por sua vez, a DC pode ainda ser analisada em grupos de pacientes classificados como o da forma Potencial é caracterizada por pacientes com ou sem sintomas, com alelos HLA predisponentes para a DC, com análise sorológica positiva, entretanto não apresentam enteropatia e a biópsia pode se apresentar sem lesões na mucosa jejunal apenas com aumento de linfócitos intraepiteliais (LIE). Os indivíduos com esta forma podem ou não desenvolver lesões na mucosa intestinal no futuro (Husby *et al.*; Kneepkens *et al.*; Ludvigsson *et al.*; Sapone *et al.*, 2012).

Por último, os portadores de DC com a forma Latente, os quais possuem genes predisponentes para a doença, biópsia negativa e podem se apresentar com ou sem sintomas e com ou sem presença de anticorpos, mas que tenha tido uma enteropatia dependente de glúten registrada no passado (Husby *et al.*; Kneepkens *et al.*, 2012).

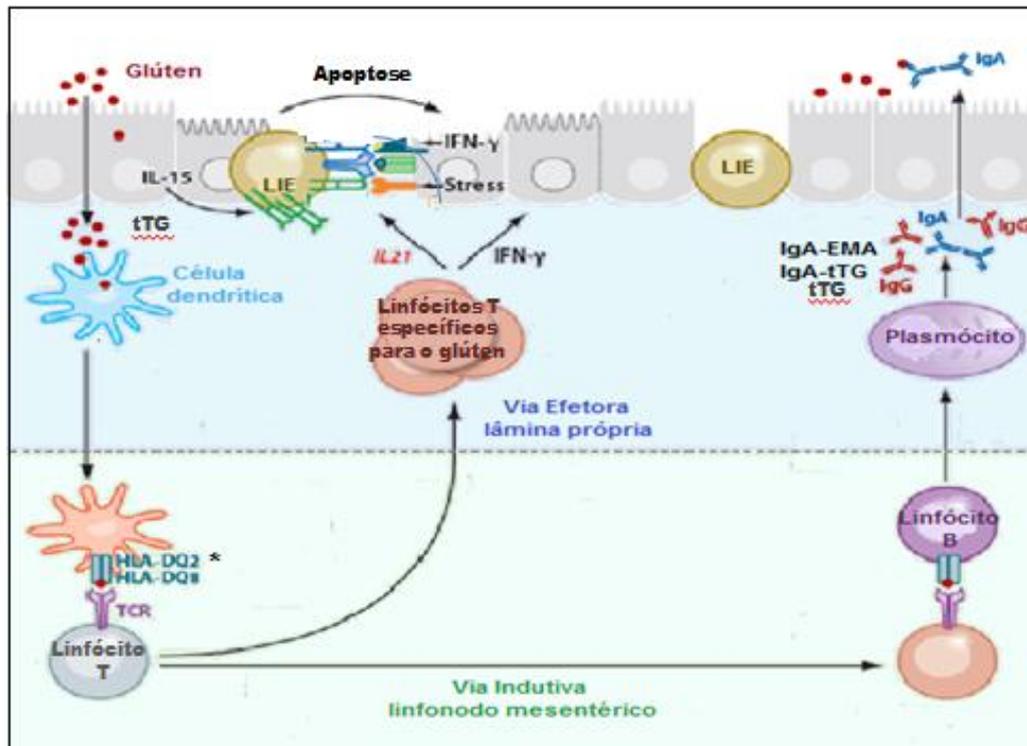
## 2.5 FISIOPATOLOGIA

Em relação à fisiopatologia, a predisposição genética representada pelos alelos HLA, a versão humana do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC), que são *locus* de genes codificadas em proteínas envolvidas no processamento de antígenos proteicos e na apresentação de peptídeos às células linfocitárias T, as moléculas de MHC classe I apresentam antígenos para as células citotóxicas T CD8+, e as de classe II, para as células auxiliares T CD4+. O HLA de classe II é expresso pelos genes localizado no cromossomo 6p21, que desempenha um papel importante no desencadeamento da DC. Os genes HLA predisponentes para a DC são expressos pelos alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) e HLA DQ8 (DQA1\*0301 e DQB1\*0302). O tipo HLA-DQ2 está presente na maioria dos pacientes portadores da enfermidade e o remanescente possui o alelo HLA-DQ8 ou parte dos alelos do HLA-DQ2 (Sollid *et al.*, 1989; 2002). E a interação dos alelos HLA predisponentes juntamente com a presença do glúten na dieta, e possivelmente associado a outros fatores ambientais, induzem uma resposta imune na parede do intestino delgado (Figura 2) resultando em dano tecidual característicos da DC (Di Sabatino *et al.*, 2012). Outros genes não-HLA também estão envolvidos com a DC. E estão situados nos outros loci 5q31-33, 2q33, 19p13-1, 4q27, 1q31, 2q11-2q12, 3p21,3q25-3q26, 6q25, 12q24 (Abadie *et al.*, 2011).

O glúten é uma mistura conglomerada de proteínas proveniente da fragmentação das prolaminas (estrutura) e glutaminas (fração tóxica) presentes no trigo (gliadinas e gluteninas), na cevada (hordeínas) e no centeio (secalinas). O peptídeo do glúten com maior imunotoxicidade pertence à família das gliadinas, mais especificamente a  $\alpha$ -gliadina com a sua porção conhecida como 33-mer, a qual é resistente às proteases humanas coadjuvante da digestão identificado como iniciador da resposta inflamatória da DC (Shan *et al.*, 2002; Shewry, 2007; Morón *et al.*, 2008). A glutamina carrega um grupo amino extra, de carga positiva, considerada como um substrato ideal para a enzima transglutaminase tecidual (tTG) provocar uma reação cálcio dependente, denominada deamidação, convertendo-a em ácido glutâmico, de carga negativa. Por sua vez, este último confere grande afinidade de acoplamento com os epítomos dos alelos HLA DQ2 e DQ8 das células dendríticas

presentes na lâmina própria, conseqüentemente, ativam a primeira parte da resposta inflamatória da DC (Molberg et al., 1998; Lionetti et al., 2011; Di Sabatino et al., 2012).

Figura 2 – Resposta imune adaptativa ao glúten na DC.



Fonte: Adaptação de Abadie *et al.*, 2010.

O peptídeo de glúten ao alcançar a lâmina própria, via paracelular, transcitose ou retrotransporte, sofre deamidação por TG2. Através dos epítomos do HLA, células dendríticas (APC) apresentam o peptídeo e aos linfócitos T CD4+ ativando-os. A ativação torna-as células T efetoras do tipo Th1, secretora de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-15, FNT- $\alpha$ ), e do tipo Th2, que induz os Linfócitos B (plasmócitos) a secretarem anticorpos AGA, tTG e EMA. As citocinas estimulam os LIE (NK) que causam a apoptose dos enterócitos configurando a atrofia das vilosidades típicas da DC. \*HLA=MHC (Complexo de Histocompatibilidade Maior)

O mecanismo imunológico predominante na DC é a resposta imune adaptativa contra os peptídeos do glúten na lâmina própria da mucosa intestinal, os quais são transpostos através do epitélio juncional (EJ) do intestino via paracelular ou via transcelular do lúmen intestinal. O mecanismo pelo qual se atribui a

passagem da fração tóxica do glúten ainda não está bem esclarecido, mas estudos feitos *in vitro* indicam que a ligação de gliadina com a citocina é crucial para a libertação da zonulina e subsequente aumento da permeabilidade intestinal (Drago *et al.*, 2006; Schumann *et al.*, 2008; Lammers *et al.*, 2008; Kupfer *et al.*, 2012).

Os antígenos têm afinidade específica com o epítipo HLA DQ2 ou DQ8 da célula dendrítica, sendo esta ativada, recebe o nome de célula apresentadora de antígeno (APC). Esta por sua vez, migra para os órgãos linfóides mesentéricos (placas de Peyer) e ativa o processo de apresentação dos peptídeos do glúten para linfócitos T CD4+ inativos ou células T auxiliares. Os linfócitos T CD4+ ao ser ativada torna-se células T efetora, em seguida deixam os linfonodos e se dirigem para a lâmina própria para executar suas funções através de subpopulações efetoras como células T-helper tipo 1 (Th1) e células T-helper tipo 2 (Th2). A Th1 induz a célula T efetora à produção de citocinas, tais como, interferon gama (IFN- $\gamma$ ), o fator de necrose tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ) e interleucina 15 (IL-15) que promovem o efeito inflamatório e aumentam a permeabilidade entre as camadas do EJ resultando em atrofia vilositária e hiperplasia de cripta característicos da DC. A Th2 induz a ativação e expansão clonal das células dos linfócitos B, os quais se diferenciam em plasmócitos e secretam anticorpos IgA e IgG contra os peptídeos do glúten, o autoanticorpo tTG ou TG2 corroborando para a constante manutenção da resposta inflamatória e dano tecidual alterando a configuração do intestino delgado (Abadie *et al.*, 2010).

A resposta inflamatória não se restringe às células linfocitárias T CD4+, mas também às células T CD8+ ou, por serem sentinelas infiltradas entre os enterócitos no epitélio intestinal, linfócitos intraepiteliais (LIE). Na DC ativa, as citocinas são secretadas por várias células envolvidas com o processo inflamatório e estão aumentadas, mas especialmente a citocina IL-15 podem levar à ativação descontrolada dos LIE e sua expansão, como consequência, estas ativam as células Natural Killer (NK) e os habilita para promover a apoptose dos enterócitos aumentando a permeabilidade o que causa mais danos na arquitetura da mucosa intestinal típicos da DC e induz à produção constante dos autoantígenos e sua deposição na lâmina própria perpetuando o dano da mucosa intestinal até que haja a total exclusão do glúten da dieta. Estes estágios da degradação tecidual intestinal foram estabelecidos por Marsh, os quais são visualizáveis através da biópsia

endoscópica duodenal. Sendo frequentemente requisitado por médicos como parte integrante do processo de diagnóstico. (Marsh, 1992; Meresse *et al.*, 2006, 2012; Abadie *et al.*, 2010).

## 2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da DC exige uma anamnese e exame clínico detalhado, pois apresenta uma grande variedade de sinais e sintomas inespecíficos. É necessário identificar não só sintomas gastrointestinais, mas também quadros clínicos menos evidentes, pois a DC tem envolvimento com vários órgãos e sistemas. O novo consenso feito por 15 especialistas do ESPGHAN publicado em 2012 por Husby. A diretriz enalteceu a relevância de um diagnóstico correto e definitivo com o uso de exames laboratoriais específicos com alta sensibilidade e especificidade, de tipagem de alelos predisponentes HLA-DQ2 e HLA-DQ8 e da análise histológica pela biópsia jejunal. Entretanto se não houver resposta clínica à dieta isenta de glúten em pacientes que preenchem os critérios diagnósticos para DC, após uma avaliação cuidadosa para excluir a falta de adesão à dieta, são necessárias novas investigações, as quais podem incluir biópsias adicionais. Além do mais, para a interpretação dos resultados pela análise de anticorpos séricos deve-se levar em conta o padrão de consumo de glúten, a idade do paciente e os níveis totais de IgA sérico. Se a exposição ao glúten for baixa ou inexistente por um longo período o resultado negativo não é confiável (Husby *et al.*, 2012).

Os exames sorológicos para detecção de anticorpos IgA antitransglutaminase (IgA-tTG) e IgA antiendomísio (IgA-EMA) de alta sensibilidade (93% para ambos) e especificidade (maior que 98% e 99% respectivamente) surgiram nas últimas décadas e suplantaram o teste antigliadina (AGA), que tem baixa especificidade (Lewis & Scott, 2006). Este último, atualmente ainda é indicado como coadjuvante no diagnóstico de crianças com menos de 2 anos de idade, a qual tem baixa sensibilidade para o exame IgA EMA, ou em pacientes com deficiência de IgA sérico (menor que 0,2g/L, segundo ESPGHAN 2012) por quantificar anticorpos da classe IgA e IgG no mesmo kit comercial (Maglio *et al.*, 2010; Husby *et al.*, 2012).

O marcador sorológico para detecção de anticorpos IgA-tTG é um exame quantitativo de alta sensibilidade e especificidade realizada pela técnica imunoenzimática ELISA. Por ser de fácil manuseio e custo menor que o IgA-EMA, é exame de eleição para triagem inicial no caso de suspeita clínica e triagem populacional (Rashtak et al., 2008). Mas o marcador sorológico IgA-EMA feita pelo método de imunofluorescência indireta detecta os anticorpos antiendomísio entre as miofibrilas em cortes criostáticos de esofago de primata. E por analogia, por ser um anticorpo sérico detectado também entre as miofibrilas do intestino delgado, é considerado como indicador de progressão inflamatória da mucosa intestinal. E, por esta razão o exame IgA-EMA, por apresentar alta especificidade e sensibilidade próximos a 100%, maior que o exame IgA-tTG, é considerado como exame de valor preditivo positivo (VPP) (Chorzelski *et al.*, 1983; Alessio *et al.*, 2012).

Devido probabilidade de atrofia vilositária ser alta em crianças e adolescentes com sinais e sintomas sugestivos de DC e altos títulos de IgA tTG, com níveis 10 vezes maiores que o valor limite sugerido pelo teste ELISA, a biópsia pode ser uma opção. Mas deve colher nova amostra de sangue, para descartar qualquer erro técnico anterior, e investigar anticorpos IgA EMA. Se o teste EMA resultar em positivo na segunda amostra de sangue recomenda-se realizar teste genético de tipagem de alelos HLA para reforçar o diagnóstico.

As biópsias podem ser evitadas em indivíduos com baixos níveis de anticorpo tTG (menos de 3 vezes o valor de referência), nesse caso é recomendado a realização da investigação de anticorpos mais específico, o EMA. Se o teste EMA resultar em positivo, encaminha-se para biópsias duodenais. Se negativo, é recomendado a repetição do exame sérico tTG num intervalo de 3 a 6 meses com uma dieta regular contendo glúten. Nos casos de deficientes de IgA sérico, além do exame AGA pode-se usar o marcador da classe IgG para detectar anticorpos EMA e tTG (Husby *et al.*, 2012).

Por ser considerado exame de alto valor preditivo negativo (VPN), a tipagem de alelos HLA DQ2 e DQ8 é útil para excluir a DC ou verificar se o diagnóstico é improvável nos casos em que os exames sorológicos de ambos marcadores resultarem negativos e nos casos com pequenas alterações na biópsia intestinal (Husby *et al.*, 2012). Este exame é comumente indicado para indivíduos

assintomáticos ou com condições associadas com a DC para verificar a necessidade de acompanhamento clínico, principalmente familiares de pacientes celíacos, portadores de doença autoimune e genética (Romanos *et al.*, 2009).

A biópsia duodenal para verificação histológica do intestino delgado era considerada como padrão-ouro do diagnóstico nas diretrizes do ESPGAN de 1990, mas atualmente é um coadjuvante analisado juntamente com os exames sorológico, genético e clínico. A primeira classificação histológica dos padrões de atrofia vilositária da mucosa duodenal específico para a DC foi classificada por Marsh (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação histológica de Marsh.

Classe	Denominação	Descrição
Marsh 0	Pré-infiltrativa Mucosa normal	Vilosidades e criptas sem alteração. LIE em quantidade normal
Marsh 1	Lesão infiltrativa	Aumento de LIE (maior que 40 a cada 100 enterócitos)
Marsh 2	Lesão hiperplásica	Aumento de LIE e hiperplasia de criptas
Marsh 3	Lesão destrutiva	Aumento de LIE e hiperplasia de criptas com grau variável de atrofia vilositária
Marsh 4	Lesão hipoplásica	Atrofia vilositária total com hipoplasia das criptas

Fonte: adaptação de Marsh, 1992.

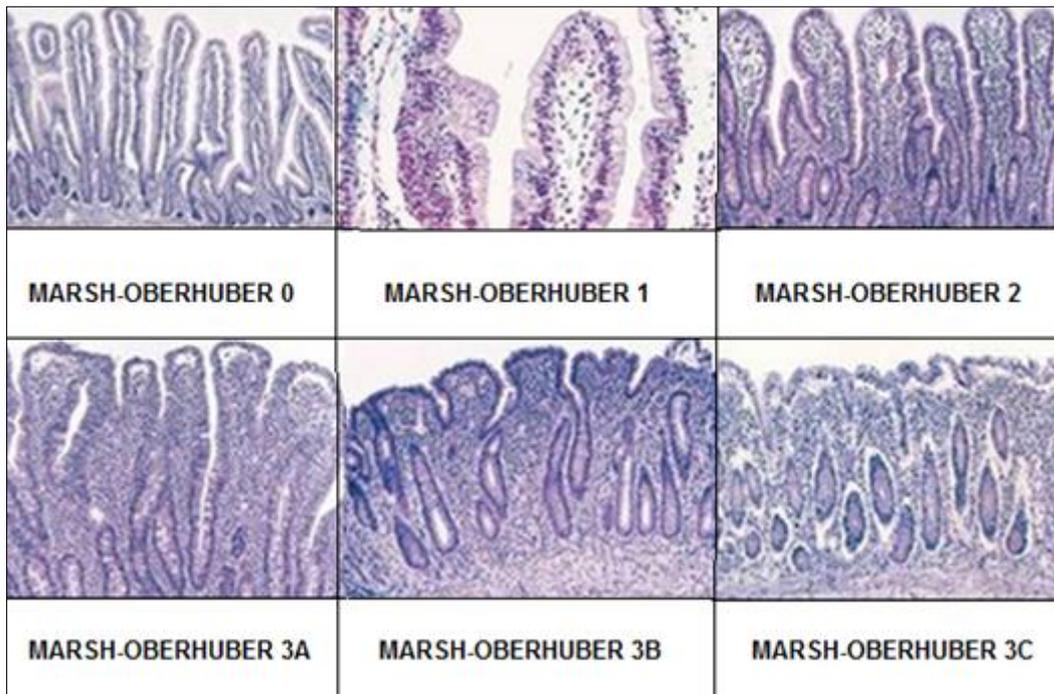
O estágio destrutivo da classificação de Marsh foi reclassificado por Oberhuber e denominada classificação de Marsh-Oberhuber (Figura 3): Marsh 3A com discreta diminuição dos vilos; Marsh 3B com atrofia das vilosidades e Marsh 3C com atrofia total e hipoplasia cripta (Oberhuber, 1999).

O relatório de patologia deve incluir uma descrição quanto à orientação do tecido observado, à presença ou não de vilosidade, ao alongamento das criptas, à relação entre vilosidades-cripta e ao número de linfócitos a cada 100 enterócitos (E) de acordo com a classificação de Marsh-Oberhuber (Oberhuber *et al.*, 2000).

A presença de atrofia vilositária pode ser características de outras enfermidades além da DC como, sprue tropical, hipergamaglobulinemia,

hipersensibilidade a proteínas alimentar, linfoma intestinal, tuberculose, giardíase, doença de Crohn, enterite infecciosa, infestação parasitária, desnutrição severa, e outros (Vande Voort *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2010).

Figura 3 – Classificação de Marsh-Oberhuber.



Fonte: Adaptação de Meijer, 2003.

Husby e colaboradores sugerem o uso de um sistema de escore para analisar a possibilidade de instaurar um diagnóstico simplificado e fidedigno como abordagem inicial, além disso, possibilita a avaliação do diagnóstico feito no passado pela diretriz anterior estipulada por ESPGAN de 1990.

O escore (Tabela 2) está baseado em quatro categorias: sintomas, anticorpo sérico, HLA e histologia, cada qual contribui somente uma vez para a pontuação. Para fazer o diagnóstico, a soma requerida pela contagem dos escores indicados por categorias é de 4 pontos, mas a pontuação menor que 4 não descarta a possibilidade de ser portador de DC.

Deste modo fica claro quem necessita de acompanhamento prolongado. Nos casos de deficiência de IgA investiga-se anticorpos da classe IgG nos exames séricos.

Tabela 2 – Sistema de escore para o diagnóstico da DC.

SINTOMAS:	Síndrome de má-absorção	2 pt
	Outros sintomas atípicos*	1 pt
	Assintomático	0 pt
ANTICORPO SÉRICO:	EMA positivo ou tTG positivo >10x a U	2 pt
	tTG positivo fraco ou AGA positivo	1 pt
	Não foi feita a sorologia	0 pt
	Sorologia feita, mas todos negativos	-1 pt
HLA:	DQ2 e DQ8	1 pt
	Não tem HLA feito ou só metade do DQ2, ex. DQB	0 pt
	HLA sem DQ2 nem DQ8	-1 pt
HISTOLOGIA:	Marsh 3B ou 3C	2 pt
	Marsh 2 ou 3A	1 pt
	Marsh 0 ou 1 ou sem biópsia feita	0 pt

Fonte: Adaptação de Husby *et al.*, 2012. \*Anemia, síndrome genética, doenças autoimunes, etc.

Paralelo ao sistema de escore proposto no ESPGHAN de 2012 (Husby *et al.*, 2012), ainda existe o processo de diagnóstico definitivo para a DC é necessário preencher ao menos quatro critérios de cinco itens descritos a seguir, tais como:

- 1) Apresentar sintomas típicos da DC;
- 2) Exame sorológico com anticorpos da classe IgA positivos;
- 3) Ter alelos predisponentes HLA-DQ2 e/ ou DQ8;
- 4) Biópsia com atrofia vilositária;
- 5) Responder à dieta livre de glúten com a melhora clínica.

Consequentemente, o diagnóstico considerado definitivo para a DC pode acarretar em longo período de acompanhamento clínico, laboratorial e nutricional (Bai *et al.*, 2013).

Em virtude de um grande número de pessoas, mesmo não diagnosticadas com a DC, seguirem a dieta sem glúten, cientistas constataram as diferentes reações que o organismo apresenta perante exposição ao glúten e recomendaram uma nova nomenclatura e classificações. A reação do organismo ao glúten pode ocorrer de três formas: alergia (alergia ao trigo), autoimune (DC, dermatite herpetiforme e ataxia por glúten) e possivelmente imuno mediada (sensibilidade ao glúten). A alergia ao trigo é mediada pela imunoglobulina da classe IgE; a DC, dermatite herpetiforme e a ataxia por glúten por IgA; mas a sensibilidade ao glúten ainda não teve o seu mecanismo de ação identificada. O diagnóstico diferencial das três condições está baseado na combinação das informações clínicas, biológicas, genéticas e histológica. Na maioria dos casos as informações da apresentação clínica podem ser suficientes para distinguir entre alergia e as outras desordens causadas por glúten. A alergia ao glúten é confirmada por *prick test* e dosagem de IgE, específicos para o trigo, e teste de exposição ao glúten. Entretanto para distinguir entre DC e sensibilidade ao glúten, os marcadores sorológicos específicos da DC devem ser o primeiro passo incluído no processo de investigação.

O diagnóstico da sensibilidade é por exclusão, caso a possibilidade de ser DC for excluída, desconfia-se da sensibilidade ao glúten, mas até o momento não existem marcadores sorológicos, ou mesmo se desconhece a fisiopatologia e a possibilidade de exclusão do glúten pode ser considerada (Sapone *et al.*, 2012).

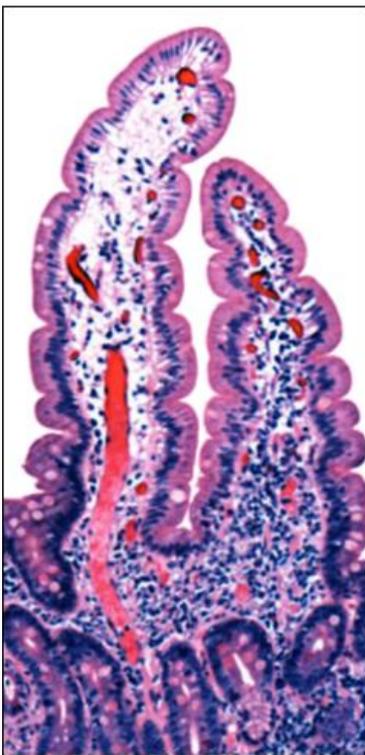
## 2.7 TRATAMENTO

O tratamento efetivo para a DC é a dieta rigorosamente isenta de glúten introduzida após a conclusão do processo de diagnóstico e perdura ao longo da vida. A dieta retirando ingredientes contendo trigo, cevada e centeio resulta em remissão clínica, sorológica e histológica (Figura 4).

Todavia, para manter o tratamento o paciente necessita, além do seu esforço próprio e compreensão da enfermidade como uma situação condicional, de auxílio de nutricionistas e médicos, de recursos financeiros, e de cuidados redobrados com relação à contaminação cruzada, na qual menos de 10 miligramas de glúten por dia seria suficiente para causar anormalidades histológicas (Dicke, 1951; Akobeng *et al.*, 2008).

No Brasil no ano de 1992, foi promulgada a Lei Federal nº 8.543 sobre a obrigatoriedade da impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten medida coadjuvante para garantir o seguimento correto do tratamento.

Figura 4 – Mucosa duodenal normal.



Fonte: Adaptação de Bao *et al.*, 2012.

Mucosa duodenal normal, com a relação vilosidade /cripta (>3:1) e LIE escassos. Corados em hematoxilina-eosina observados num aumento de 100X.

### 3. OBJETIVO

Determinar a taxa de incidência pessoa-período de soroconversão dos anticorpos da classe IgA-EMA numa coorte de pacientes com alelos HLA predisponente, pertencentes aos grupos de risco elevado para desenvolvê-la, atendidos no Ambulatório de Doença Celíaca do Hospital Universitário de Brasília (AmbDC/HUB) em até 14 anos de acompanhamento (1998 a 2012).

## 4. MÉTODO

### 4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Trata-se de um estudo observacional, descritivo, longitudinal de taxa de incidência de soroconversão dos anticorpos IgA-EMA numa coorte de pacientes com alelos HLA predisponente para DC atendidos no AmbDC/HUB em até 14 anos de acompanhamento.

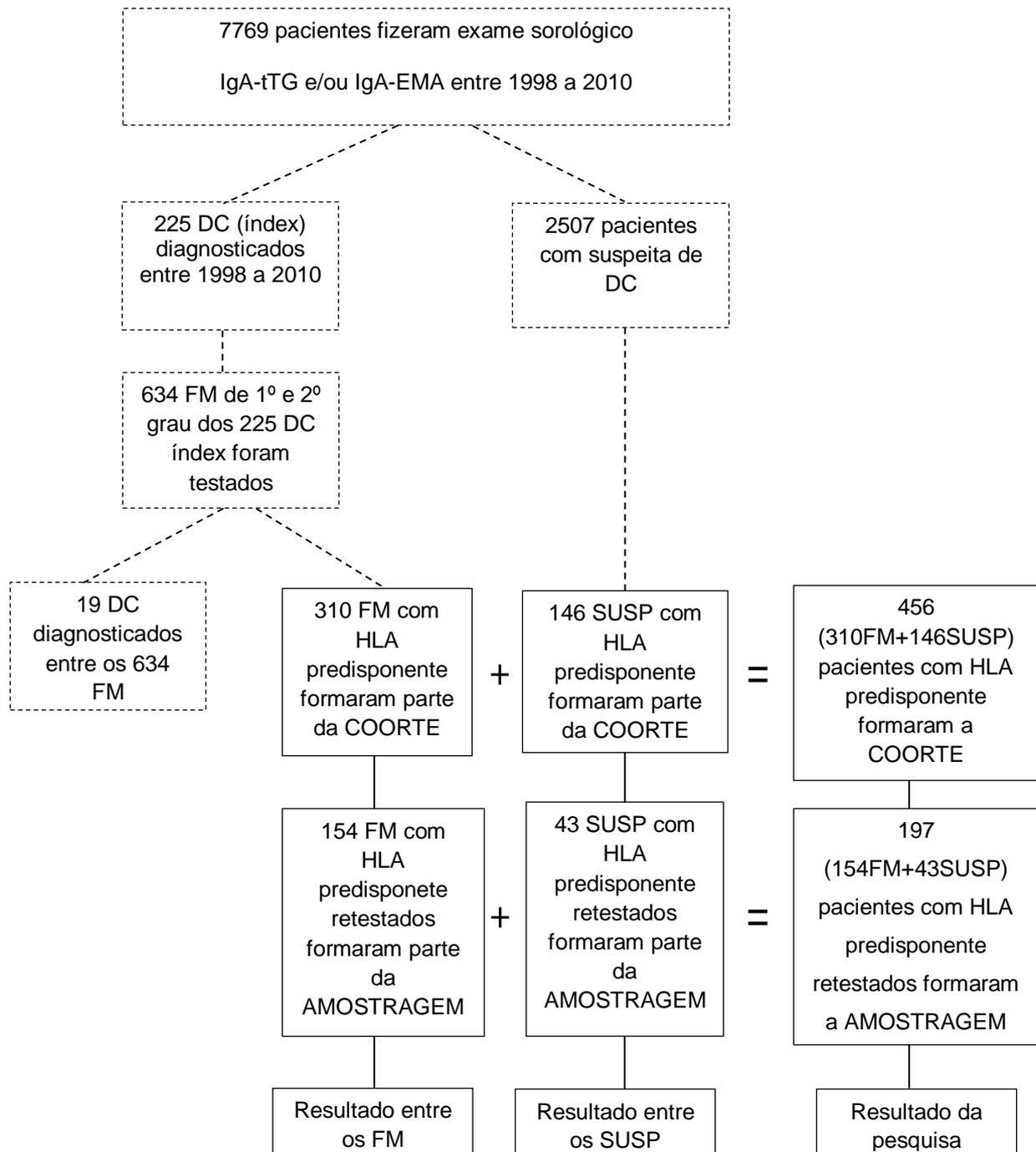
### 4.2 SELEÇÃO DA COORTE, ABORDAGEM E AMOSTRAGEM OBTIDA

Para compor a coorte de 456 pacientes com alelos HLA predisponente para a DC (245 masculino e 310 femininos; idade entre 2 a 85 anos, média de idade:  $28,96 \pm 16,73$ ). A seleção da coorte seguiu os critérios de inclusão e exclusão previamente estipulados pela pesquisa, no banco de dados do Laboratório de Pesquisas em Pediatria e Centro de Estudos da Doença Celíaca (LabDC/FMUnB) situado nas Salas B1-94/13 da Faculdade de Medicina da UnB. Ou seja, selecionaram-se os dados secundários de pesquisas feitas anteriormente por outros pesquisadores do LabDC/FMUnB que envolvem os testes sorológicos e genéticos de pacientes dos grupos de interesse desta pesquisa (Gandolfi *et al.*, 2000; Pratesi *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2008; Modelli *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2010).

A figura nº5 explana acerca da origem da formação da coorte composta por dois grupos com alelos HLA predisponente e com risco elevado de desenvolver a DC: o grupo de parentes de DC, denominados neste estudo como FM, e o grupo de suspeita de DC, que foram chamados de SUSP. Os dois grupos tiveram origem em comum, todos foram atendidos no AmbDC/HUB pela equipe médica especializada em DC entre 1998 a 2010. Estes pacientes já tinham sido triados para a realização de exames complementares de acordo com a necessidade de cada caso clínico. Desta forma, através do levantamento cadastral de 7769 exames de investigação de IgA-tTG e/ou IgA-EMA dos pacientes atendidos no AmbDC/HUB foi possível

identificar os pacientes que apresentaram IgA-EMA positivo, parentes de pacientes com a DC e pacientes com fortes suspeitas clínicas de desenvolver a DC.

Figura 5 – Fluxograma da composição da coorte e da amostragem.



Conforme a Figura nº5, a triagem de 7769 pacientes atendidos no AmbDC/HUB resultou em 225 pacientes com sorologia positiva para a DC, sendo posteriormente confirmados como portadores de DC (caso índice). Por ser alta a prevalência da DC entre os parentes, principalmente entre os de 1º grau, os familiares dos pacientes do caso índice são orientados a realizar o exame sorológico inicial para detecção da DC. E caso optem para serem acompanhados ao longo da vida, realizam também o teste genético de tipagem de alelos HLA predisponente da DC. O resultado dos exames de sorologia feitos entre os 634 parentes de DC do caso índice foi dividido entre os casos positivos para IgA-EMA (19 diagnosticados para DC) e os com sorologia negativa para IgA-tTG e/ou para IgA-EMA (620 não possuíam os anticorpos IgA-EMA). Mas nem todos os 620 parentes com sorologia negativa concordaram em ter os alelos HLA amplificados para detectar a predisposição genética com alelos HLA predisponente para a DC. Mesmo assim, 310 parentes de DC de 1º grau com dois pares de gêmeos [159 pais (60 pais e 99 mães, idade entre 20 a 85 anos; média de idade:  $38,5 \pm 10,6$ ), 70 irmãos (33 irmãos e 37 irmãs, idade entre 3 a 43 anos; média de idade:  $15,8 \pm 11,4$ ) e 24 filhos (13 filhos e 11 filhas, idade entre 2 a 20 anos; média de idade:  $9,6 \pm 5,8$ )] com alelos HLA predisponentes para a DC e compuseram parte FM da coorte (Tabela 3).

Tabela 3 – Parentes (FM) da coorte.

Parentesco	Masculino	Feminino	Idade (anos)	Média de idade (anos)
159 pais	60 pais	99 mães	20 a 85	$38,5 \pm 10,6$
70 irmãos	33 irmãos	37 irmãs	3 a 43	$15,8 \pm 11,4$
24 filhos	15 filhos	9 filhas	2 a 20	$9,6 \pm 5,8$

O outro grupo identificado neste estudo como suspeitos de DC (SUSP) também teve origem dentre os 7769 exames realizados. Todos os pacientes selecionados para comporem parte da coorte baseava-se nas informações conforme anamnese feita pela equipe médica do AmbDC/HUB foram identificados aproximadamente 2507 pacientes com suspeita compatível com a DC. Todavia após a realização de exames de investigação, tais como, sorológico, histológico, genético, a maioria dos pacientes foram diagnosticados e/ou afastados da suspeita e/ou

encaminhados para outras especialidades. Mas alguns pacientes ainda geravam dúvidas quanto ao diagnóstico definitivo por apresentarem discrepância entre os exames requisitados. São pacientes com possível desencadeamento futuro da DC e necessitam de seguimento ao longo do tempo, tais como os portadores de síndrome genética, doenças autoimunes, e até mesmo pacientes com sintomas, tanto típicos como atípicos foram recrutados para este grupo dos SUSP. Desta forma, a outra parte da coorte foi acrescida por 146 SUSP (70 masculino e 77 feminino; idade entre 2 a 59 anos, média de idade:  $13,2 \pm 14,6$ ).

Após levantamento de dados secundários de exames sorológico e genético feitos anteriormente pela equipe técnica do LabDC/FMUnB, e da seleção dos possíveis participantes da pesquisa, formou-se a coorte somando os pacientes do grupo FM e do SUSP. Desta forma possibilitou a implementação da segunda etapa do estudo, que foi a abordagem do paciente ou seus familiares, o recrutamento para o AmbDC/HUB para a repetição de exames sorológicos específicos para a DC e realização dos exames séricos.

Por se tratar de uma amostra não-probabilística do tipo conveniência, o cálculo da amostra em pesquisa sobre soroconversão do exame IgA-EMA numa coorte de pacientes com HLA predisponente para a DC ficou destituída da necessidade de utilizar cálculos estatísticos rígidos.

Para a abordagem, os pacientes foram convidados por telefone ou pessoalmente ao comparecerem no AmbDC/HUB às terças-feiras no período matutino no Setor de Ambulatórios no Corredor Azul Sala G.

A amostragem, representados ainda na Figura nº5, foi composta por dois subgrupos, a de 154 FM parentes de primeiro grau (Tabela 4) com 2 pares de gêmeos, sendo 92 pais (35 pais e 57 mães entre 21 a 75 anos, média de idade  $42,94 \pm 9,86$  anos), 45 irmãos (22 irmãos e 23 irmãs entre 6 a 47 anos, média de idade  $19,7 \pm 10,9$  anos) e 17 filhos (14 filhos e 3 filhas entre 3 a 32 anos, média de idade:  $13,1 \pm 6$  anos). E, no outro subgrupo, 43 SUSP de desenvolver a DC (23 masculino e 20 feminino, idade entre 2 a 42 anos, média de idade:  $11,5 \pm 10,1$ ), dentre os quais 4 apresentam síndrome genética, 7 portadores de doenças autoimunes, 18 com sintomas típicos e 21 com atípicos da DC. No total, a

amostragem da pesquisa foi composta por 197 pacientes (95 masculino e 102 feminino, idade entre 2 a 75 anos, média de idade:  $29,9 \pm 16,8$ ).

Tabela 4 – Parentes (FM) da amostragem.

Parentesco	Masculino	Feminino	Idade (anos)	Média de idade (anos)
92 pais	35 pais	57 mães	21 a 75	$42,94 \pm 9,86$
45 irmãos	22 irmãos	23 irmãs	6 a 47	$19,7 \pm 10,9$
17 filhos	14 filhos	3 filhas	3 a 32	$13,1 \pm 6$

#### 4.2.1 Critérios de Inclusão

- a) Ter alelos HLA predisponente para a DC.
- b) Ter feito exame sorológico IgA-tTG e/ou IgA-EMA com resultado anterior negativo entre 1998 a 2010.
- c) Estar consumindo glúten regularmente na época do 1º exame sorológico e na do 2º exame solicitado.
- d) O intervalo de ao menos 1 ano entre os exames.

#### 4.2.2 Critério de Exclusão

- a) Ter menos de 2 anos de idade.

### 4.3 COLETA, PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DE SANGUE

Efetou-se a coleta de sangue venoso dos pacientes participantes de aproximadamente 3 mililitros (ml) em tubo com gel separador pela técnica de laboratório do Hospital Universitário de Brasília (HUB) conforme os critérios

sugeridos pela norma técnica H3-A6 e H21-A5 do Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI), que trata sobre coleta, transporte e processamento de amostras de sangue. O soro sanguíneo obtido pela centrifugação a 4500 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos (min.) foi enviado, catalogado e estocado a aproximadamente 2 graus centígrados (°C) no LabDC/FMUnB para posterior realização dos testes sorológicos IgA Antitransglutaminase (IgA-tTG) e/ou IgA Antiendomísio (IgA-EMA). Após os devidos exames sorológicos realizados e os resultados obtidos para o interesse da pesquisa, todos os soros coletados foram descartados em lixeira própria e enviada para incineração.

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES HLA PREDISPONENTE

As análises moleculares de tipagem de alelos HLA por Reação em Cadeia de Polimerase ou Polimerase Chain Reaction (PCR) foram efetuadas pela equipe técnica do LabDC/FMUnB, o qual corroborou para estabelecimento da coorte do presente estudo. Foram exames feitos anteriormente a esta pesquisa, através do levantamento de dados secundários de pesquisa envolvendo teste genético (Martins *et al.*, 2010). Obteve-se a coorte de pacientes com alelos HLA predisponente para a DC.

#### 4.5 EXAMES SOROLÓGICOS

Um dos critérios de inclusão para a seleção da coorte de pacientes foi a realização prévia de exame sorológico IgA-tTG e/ou IgA-EMA o resultado negativo. Foi utilizado para este fim os dados secundários de pesquisas já realizadas pelos pesquisadores do LabDC/FMUnB em período anterior a esta pesquisa (Gandolfi *et al.*, 2000; Pratesi *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2008; Modelli *et al.*, 2010).

Mas para a verificação de soroconversão de anticorpos de interesse desta pesquisa foi feito uma coleta de amostra de sangue, ante consentimento, dos pacientes participantes ao comparecerem no AmbDC/HUB. E na sequência foram realizados os exames sorológicos específicos para a DC como a análise de anticorpos IgA-tTG e IgA-EMA no LabDC/FMUnB com o objetivo de verificar a soroconversão do anticorpo IgA-EMA.

#### 4.5.1 Análise de Anticorpos IgA Antitransglutaminase (IgA-tTG)

A presença de anticorpos IgA antitransglutaminase (IgA-tTG) no soro dos participantes foi mensurada por meio do teste imunoenzimático Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) usando *Kit* comercial (QUANTA Lite® h-tTG IgA ELISA, INOVA Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA). A análise foi feita seguindo recomendações do fabricante e em temperatura ambiente (20 a 26°C) como descrito a seguir: Utilizou-se as amostras de soro dos pacientes em diluição 1:100 em Tampão fosfato-salino ou Phosphate Buffered Saline (PBS) com o pH 7,2 e homogeneizados em agitador mecânico. Colocou-se 100 µl (microlitros) de soro diluído no seu respectivo poço, dentre os 96, na placa de poliestireno sensibilizado com transglutaminase tecidual humana (h-tTG) e incubou-se por 30 minutos. Após este procedimento, realizou-se o ciclo de três lavagens automatizada da placa com 300µl de tampão de lavagem (tampão fosfato com 0,05% de Tween 20) na máquina Thermo Plate-Washer. Na sequência, 100µl de anticorpo de detecção do IgA anti-humano, anti-anticorpo conjugado HRP (de cabra) marcados com uma peroxidase, foi adicionado a cada orifício, incubados por 30 minutos e lavados como descrito anteriormente. Para a revelação da reação, adicionou-se 100 µl da solução de substrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB 3,3,5,5') com peróxido de hidrogênio a cada poço e incubados por 30 minutos no escuro. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 0,334 molar (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a leitura realizada no espectrofotômetro Thermo Plate Reader (TP-Reader™) por meio de filtro de 450 nm.

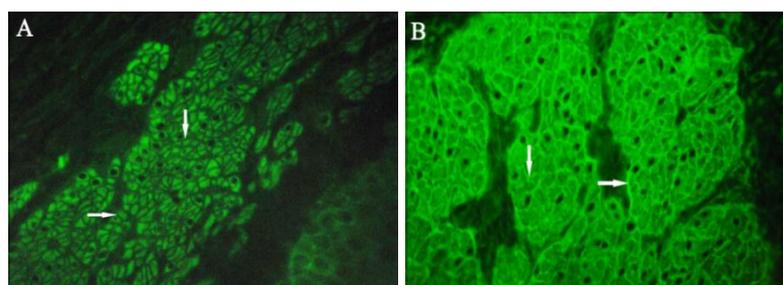
Os resultados foram quantificados por meio da comparação entre a densidade óptica (D.O) de um padrão pré-estabelecido e seu respectivo valor numérico em Unidades arbitrárias (U) com a D.O. das amostras. Aqueles resultados com valor menor que 20U foram considerados negativos; entre 20 e 30U fracamente positivo ou limítrofe; e maiores que 30U considerado moderado ou fortemente positivo conforme sugere o fabricante.

#### 4.5.2 Análise de Anticorpos IgA Antiendomísio (IgA-EMA)

Utilizou-se o teste de imunofluorescência indireta para detectar a presença de anticorpos da classe IgA antiendomísio (IgA-EMA) e verificar a soroconversão para a DC. Exame cuja especificidade e sensibilidade é maior que método imunoenzimático

de investigação de anticorpos IgA antitransglutaminase (IgA-tTG). Realizou-se o teste seguindo as recomendações do fabricante usando o kit comercial QUANTA Lite® Endomysial (primate distal Esophageous) Slide, INOVA Diagnostics, Inc. San Diego, CA, USA, cujas lâminas utilizavam substratos com secções criostáticas com 4µm de espessura da porção distal do terço inferior do esôfago de primata (*Cebus Apella*) sensibilizadas com antígeno endomísio específico para a DC. Utilizou-se amostras de 40 µl de soro diluído a 1:5 em solução PBS (pH 7,2) e incubado em lâmina por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente (15 a 30°C). Lavou-se posteriormente por 3 vezes com tampão PBS por meio de esguichos utilizando pipeta Pasteur e incubadas no mesmo tampão por 5 minutos imergindo-as numa cuvette, seguido de uma repetição de lavagem em nova solução tampão. A seguir pipetou-se 30 µl do anticorpo de detecção anticorpo anti-IgA humano marcado com fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) usando kit comercial (Biosystems, Barcelona, Spain) adicionado a cada poço previamente incubado com soro humano e novamente incubava-se em câmara úmida por 30 minutos, seguido de lavagem com tampão PBS como descrito anteriormente. Após a secagem e montagem com lamínula analisou-se em microscopia de fluorescência no microscópio Zeiss Axiophot 2 com filtro de excitação 450 à 490 nm e emissão 520 nm (Aumento: 400x). A análise foi feita por dois observadores de forma independente e considerou-se o resultado como negativo (Figura 6-A) a ausência de fluorescência nos espaços do tecido conjuntivo. Mas considerou-se a reação positiva (Figura 6-B) caso a fluorescência de cor verde brilhante em forma de rendilhado ou favo de mel fosse observada entre as miofibrilas da musculatura lisa, endomísio, em diluições  $\geq 1:5$ .

Figura 6 – IgA-EMA negativo (A) e positivo (B)



Fonte: Imagem cedida por LabDC/FMUnB.

A) IgA-EMA negativo-ausência de fluorescência (seta). B) IgA-EMA positivo-fluorescência de cor verde brilhante (seta).

#### 4.6 BIÓPSIA ENDOSCÓPICA DUODENAL

Para todos os indivíduos que apresentaram a soroconversão para IgA-EMA, a biópsia jejunal confirmatória foi solicitada pela equipe médica responsável. A obtenção dos fragmentos da mucosa duodenal foi realizada pela equipe médica do setor de Endoscopia do HUB com amostras de material retiradas das porções distais do duodeno (segunda e terceira porção). Em crianças menores de 3 anos usou-se cápsula pediátrica *per oral* de Watson e nos demais por endoscopia digestiva alta através do aparelho Olympus GIF-100 (Olympus-UK), seguindo a técnica de Tocalino, 1974.

As amostras dos fragmentos obtidos (de 4 a 6) são cuidadosamente orientadas e fixadas em formol a 10% e encaminhados para o Centro de Anatomia Patológica do HUB (CAP/HUB) para posterior preparo das lâminas e análise histopatológica. As amostras de biópsia jejunal fixadas em formol a 10 % foram processadas de forma padrão no CAP/HUB: incluídas em recipiente de parafina, seccionadas com micrótomo manual perpendicularmente à superfície em aproximadamente 5 micrômetros de espessura, fixadas e coradas com hematoxilina-eosina de forma a compor as lâminas histológicas para posterior análise seguindo a classificação de Marsh (Marsh, 1992).

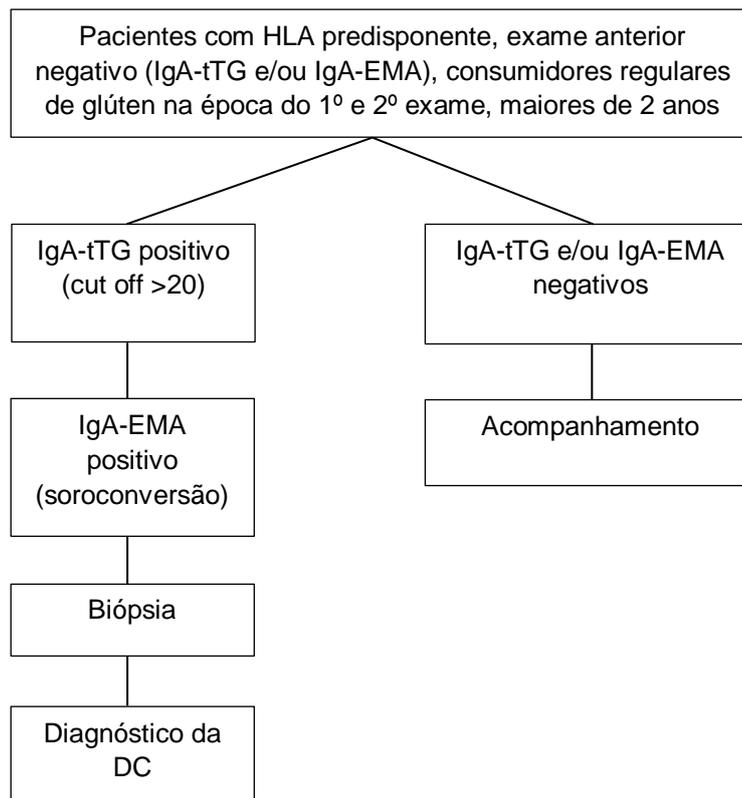
A análise histopatológica foi feita pela equipe de patologistas do CAP/HUB com o auxílio do microscópio Zeiss Axiophot 2 plus com aparelho JVC TK-C1380 acoplado para documentação fotográfica.

#### 4.7 CONDUTA LABORATORIAL E CLÍNICA

As amostras de soro dos pacientes participantes com resultado positivo para o teste imunoenzimático IgA-tTG ( $\geq 20$  U) foram submetidas ao teste de imunofluorescência indireta IgA-EMA. O paciente com soroconversão para a análise de anticorpos IgA-EMA teve o diagnóstico de DC confirmado pela equipe médica do LabDC/FMUnB por meio de solicitações adicionais de biópsia endoscópica duodenal com análise histológica por patologista da CAP/HUB, seguindo Classificação de Marsh (Protocolo da Diagnóstico da Doença Celíaca) e a posterior constatação do restabelecimento da saúde com a dieta estritamente sem glúten. O paciente cuja

soroconversão não fora comprovada continuou a ser acompanhado pela mesma equipe devido ao risco da soroconversão ocorrer em qualquer fase da vida por ser portador de alelos HLA predisponente para a DC. A Figura 7 apresenta o fluxograma dos processos envolvidos na conduta laboratorial e clínica da pesquisa.

Figura 7 – Fluxograma da conduta laboratorial e clínica da pesquisa.



#### 4.8 CÁLCULO DA TAXA DE INCIDÊNCIA (TI)

O termo Taxa de Incidência (TI) pessoa-período foi utilizado nesta pesquisa (Szklo *et al.*, 2007) e é também conhecida como Densidade de incidência ou Taxa média de incidência (Pereira, 2001). A TI pessoa-período corresponde à proporção de casos de soroconversão dos anticorpos IgA-EMA encontrados num estudo longitudinal em até 14 anos de acompanhamento dos pacientes com alelos HLA predisponente para a DC pertencentes a algum grupo de risco de desenvolvê-la.

A expressão matemática para o cálculo da taxa de incidência (TI) pessoas-período, nesta pesquisa como pessoas-ano, é a seguinte:

$$TI = \frac{\text{n}^\circ \text{ de casos de soroconvers\~ao do anticorpo IgAEMA}}{\text{n}^\circ \text{ proporcional de pessoas-ano em at\~e 14 anos de acompanhamento}} \times \text{constante}$$

Fonte: Adapta\~ao de Pereira, 2001; Szklo *et al.*, 2007.

Para o c\~alculo de TI pessoa-per\~iodo foi utilizado no numerador a quantidade de casos novos de soroconvers\~ao de IgA-EMA ocorridos entre setembro de 1998 at\~e abril de 2012. No entanto, no denominador, utilizou-se a quantidade de pessoas-per\~iodo como forma de equival\~encia epidemiol\~ogica ao inv\~es de n\~umero total absoluto de pessoas participantes na pesquisa, por ser proporcional tanto n\~umero de indiv\~duos quanto o tempo de dura\~ao de observa\~ao de cada um.

A propor\~ao utilizada nesta pesquisa de TI pessoas-per\~iodo foi a de pessoas-ano, que corresponde \~a soma total do intervalo de tempo entre o primeiro exame sorol\~ogico com resultado negativo realizado para a DC e o \~ultimo exame solicitado pela equipe m\~edica do AmbDC/HUB em at\~e 14 anos de acompanhamento dos indiv\~duos participantes na pesquisa. A constante pode ser qualquer m\~ultiplo de 10, neste estudo multiplicou-se por 100, o que corresponde \~a propor\~ao de 100 pessoas-ano.

#### 4.10 C\~ALCULO ESTAT\~ISTICO DOS RESULTADOS

Para verifica\~ao da propor\~ao de soroconvers\~ao do anticorpo IgA-EMA entre os dois grupos (FM e SUSP) foi utilizado o teste estat\~istico com base no processo de Poisson, que \~e adequado para situa\~oes de eventos raros (baixas contagens). A express\~ao matem\~atica para o c\~alculo da estat\~istica do teste \~e a seguinte:

$$Z = \frac{\lambda_{FM} - \lambda_{SUSP}}{\sqrt{\lambda \times [1/n_{FM} + 1/n_{SUSP}]}}$$

Fonte: van Belle *et al.*, 2004.

em que  $\lambda_{FM}$  e  $\lambda_{SUSP}$  representam as taxas de incidência dos grupos FM e SUSP, respectivamente,  $n_{FM}$  e  $n_{SUSP}$  são os tamanhos correspondentes desses grupos, e  $\lambda$  é a TI global considerando-se, hipoteticamente, que os grupos são iguais.

#### 4.11 ABORDAGEM ÉTICA

O presente estudo segue os princípios da última Declaração de Helsinki instituído em 2008, além do mais, foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CEP/FS UnB) sob o registro número 018/11 (Anexo 1). Os participantes da pesquisa receberam a informação oral e escrita através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) descrita no Apêndice 1, após autorização, respondiam a um formulário de interesse da pesquisa (Apêndice 2). Todos os participantes receberam o resultado dos respectivos exames sorológicos solicitados para a pesquisa pela equipe médica responsável pelo AmbDC/HUB e foi reiterado o compromisso de acompanhamento clínico permanente por pertencerem a um grupo de risco de desenvolver a DC.

## 5.RESULTADOS

Numa coorte de 456 pacientes com alelos HLA predisponentes pertencentes a algum grupo de risco elevado de desenvolver a DC em até 14 anos de atendimento, 11 apresentaram soroconversão de anticorpos IgA-EMA num total de 197 (5/154FM e 6/43SUSP) pessoas participantes da pesquisa (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultado da pesquisa

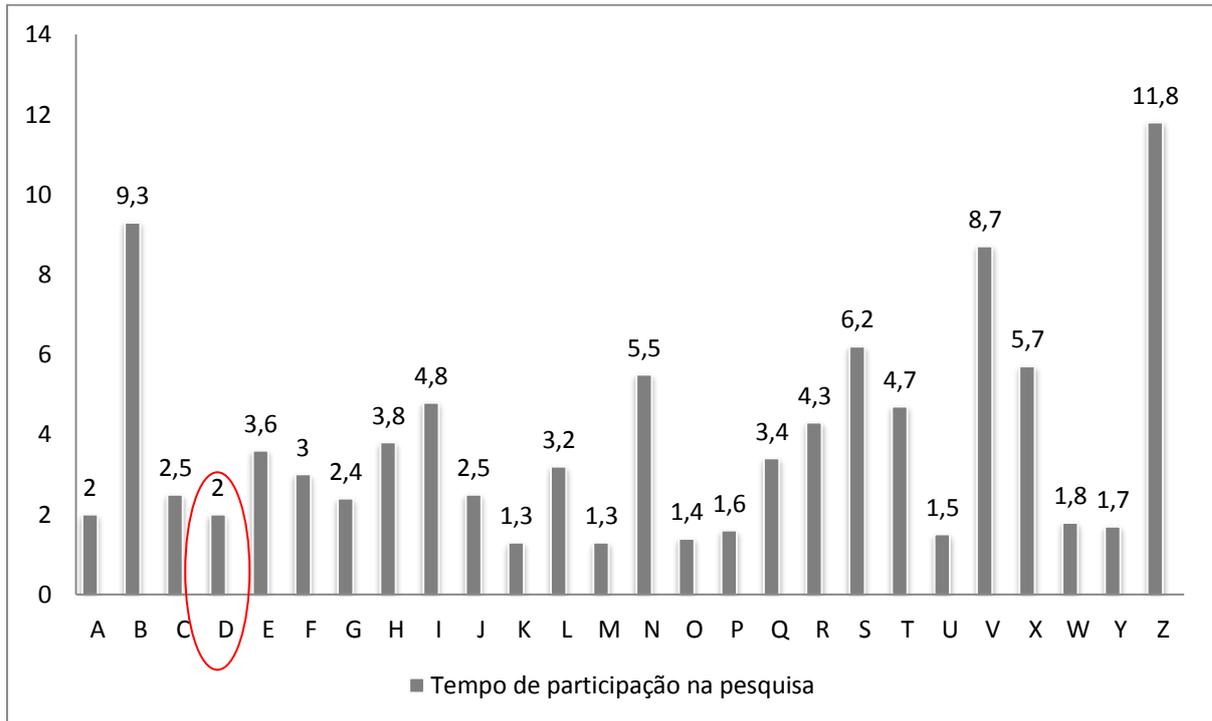
	FM	SUSP	Total
Sim	5	6	11
Não	149	37	186
	154	43	197

Com 95% de confiança, a TI pessoas-período foi de  $1,1 \pm 0,2$  caso de soroconversão por 100 pessoas-ano (Figura 8) acompanhadas num período observação de 1 a 14 anos, média de  $4 \pm 3,7$  anos.

Dentre os 154 FM, 5 apresentaram soroconversão dos anticorpos IgA-EMA, o resultado foi, com 95% de confiança,  $0,7 \pm 0,1$  caso a cada 100 pessoas-ano. E em relação aos 43 SUSP, 6 apresentaram soroconversão, o que representa, em média,  $4,5 \pm 0,6$  casos a cada 100 pessoas ano.

O cálculo estatístico comparando os resultados dos dois grupos (FM e SUSP) com  $p$ -valor =0,427% indica que há evidências estatísticas contra a hipótese de que os grupos apresentam as mesmas taxas de soroconversão dos anticorpos IgA-EMA. Assim, provavelmente, esses grupos apresentam incidências diferentes de soroconversão. No entanto, como as amostras são pequenas, recomendam-se estudos posteriores com amostras maiores para confirmar esse resultado.

Figura 8 – Exemplo hipotético da proporção de 1,1 caso por 100 pessoas-ano.



A Figura 8 demonstra um exemplo hipotético do cálculo de pessoas-ano em que as letras do alfabeto correspondem aos pacientes observados de forma individual, e os números dispostos sobre as colunas correspondem ao período de tempo de acompanhamento. Período que corresponde entre os exames sorológicos realizados anteriormente (resultado negativo) e entre o exame solicitado para esta pesquisa. Sendo assim, somaram-se os períodos de acompanhamento de cada paciente até resultar em 100 pessoas-ano. Nesta pesquisa foi encontrado a TI pessoa-período de 1,1 caso soroconversão do IgA-EMA por 100 pessoas-ano observados em até 14 anos de acompanhamento. Como por exemplo, o paciente D, no círculo vermelho, indica que este apresentou soroconversão dos anticorpos IgA-EMA num período de 2 anos de observação.

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo seguiu a estratégia de acompanhamento de pacientes baseado no resultado de teste de tipagem de HLA predisponente (HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8) com a repetição periódica de exames séricos, inicialmente proposto por Bonamico e posteriormente adotado pelo grupo de especialistas que compõe a ESPGHAN como diretriz de conduta clínica de acompanhamento de pacientes com algum risco de desenvolver a DC (Bonamico *et al.*, 2006; Husby *et al.*, 2012).

A pesquisa está respaldada também em outros estudos de soroconversão que sugerem a repetição dos exames sorológicos em pessoas pertencentes a algum grupo de risco de desenvolver a DC acompanhando-os periodicamente, pois a presença dos alelos HLA predisponente concomitante com a presença do glúten na dieta regular podem desencadear a inflamação na parede do intestino delgado (Atrofia Vilositária). E, até mesmo da forma assintomática em qualquer fase da vida do indivíduo. (Niveloni *et al.*, 2000; Pittschieler *et al.*, 2003; Goldberg *et al.*, 2007).

A DC é um exemplo de desordem multifatorial, na qual a suscetibilidade genética é um fator relevante para o desencadeamento da mesma, de forma que a grande maioria dos pacientes portadores desta enfermidade (90%) carregam genes capazes de expressar os alelos HLA-DQ2 (DQA\*0501/DQB\*0201), enquanto que os outros 5% expressam o HLA-DQ8 (DQA\*0301/DQB1\*03). Os 5% remanescentes têm ao menos um dos dois genes do HLA-DQ2. (Sollid; Greco *et al.*, 2002; Bonamico *et al.*, 2006; Godfrey *et al.*, 2010, Husby *et al.*, 2012; Fasano *et al.*, 2012). De tal maneira, o teste genético de tipagem molecular dos alelos HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8 predisponente tem grande valor na prática clínica, pois na sua ausência considera-se como valor preditivo negativo (VPN) (Karell *et al.*, 2003).

A presença dos alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 na população ocidental é de aproximadamente 30%, no entanto aproximadamente 1% a 3% dentre os indivíduos com predisposição genética tem a DC, portanto o exame positivo é apenas um indicativo da presença da susceptibilidade genética e não a doença instalada (Sollid, 1989; 2002). O efeito dos alelos HLA predisponente entre familiares de DC aumenta o risco de desenvolver a doença, sobretudo entre parentes de primeiro grau (4,5% a

20%) e, especialmente, entre os gêmeos univitelínicos (75%) (Greco *et al.*, 2002; Book *et al.*, 2003; Nistico *et al.*, 2006). Os alelos HLA são responsáveis por apresentarem a fração tóxica do glúten para os linfócitos T e iniciam a resposta imune adaptativa da DC (Abadie *et al.*, 2010).

Existem outros grupos de risco para desenvolver a DC em que frequentemente são solicitados exames de tipagem genômica dos alelos HLA, tais como, os portadores de síndromes genéticas, de doenças autoimunes e casos em que há dúvida de diagnóstico com valores e resultados discrepantes de exames sorológicos e/ou histológicos (Hill *et al.*; Liu *et al.*, 2005).

Além do mais, a presença específica dos genes predisponente para a DC é responsável por aproximadamente 40% da suscetibilidade da doença (Fasano *et al.*, 2012). Megiorni e colegas apresentaram um estudo de gradiente de risco da DC (Figura 9).

Figura 9 – Gradiente de Risco da DC.

R I S C O		Paciente %	Controles%	Risco	Razão de Sexo (F/M)	
					F	M
d a  D O E N Ç A	DQ2 and DQ8	2.5	0.2	1:7	1:7	1:8
	DQ2, B1*02*02	23.1	2.4	1:10	1:8	1:13
	DQ8, B1*02 pos.	3.0	0.7	1:24	1:16	1:52
	$\beta$ 2, B1*02*02	1.4	0.4	1:26	1:27	1:26
	DQ2, B1*02/X	55.1	19.2	1:35	1:26	1:54
	DQ8, B1*02 neg.	7.3	6.5	1:89	1:62	1:157
	$\beta$ 2, B1*02/X	4.6	9.7	1:210	1:211	1:208
	$\alpha$ 5	2.1	37.9	1:1842	1:8327	1:1027
	Outros	0.9	23.0	1:2518	1:2530	1:2497

Fonte: Adaptação de Megiorni *et al.*, 2009.

Gradiente de risco: Riscos foram avaliados a partir da frequência não arredondados de DQ caso-controle, considerando uma prevalência da doença de 1:100 (seta) e razão de sexo feminino:masculino 1:89 HLA-DQ2 (DQA1\*0501/DQB1\*0201= DQA1\*05/DQB1\*02); HLA-DQ8 (DQA1\*0301/DQB1\*0302= DQA1\*03/DQB1\*0302);  $\beta$ 2=DQB1\*02 na ausência do DQA1\*05;  $\alpha$ 5=DQA1\*05 na ausência do DQB1\*02. X, diferente de DQB1\*02 ou DQB1\*0302.

Logo, para a formação da coorte, selecionou-se pacientes do grupo de familiares (FM) e pacientes suspeitos (SUSP), todos com sorologia anterior negativa e previamente triados pela equipe médica do AmbDC/HUB para a realização do exame de genotipagem dos alelos HLA, o qual foi executada pela equipe do LabDC/FMUnB. Utilizou-se dados secundários armazenados no LabDC/FMUnB pois esta mesma equipe do LabDC/FMUnB já havia publicado estudos envolvendo parentes de 1º grau de DC sobre prevalência de DC entre FM de 1º grau (Almeida *et al.*, 2008) e SUSP (Gandolfi *et al.*, 2000; Pratesi *et al.*, 2003; Modelli *et al.*, 2010) e a predisposição genética (Martins *et al.*, 2010).

Para participarem da pesquisa, apenas pacientes com risco de desenvolver a DC e com real necessidade de repetição dos exames séricos foram incluídos. A coorte do grupo de FM incluiu apenas familiares de 1º grau, por vários motivos: pouca quantidade de parentes de 2º grau, não apresentavam queixas clínicas e, principalmente, devido pouca probabilidade de soroconversão de 1:133 entre os de 2º grau e em contrapartida 1:22 entre familiares de 1º grau (Fasano *et al.*, 2003). Apesar de estudo americano ter evidenciado a soroconversão também entre sobrinhos assintomáticos (Goldberg *et al.*, 2007).

Entretanto nem todos os parentes acompanhados tiveram os seus alelos amplificados, pois a opção de querer saber ou não acerca de sua predisposição genética foi respeitada pela equipe médica do AmbDC/HUB. Assim como Chang, a investigação foi embasada em questões individuais, oferecendo opções sobre a conduta de acompanhamento, não apenas com relação ao custo do exame, mas também pela ansiedade gerada pela investigação em relação ao risco de desenvolver a DC (Chang *et al.*, 2009).

No que se refere ao grupo de SUSP foi incluído apenas pacientes com necessidade de acompanhamento clínico e laboratorial periódico, previamente triada pela equipe médica do AmbDC/HUB, pois pesquisas recomendam o acompanhamento sorológico de grupos com alta prevalência da DC como portadores de DM1, tireoidite autoimune, e síndromes genéticas, além dos parentes de DC (Bonamico *et al.*, 2006; Golberg *et al.*, 2007).

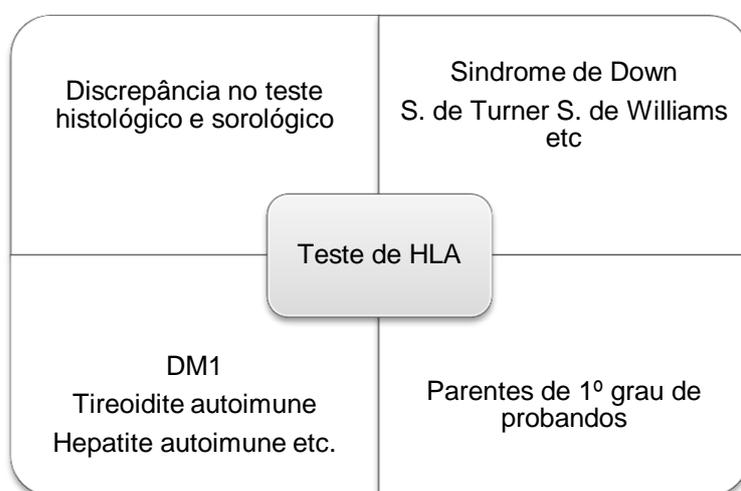
Atualmente a prevalência estimada para adultos e crianças da população mundial é aproximadamente 1% (West *et al.*, 2003 e Katz *et al.*, 2011), sendo que as

mulheres são diagnosticadas duas a três vezes mais que os homens (Bai *et al.*, 2005). A DC é predominante entre os caucasianos, um estudo multicêntrico entre vários países europeus constataram uma prevalência geral de aproximadamente 1% (Dubé *et al.*, 2005). Contudo, se contabilizar os indivíduos com sorologia positiva, mas sem alteração na mucosa intestinal, a prevalência amplia para 1,8% (Walker *et al.*, 2010).

A frequência de distribuição de alelos HLA-DQ2 entre os 310 FM (78%) e no grupo de SUSP (59%) dos pacientes da coorte nesta pesquisa apresentaram HLA-DQ2 ou com um dos alelos do HLA-DQ2 associados aos do HLA-DQ8. Resultado parecido com outro estudo brasileiro realizado na região Nordeste, que também relata predominância dos alelos HLA-DQ2 entre familiares (Castro-Antunes *et al.*, 2011). Neste estudo, aproximadamente 12% dos pacientes foram dispensados do acompanhamento sorológico por terem HLA negativo, mas o estudo feito por Karinen sobre avaliação de risco de DC entre parentes de 1º grau com relação aos alelos HLA relata 20% (Karinen *et al.*, 2006).

O estudo desenvolvido por Megiorni sugere a tipagem de HLA, que por si só não conclui um diagnóstico, mas auxilia na triagem de grupos de risco (Figura 10), principalmente familiares de DC. Um teste positivo indica a suscetibilidade genética, mas não significa necessariamente a evolução da doença (Megiorni & Pizutti, 2012).

Figura 10 – Categoria de risco para realizar exame de HLA.



A amostragem foi composta por FM e SUSP consumidores regulares de glúten, pois na ausência deste pode discorrer em resultados falso-negativos. Foi instituído como critério de inclusão tanto para a composição da coorte, assim como para avaliar a real possibilidade da realização do 2º exame sorológico após convidá-los para participarem da pesquisa.

Nem todos os pesquisadores conseguem convencer seus pacientes a repetirem exames sorológicos, Biagi teve 43,9% de recusa de participação na pesquisa, e o estudo brasileiro também relata a opção em não querer saber acerca da possibilidade de ter desenvolvido a DC (Biagi *et al.*, 2007 Nass *et al.*, 2011). Analogamente, nesta pesquisa também houve abstenções, do total de 456 possíveis participantes, 178 (39%) recusaram-se a repetir os exames.

E para a efetiva participação da pesquisa necessitou-se por parte dos sujeitos pesquisados, além do interesse pessoal em diagnosticar a DC, da voluntariedade, de fornecer os seus contatos telefônicos atualizados e da disponibilidade de deslocamento com custeio próprio até o AmbDC/HUB.

Seguindo a recomendação do ESPGHAN 2012, iniciou-se a triagem inicial da amostragem pelo exame sorológico de investigação de anticorpos IgA-tTG por ter alta sensibilidade (93%) e especificidade (maior que 98%), ser de fácil manuseio e baixo custo. É comumente usada como teste de eleição para triagem inicial no caso de suspeita clínica e triagem populacional (Rashtak *et al.*, 2008; Husby *et al.*, 2012). Optou-se pelo teste sorológico ELISA para investigação da presença de anticorpos IgA-tTG que usa a Transglutaminase tecidual humana (htTG) como substrato por ser mais recomendado para o diagnóstico da DC (Carroccio *et al.*, 2001).

Segundo diretriz da ESPGHAN de 2012, para o exame de investigação de anticorpos IgA-tTG só é possível usar os valores de referência para o diagnóstico de DC caso este apresente quantidade de anticorpos IgA-tTG 10 vezes maior que o valor de corte em unidades arbitrárias estipulado pelo *kit* comercial. E ainda recomenda uma nova investigação dos marcadores séricos com nova amostra de sangue, inclusive com o auxílio do IgA-EMA por imunofluorescência indireta e exames complementares como teste histopatológico e genético (Husby *et al.*, 2012).

O teste IgA-EMA é um método de investigação de anticorpos antiendomísio entre as miofibrilas em cortes laminares de esôfago de macaco. E, por similaridade, também é encontrado entre as miofibrilas do intestino delgado humano. Por isso, considerado como indicador de progressão inflamatória da mucosa jejunal (Chorzelski *et al.*, 1983; Husby *et al.*; Alessio *et al.*, 2012).

A investigação dos anticorpos IgA-EMA por ter alto grau de sensibilidade de 93% e especificidade maior que 99% nas várias fases da doença, e ser considerado como teste com valor preditivo positivo (VPP) está sendo utilizado como teste de rastreamento da enfermidade. Por esta razão, o teste IgA-EMA foi utilizado como marcador sorológico de eleição nesta pesquisa por ser capaz de indicar a soroconversão dos anticorpos IgA-EMA dos pacientes com alelos HLA predisponente e pertencentes a algum grupo de risco.

Embora o exame apresente alta sensibilidade e especificidade, é um teste qualitativo em que exige no mínimo dois observadores para analisarem as lâminas de forma independente, por isso, esta pesquisa contou com a confirmação da equipe médica do LabDC/FMUnB com mais de 14 anos de experiência.

Os pacientes que apresentaram soroconversão dos anticorpos IgA-EMA positivo foram encaminhados para avaliação pela equipe médica do AmbDC/HUB para realização de exames complementares e a possível confirmação da DC. Neste estudo o grau de intensidade da fluorescência apresentada no exame IgA-EMA foi caracterizado pela quantidade de cruces numa graduação até 4, por exemplo, quatro cruces de 4 (++++/4) é considerado resplandecente. E a exclusão de pacientes com menos de 2 anos de idade tanto para compor a coorte como para a amostragem ocorreu por conta da baixa sensibilidade dos exames IgA-EMA e IgA-tTG nesta faixa etária (Maglio *et al.*, 2010).

No presente estudo foram identificados 11 pacientes (Tabela 6) portadores de alelos HLA predisponente com soroconversão para os anticorpos IgA-EMA dentre os 197 pacientes participantes da pesquisa frequentadores do AmbDC/HUB observados até 14 anos de acompanhamento. Foi constatada 5 casos de soroconversão entre os FM (nº4, 8, 9, 10, 11), e 6 pacientes do grupo dos SUSP (nº1, 2, 3, 5, 6 e 7), classificados conforme a idade em que ocorreu a confirmação da enfermidade.

Tabela 6 – Características dos pacientes com soroconversão.

Nº	Sx	HLA	Motivo do exame sorológico		IgA-EMA (fluorescência)	Período entre os exames	Biópsia (Marsh)
			Negativo	Positivo (soroconversão)			
1	M	DQB1*0201 DQB1*0302	Não ganhava P aos 3a.	Não ganhava P aos 6a.	++/4	3a	0
2	M	DQA1*0501 DQB1*0201	ATR, diarreia, pouco ganho de P e A aos 3a.	ATR, enxaqueca e flatulência aos 6a.	++/4	3a	1
3	M	DQA1*0501 DQB1*0201	DM1 de difícil controle aos 5a.	DM1 de difícil controle aos 7a.	++++/4	2a	N
4	F	DQA1*0501 DQB1*0201	†Irmã de DC, aos 6a.	Glicemia alta (DM1) aos 7a.	++/4	1a	0
5	M	DQA1*0501 DQB1*0201	Síndrome de Down, aos 9a.	Diarreia aos 10a.	++++/4	1a	N
6	M	DQA1*0501 DQB1*0201	Pouco ganho de P e A aos 6a.	Pouco ganho de P e A aos 12a.	++++/4	6 a	3
7	F	DQA1*0501 DQB1*0201	Enxaqueca aos 10a.	Diarreia aos 20a.	++/4	10 a	1
8	F	DQA1*0501 DQB1*0201	†Irmã de DC, aos 31a.	Diarreia, flatulência, distensão abdominal, dor abdominal e anemia aos 37a.	++++/4	6 a	3
9	F	DQA1*0501 DQB1*0201	†Irmã de DC, aos 37a.	Constipação, flatulência, distensão abdominal e aftas recorrentes aos 39a.	+++/4	2 a	2
10	F	DQB1*0201 DQA1*0301 DQB1*0302	†Irmã e filha de DC aos 37a.	Assintomático aos 44a.	++++/4	7 a	3
11	M	DQA1*0501 DQB1*0201	†Pai de DC aos 67a.	Assintomático aos 75a.	++++/4	8 a	2

Nº=número Sx=sexo M= masculino F=feminino a=anos P=peso A=altura N=Não fez biópsia  
 ATR=acidose tubular renal DM1=diabetes mellitus tipo I †= indicação de parentesco  
 +=intensidade de fluorescência do exame IgA-EMA numa graduação de 1 a 4 cruces  
 DQA1\*0501 e/ou DQB1\*0201=HLA-DQ2 DQA1\*0301 e/ou DQB1\*0302=HLA-DQ8

A TI pessoa-período de soroconversão do IgA-EMA encontrada entre pacientes com HLA predisponente é de aproximadamente 1,1 caso de soroconversão por 100 pessoas-ano, num período de acompanhamento de 1 a 14

anos, média de  $4 \pm 3,7$  anos. O estudo feito por Biagi sobre índice de incidência de soroconversão entre 64 parentes de 1º grau de DC, acompanhados durante 6 anos, registrou a TI de 1/10mil pacientes-ano (Biagi *et al.*, 2008).

Mas o resultado do presente estudo apresenta TI pessoa-período de soroconversão de aproximadamente 1,1 caso por 100 pacientes-ano em até 14 anos de acompanhamento. Resultado discrepante se comparada com estudo feito por Biagi, que registra 1 caso por 10mil pessoas-ano em até 6 anos de acompanhamento. Talvez seja consequência por este estudo ter tido um período maior de acompanhamento (14 anos) e ter ampliado o grupo envolvido no estudo (parentes de 1º grau e grupo com suspeita clínica).

Entretanto, a soroconversão dos anticorpos IgA-EMA deve ser uma condição rara entre pacientes sem sintomas ou que não pertençam a algum grupo de risco, pois numa pesquisa feita na Estônia entre a população saudável, que são crianças em fase escolar, foram testadas e repetiram os exames sorológicos para a DC na época em que se tornaram adolescentes. Esta pesquisa não revelou caso de soroconversão de anticorpos IgA-EMA feitos após 10 anos (Lillemäe *et al.*, 2011).

Além do mais, neste estudo, 18 indivíduos apresentaram os níveis de anticorpos IgA-tTG considerado positivo, mas ao testar para IgA-EMA, 7 tiveram sorologia negativa e 11 positivos (soroconversão). Todos os pares de irmãos gêmeos, em que apenas um dos pares era portadores de DC, participaram da pesquisa. Porém no exame sorológico de repetição foi constatada a elevação dos anticorpos IgA-tTG em apenas uma paciente do par gemelar, mesmo sem sintoma relevante. A disparidade entre os pares também foi relatado num estudo feito entre 47 pares de gêmeos, nos quais apenas 13 pares tinham DC em ambos (Greco *et al.*, 2002). A paciente, que é irmã gemelar, apresentou alteração do nível de anticorpos IgA-tTG, mas o IgA-EMA permanecia negativo. Ela tem grande probabilidade de apresentar soroconversão em breve, por ser alta a prevalência entre irmãos univitelínicos (75%) e por ser portadora de todos os alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501/DQB1\*0201) e HLA-DQ8 (DQA1\*0301/DQB1\*0302) completos com gradiente de risco elevado, iguais aos de sua irmã gêmea portadora de DC e DM1, diagnosticada há 4 anos. Tanto para esta paciente como para os outros

participantes ou não da pesquisa, manteve-se o compromisso de serem avaliados periodicamente pela equipe médica do AmbDC/HUB.

Para evitar biópsias desnecessárias em indivíduos com baixos níveis de anticorpo tTG (menos de 3 vezes o valor de referência em unidades determinados no *kit* comercial) recomenda-se a realização do teste mais específico para IgA-EMA. Caso o teste IgA-EMA se apresente positivo, encaminha-se o paciente para realização de biópsia duodenal. Caso seja negativo, recomenda-se a repetição do exame sorológicos IgA-tTG num intervalo de 3 a 6 meses mantendo uma dieta contendo glúten (Husby *et al.*, 2012).

Entre os 11 pacientes que apresentaram soroconversão dos anticorpos IgA-EMA (Tabela 6) ganha enfoque algumas características distintas encontradas. No grupo dos SUSP (paciente nº1, 2, 3, 5, 6, 7) (Tabela 7), houve maior predomínio de crianças, principalmente de meninos entre 4 a 12 anos com sintomas atípicos (nº1, 2, 3, 5, 6), e portadores de alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501/DQB1\*0201).

A queixa clínica principal dos pacientes nº1 e 6 era a dificuldade de ganhar peso e altura. A equipe médica já tinha afastado todas as outras possibilidades causadoras deste atraso no crescimento, pois este sintoma atípico é indício de suspeita de DC (Troncone *et al.*, 2010). O sintoma de ambos era comum, mas o resultado entre os dois foi bem distinto, principalmente em relação à idade em que foi constatada a soroconversão, o intervalo de tempo entre os exames de sangue, a intensidade de fluorescência do exame IgA-EMA e o resultado da biópsia endoscópica duodenal.

O paciente nº1 apresentou a soroconversão do IgA-EMA (++/4) aos 5 anos de idade num intervalo de 1 ano entre os exames, bem no início da doença, e a biópsia encontrada foi Marsh tipo 0. Porém, o paciente nº 6 foi diagnosticado aos 12 anos, e com intervalo de 6 anos após o último resultado sorológico negativo, mas ao sofrer soroconversão a intensidade de fluorescência do IgA-EMA (++++/4) era intensa e a lesão da mucosa jejunal Marsh tipo 3. Provavelmente o paciente nº1 desenvolveria uma inflamação típica da mucosa jejunal caso fosse diagnosticado alguns anos depois, pois o marcador sorológico IgA-EMA é indicador de progressão da atrofia vilositária (Chorzelski *et al.*, 1983; Alessio *et al.*, 2012) . Na pesquisa desenvolvida por Poulain o paciente desenvolveu a lesão na mucosa intestinal típica da DC

somente 6 anos após a soroconversão (Poulain *et al.*, 2007). No estudo desenvolvido por outros autores também citam a normalidade da mucosa intestinal mesmo com o exame sorológico IgA-EMA positivo. Pittschieler cita 2 pacientes dentre 9 e Crone, 7 pacientes dentre 16 pacientes que apresentaram soroconversão (Crone *et al.*; Pittschieler *et al.*, 2003).

Na diretriz estipulada pelo ESPGAN de 1990, a biópsia intestinal era considerada padrão-ouro para do diagnóstico, por isso, pacientes com pouca ou nenhuma alteração inflamatória na parede jejunal normalmente eram desconsiderados, mas esta prática não condiz com a aplicada atualmente, que a considera complementar juntamente com outros exames (sorológico, genético, clínico e nutricional) para a conclusão do processo de diagnóstico (Husby *et al.*, 2012). Ademais a presença de atrofia vilositária não se trata de característica exclusiva da DC, mas outras enfermidades como, por exemplo, hipersensibilidade a proteínas alimentar, infestação parasitária e infecção intestinal (Fagundes Neto *et al.*, 1995; Vande Voort *et al.*, 2009; Walker *et al.*, 2010).

O paciente nº2 também apresentou sintoma atípico, a acidose tubular renal (ATR), o qual pode ter origem variada, ou está relacionado com doenças autoimunes e/ou com base genética específica da doença. A ATR foi a primeira manifestação clínica do paciente que é portador de HLA-DQ2 (DQA1\*0501/DQB1\*0201). Foi investigado para a DC por ser portador de ATR, apresentar episódios de diarreia e dificuldade no ganho ponderoestatural. Mas na época da repetição dos exames séricos apresentava, além da ATR, outros sintomas atípicos como enxaquecas e flatulência. A constatação da soroconversão do IgA-EMA ocorreu aos 6 anos de idade num intervalo de tempo de 3 anos entre os exames e a biópsia e apresentou-se com classificação Marsh tipo 1.

A coexistência de enfermidades autoimunes com a DC não é comumente descrita na literatura, mas Fracchia relata caso clínico sobre uma mulher de 45 anos, que possui alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501/DQB1\*0201), e portadora de DC, ATR, síndrome de Sjögren, e cirrose biliar primária. Entretanto, algumas doenças autoimunes estavam evidentes antes de ser diagnosticada a DC, quando o IgA-EMA ainda era negativo. A suspeita da DC ocorreu por conta de um sintoma típico, a diarreia, perda de peso e anemia. Relata a soroconversão 3 anos após o último

exame negativo e a biópsia era compatível Marsh tipo 3 (Fracchia *et al.*, 2004). Pesquisadores relatam assimilação genética dos alelos HLA de outras enfermidades autoimunes capazes de oferecer epítomos de reconhecimento da fração tóxica do glúten desencadeando a integração com DC (Abadie *et al.*, 2011; Lionetti *et al.*, 2011; Di Sabatino *et al.*, 2012).

Já o paciente infanto-puberal nº3, apresenta alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501/DQB\*0201) com queixa clínica de DM1 de difícil controle, motivo pelo qual foi frequentemente testado para a DC, pois a mesma tem prevalência aumentada entre pacientes celíacos (Volta *et al.*, 2011). Apresentou soroconversão num intervalo de tempo de aproximadamente 2 anos.

Situação clínica da mesma natureza foi constatada em várias pesquisas. Pesquisadores como Crone *et al.* em 2003 na Áustria e Poulain *et al.* em 2007 na França igualmente descreveram a soroconversão entre pacientes portadores de DM1.

No estudo realizado na Áustria foram pesquisados 157 crianças e adolescentes de 4 a 21 anos entre 1993 a 2000. Inicialmente foram divididos em dois grupos: o primeiro grupo composto por 37 pacientes que tiveram o exame sorológico para DC realizados logo após se tornarem dependentes de insulina e o segundo grupo de 120 pessoas tinham feito a investigação durante o curso da DM1. A soroconversão do IgA-EMA ocorreu em 16 pacientes num período médio de 2 anos e 8 meses, 5 do primeiro grupo e 11 do segundo. Em 7 pacientes a biópsia era normal, 1 com aumento de LIE e 8 com mucosa intestinal plana. Somente uma criança apresentou anemia resistente ao tratamento e as outras crianças não tiveram sintomas gastrointestinais ou outra condição clínica sugestiva de DC, a forma silenciosa da DC. O que chama a atenção nesta publicação é a quantidade de meninos (11 de 16) na faixa etária de 4 a 20 anos com sintomas atípicos apresentaram a soroconversão (Crone *et al.*, 2003), assim como os resultados encontrados entre os SUSP desta pesquisa. Contradiz a pesquisa relacionada quanto ao gênero dos pacientes, que indica a prevalência 2 a 3 vezes maior em mulheres (Bai *et al.*, 2005).

No estudo realizado por Poulain *et al.* em 2007 na França, 950 crianças portadoras de DM1 tiveram exames sorológicos repetidos para DC entre 1994 a

2001. A soroconversão para IgA-EMA, com poucos sintomas gastrointestinais, e biópsia compatível foi constatado em 2 pacientes, e neste caso, são duas meninas de 2 e 6 anos respectivamente, num tempo médio entre os exames de 1 ano (Poulain *et al.*, 2007). Além da DM1 outras doenças autoimunes também têm prevalência aumentada para a DC como tireoidite autoimune, hepatite autoimune, alopecia areata, dermatite herpetiforme (Naveh *et al.*, 1999; Metso *et al.*; Panetta *et al.*, 2012).

Nesta pesquisa, a autorização para realizar o diagnóstico com o auxílio da biópsia intestinal foi negada pelos seus responsáveis em 2 pacientes, o paciente nº3 e o nº5. Ambos apresentaram os níveis de anticorpos IgA-tTG com valores em unidades específicas 10 vezes maior que o de ponto de corte, além disso, o IgA-EMA respectivos resultaram em positivos. Todos foram considerados como sendo pacientes portadores da DC embasados na nova diretriz estipulado pelo ESPGHAN 2012 (Husby *et al.*, 2012).

O paciente nº5 foi acompanhado clínica e laboratorialmente por ser portador de síndrome genética, neste caso a de Down, além do mais, possui HLA-DQ2 (DQA1\*0501/DQB1\*0201) com alto grau de risco de desenvolver a DC segundo Megiorni *et al.*, 2009. Há relatos com maior prevalência de DC em indivíduos portadores de síndromes genéticas como síndrome de Down de 5,2%, de Williams de e de Turner 3,2% (Fracchia *et al.*, 2004; Wouters *et al.*; Frost *et al.*, 2009). Crone encontrou uma criança, um menino, portador de Síndrome de Down e de DM1 apresentar soroconversão do IgA-EMA para a DC (Crone *et al.*, 2003).

Outros pesquisadores também sugeriram e também refizeram os testes sorológicos específicos para a DC em pacientes com outras enfermidades autoimunes ou anormalidades genéticas além de parentes de pacientes com DC (Pittschieler *et al.*, 2003; Bonamico *et al.*, 2006; Goldberg *et al.*, 2007).

O resultado encontrado entre os FM nesta pesquisa (pacientes nº4, 8, 9, 10 e 11) é equivalente aos artigos sobre familiares de pacientes portadores de DC que apresentaram soroconversão, prevalência maior de adultos (nº8, 9, 10 e 11), de irmãs (nº4, 8, 9 e 10), de alelos HLA-DQ2 (DQA1\*0501/DQB1\*0201) (nº4, 8, 9 e 11), inclusive houve a presença de variados sintomas como assintomáticos (nº10 e 11),

típico (nº8), atípico (nº4 e 9). Resultado compatível com estudos sobre frequência de DC entre familiares revelam a maior prevalência entre irmãos (20%), sendo 29% em irmãs e 15% em irmãos, enquanto que em pais o índice reduz para 6% (Louka *et al.*, 2002; Megiorni *et al.*, 2009).

Um estudo comandado por Bonamico estudou a soroconversão entre familiares de 1º grau dos casos índice de DC. Com as repetições dos exames sorológicos constatou 3 casos de soroconversão do IgA-EMA, todos eram adultos (1 mãe e 2 pais) e possuíam HLA-DQ2, embora uma mãe tenha se recusado a realizar a biópsia jejunal por motivos de debilidade do estado geral de saúde, e os outros 2 apresentaram atrofia vilositária total na análise histológica. Quanto aos sintomas, 2 eram assintomáticos e outro tinha histórico de dermatite herpetiforme (Bonamico *et al.*, 2006). No estudo feito no sul do país sobre retestagem dos anticorpos séricos da DC, 6 anos após o 1º exame anterior negativo entre 71 familiares de DC, resultou em 2 casos de soroconversão do IgA-EMA (Nass *et al.*, 2011).

O estudo entre parentes feito por Pittschieler e colaboradores se assemelha ao caso da paciente nº4 de 7 anos de idade, portadora de genes predisponente HLA-DQ2(DQA1\*0501/DQB1\*0201), irmã de DC e apresentou soroconversão dos anticorpos IgA-EMA num intervalo de 1 ano. O caso citado na literatura refere sobre uma menina de 8 anos de idade que apresentou soroconversão do IgA-EMA num intervalo entre os exames em 1 ano. No referido estudo, testaram os índices sorológicos de IgA-EMA em parentes de DC, apenas em crianças e adolescentes com 2 a 18 anos (18 filhos e 74 irmãos), que foram acompanhados durante 12 anos, e repetiram os exames sorológicos numa frequência de pelo menos uma vez ao ano para investigar a soroconversão. Houve relato de 5 pessoas (3 meninas entre 4 a 8 anos de idade; 2 meninos entre 4 anos e 15 anos) todas clinicamente silenciosas e apresentavam os alelos HLA-DQ2. O tempo de soroconversão variou entre 6 meses a 2 anos. A biópsia jejunal de 4 parentes foi de atrofia vilositária total e atrofia parcial em outro (Pittschieler *et al.*, 2003).

Esta mesma paciente (nº4), irmã do caso índice, repetiu o exame sorológico somente pelo fato de pertencer ao grupo de risco por ser parente de 1º grau, mas também por apresentar um sintoma atípico, o aumento da glicemia sérica (acima de 195 mg/dl, valor de referência >110mg/dl), indicativo da DM1. O intervalo de tempo

de soroconversão ocorreu num período de 1 ano, resultado compatível como a pesquisa, em que cita a soroconversão para a DC de 4 crianças portadoras de DM1, com média de idade de 2,9 a 3 anos, média de  $3,3 \pm 5$ , num intervalo de aproximadamente 1 ano (Cacciari *et al.*, 1997). Um estudo prospectivo acompanhando 2052 crianças genotipadas desde o nascimento com HLA predisponente para a DC e DM1, foram testadas anualmente para ambas as enfermidades simultaneamente. Nem todas as crianças com sorologia positiva para DM1 ou DC desenvolveram as enfermidades iminentes. Das 342 crianças com suspeita de DM1 apenas 51 a confirmou e das 88 com sorologia positiva para algum anticorpo da DC apenas 43 foi diagnosticado com a enfermidade. E 19 crianças desenvolveram anticorpos para a DC e para a DM1 simultaneamente, mas apenas 10 com evidências reais de desenvolver as enfermidades. Em 4 delas desenvolveu anticorpos inicialmente para a DC numa faixa etária de 0,5 a 8,9 anos num intervalo de tempo entre os exames de 1,4 anos; 4 desenvolveu antes para a DM1 entre 0,8 a 2,6 anos de idade em uma média de 1,4 anos entre os testes; e 2 para ambos. O estudo conclui, então, que crianças com alelos HLA predisponente para a DC e DM1 desenvolvem as enfermidades na infância ou mesmo ambas na mesma idade de forma aleatória (Simell *et al.*, 2010).

Existem várias referências sobre soroconversão de IgA-EMA envolvendo familiares de pacientes com DC capazes de amparar a pesquisa. Como Högberg e sua equipe sobre um estudo de prevalência com acompanhamento de até 25 anos, relata 2 casos de soroconversão de anticorpos IgA-EMA, duas mulheres portadoras de HLA-DQ2, biópsia com Marsh 4 e sintomas gastrointestinais evidentes (Högberg *et al.*, 2003). Semelhante ao caso da paciente nº 8, que aos 37 anos de idade, também apresentou sintomas clássicos da DC aproximadamente 8 anos depois do 1º exame, motivo pelo qual direcionou para uma nova investigação laboratorial, e resultou em soroconversão de IgA-EMA. Ela é portadora de HLA-DQ2(DQA1\*0501/DQB1\*0201), a lesão da mucosa intestinal foi classificada como Marsh 3.

Por outro lado, a paciente nº9, senhora de 39 anos, foi investigada inicialmente por ter irmão com a DC e naquela ocasião anticorpos séricos eram normais. Por ter como queixa principal a constipação e por ser portadora dos alelos HLA-DQ2(DQA1\*0501/DQB1\*0201), repetiu os exames, que revelou a

soroconversão dos anticorpos IgA-EMA num intervalo de 2 anos, e através de exames complementares (biópsia Marsh 2) firmou o diagnóstico definitivo para DC. Um relato parecido foi encontrado no estudo desenvolvido por Biagi *et al.*, que relata a soroconversão de IgA-EMA entre parentes, e resultou em 1 caso, uma senhora de 33 anos com poucos sintomas sugestivos da DC, num período de 4 anos e 2 meses (Biagi *et al.*, 2008). A paciente nº9 também se queixou de aftas recorrentes na mucosa oral, manifestação clínica sem etiologia conhecida e que não é exclusiva da DC. A prevalência na população em geral é em torno de 5%, e entre os pacientes portadores de DC é aproximadamente 5,6%, mas, em alguns casos, pode ser a única manifestação da enfermidade e não pode ser ignorada (Tursi *et al.*, 2001, Neville *et al.*, 2002; Shakeri *et al.*, 2009).

Em relação aos pacientes nº10 e 11 são similares às características dos pacientes encontrados na pesquisa feita por Niveloni, principalmente no que se refere à sintomatologia (assintomáticos) e o tempo entre os exames (7 anos). O estudo desenvolvido na Argentina, relata casos de soroconversão ocorridos em parentes de 1º grau, uma senhora de 27 anos, irmã do caso índice e outro um pai de 52 anos, ambos clinicamente assintomáticos, com HLA-DQ2, biópsia compatível com a DC e com o intervalo de tempo entre os exames de aproximadamente 8 anos (Niveloni *et al.*, 2000). Porém é importante ressaltar que os pacientes nº10 e 11 são membros da mesma família. Dos 16 sujeitos desta família, 10 repetiram os exames sorológicos por ter alelos HLA predisponente e 5 são portadores de DC. Estudos relacionados com casos múltiplos entre familiares de DC relata o aumento na frequência maior que 20%, sobretudo, entre irmãos, provavelmente por compartilharem genes em comum (Book *et al.*, 2003; Gudjonsdottir *et al.*, 2004).

Outra particularidade: o paciente nº11 apresentou soroconversão do IgA-EMA aos 75 anos de idade. Este último, muito parecido com o trabalho publicado por Goldberg, relata o caso de um pai de DC com 63 anos soroconverteu para a IGA-EMA mesmo sem apresentar muitos sintomas relevantes (Goldberg *et al.*, 2007). Mas Vilppula e sua equipe repetiram exames sorológicos específicos para a DC em pacientes idosos com resultado sorológico negativo anterior para DC num intervalo de 3 anos e relataram 5 casos de soroconversão (3 homens e 2 mulheres), todos com atrofia vilositária total, 2 deles apresentaram poucas queixas gastrointestinais e 3 eram assintomáticos (Vilppula *et al.*, 2009). Outro estudo envolvendo idosos,

estudiosos encontraram 20 casos de soroconversão num tempo médio de 10 anos. Entre os que soroconverteram, 9 tinham deficiência de ferro; 3 sintomas clássicos da DC; 3 com histórico de DC na família; 1 teve náusea; 1 teve linfoma no intestino delgado; 15 (75%) eram mulheres (Godfrey *et al.*, 2010). As publicações evidenciaram a vulnerabilidade do paciente idoso ante a DC mesmo sem histórico familiar da enfermidade.

Curiosamente, a paciente nº10, por ter apresentado a soroconversão do IgA-EMA de forma assintomática, teve grande dificuldade de aceitar o tratamento com a completa exclusão do glúten da dieta habitual, conseqüentemente, 4 anos depois foi diagnosticada com outra doença autoimune, o Lupus Eritematoso Sistêmico, que tem alta incidência entre os pacientes celíacos com a evolução de aproximadamente 5 anos após o diagnóstico da DC (Ludvigson *et al.*, 2012). Esta mesma paciente (nº10) possui particularidade nos alelos HLA predisponente, tem apenas um alelo do DQB do heterodímero HLA-DQ2(DQB1\*0201) e os dois alelos do HLA-DQ8(DQA1\*0301/DQB1\*0302) assim como o paciente nº1 que possui apenas os alelos DQB dos heterodímeros do HLA-DQ2(DQB1\*0201) e do HLA-DQ8(DQB1\*0302). Mas enquadrando-os no gradiente de risco sugerido por Megiorni evidencia o grau elevado de risco de desenvolver a DC (Megiorni *et al.*, 2006). Além disso, as pesquisas indicam o risco determinado de 8,1% para indivíduos com homozigose para HLA-DQ2, de 0,1% em HLA-DQ8, com um moderado risco de 2,1% a 2,9% em heterozigose para HLA-DQ2 (Sollid *et al.*, 2002; Vermeulen *et al.*, 2009), e o alelo HLA-DQB1(\*0302) o risco é aumentado entre familiares de DC (Lewis *et al.*, 2000).

A paciente nº7 aos 9 anos de idade participou de uma pesquisa realizada por Pratesi *et al* em 2003, naquela época a sorologia da paciente era negativa e tinha como queixa clínica a enxaqueca. Após 10 anos, apresentou quadros de diarreia e instigou nova investigação para a DC, e foi detectada a soroconversão do IgA-EMA sendo diagnosticada como paciente portador de DC, mas recusou-se a iniciar o tratamento proposto. Após 1 ano, paradoxalmente, houve uma regressão espontânea dos níveis de anticorpos do IgA-tTG e do IgA-EMA mesmo com a presença de glúten na dieta. Permaneceu com a dieta contendo glúten e, 3 anos depois, ao evoluir para Tireoidite de Hashimoto, que tem uma frequência aumentada

entre os pacientes portadores de DC (Metso *et al.*, 2012), enfim, acatou o tratamento com dieta isenta de glúten. Existem dados que sustentam o evento ocorrido com a paciente nº7. Há referência bibliográfica de 29 crianças com IgA-EMA positivo reverterem espontaneamente sem a intervenção da dieta e a flutuação nos níveis de anticorpos para a DC como a IgA-tTG em várias ocasiões (Simell *et al.*, 2010). A publicação como o de Kurppa relata alguns casos clínicos de pessoas com IgA-EMA positivo e biópsia normal, motivo pelo qual o tratamento não foi proposto, e após alguns anos houve a normalização espontânea dos índices de anticorpos IgA-tTG e IgA-EMA, mas posteriormente alguns apresentaram sintomas típicos da DC e evolução com outras complicações clínicas e, finalmente, foram diagnosticados como DC por apresentar sorologia IgA-EMA positivo compatível com o grau de lesão da mucosa jejunal. O estudo afirma a não exclusão da DC apesar da flutuação dos níveis de anticorpos séricos uma vez que a IgA-EMA se apresente positivo (Kurppa *et al.*, 2011).

A flutuação dos anticorpos séricos da DC durante a vida do paciente celíaco mesmo com dieta contendo glúten foi descrita também por Collin e colaboradores num estudo prospectivo de 4 pacientes. Estes concluíram que o curso natural da doença ainda precisa ser esclarecido, mas a biópsia negativa (sem atrofia das vilosidades) e o desaparecimento dos anticorpos específicos da DC (IgA-EMA) não excluem a enfermidade (Collin *et al.*, 2012). Também foi relatada sobre pacientes que foram diagnosticados para DC ainda crianças e anos mais tarde voltaram a consumir glúten regularmente. Dentre estes pacientes 20% permaneciam sem sintomas e ausência de anticorpos da DC. O estudo conclui que esta latência pode ser transitória e os indivíduos com estas características necessitam de acompanhamento para evitar problemas futuros (Matysiak-Budnik *et al.*, 2007).

A grande maioria dos pacientes que apresentaram soroconversão dos anticorpos IgA-EMA aderiram ao tratamento com a exclusão total do glúten na mesma época do diagnóstico da DC e como consequência obtiveram melhora clínica. Mas os pacientes nº7, 10 e 11 não iniciaram o tratamento proposto de imediato. O paciente nº 11 conseguiu normalizar os níveis de anticorpos séricos específicos num período de 3 anos, mas como era assintomático, não foi possível verificar alteração clínica com o início da dieta recomendada. E as pacientes nº7 e 10 evoluíram com outras doenças autoimunes num período de 1 ano (paciente nº7)

e de 4 anos (paciente nº10). O tratamento evita problemas futuros tais como a osteoporose (Sambrook et al., 2006) e o linfoma (Ludvigsson, 2012).

Verificamos que nesta pesquisa a paciente nº4 apresentou em intervalo de 1 ano DM1 e DC na mesma época; a paciente nº7 evoluiu em 3 anos com Tireoidite de Hashimoto e a paciente nº10 em 4 anos, com LES. As doenças autoimunes são comumente encontradas entre os pacientes portadores de DC. Os epítomos de reconhecimento à porção deamidada do glúten pelos alelos HLA predisponente da DC é muito semelhante às outras enfermidades autoimunes e permite evolução com as mesmas (Abadie et al., 2011; Lionetti et al., 2011; Di Sabatino et al., 2012). Aproximadamente 30% dos adultos têm um ou mais desordens autoimunes, se comparada com a população em geral (3%) (Ventura *et al.*, 1999). Mas ainda não se tem evidências de que o início do tratamento iniba a evolução com outras enfermidades autoimunes.

Na literatura é comum encontrar sugestões variadas de repetições periódicas dos exames sorológicos pelo risco de soroconversão dos anticorpos da DC. Pede-se para repetir exames pelo concílio de ESPGHAN 2012 num intervalo de 3 a 6 meses nos casos em que o paciente apresente os níveis de anticorpos IgA-tTG positivos, mas com IgA-EMA negativo.

No estudo feito por Goldberg recomenda a repetição dos exames para a DC entre familiares num intervalo de 4 a 5 anos após o teste inicial (Goldberg *et al.*, 2007). Entretanto outro autor recomenda repetição de exames a cada 7 anos (Niveloni *et al.*, 2000).

Wolters sugeriu o *screening* sorológico em parentes de primeiro grau com HLA-DQ2/DQ8 e assintomáticos com menos de 20 anos a cada 5 a 10 anos, e em familiares com mais de 20 anos uma simples repetição por volta dos 50 anos em que as complicações da DC podem desenvolver (Wolters *et al.*, 2008).

Outro autor também sugere a repetição dos exames sorológicos em parentes e em pacientes portadores de DM1 a cada 5 a 10 anos de intervalo mesmo que já tenham um resultado sorológico anterior negativo (Collin *et al.*, 2008).

Considerando a constante preocupação em obter um diagnóstico seguro e preciso para a DC no intuito de evitar problemas futuros principalmente com o desenvolvimento de outras enfermidades como linfoma (Malamut *et al.*, 2013). E levando-se em conta o resultado do presente estudo em que 6 /11 dos pacientes que apresentaram soroconversão dos anticorpos IgA-EMA num período de

aproximadamente 3 anos de acompanhamento, está de acordo com a sugestão de repetição de exames num período de 2 a 3 anos proposto por Bonamico e ESPGHAN 2012 em pacientes com predisposição genética para a DC e pertencentes a grupo de risco de desenvolvê-la (Bonamico *et al.*, 2006; Husby *et al.*, 2012).

## 7 CONCLUSÃO

A TI de soroconversão pessoa-período dos anticorpos IgA-EMA na coorte de pacientes com alelos HLA predisponente pertencentes aos grupos de risco elevado para desenvolvê-la atendidos no AmbDC/HUB em até 14 anos de acompanhamento (1998 até 2012) foi de 1,1 casos de soroconversão por 100 pessoas-ano.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários autores sugerem repetição dos exames para diferentes casos clínicos (Tabela 7). Considerando o resultado do presente estudo, em que 6/11 pacientes apresentaram soroconversão dos anticorpos IgA-EMA num período de aproximadamente 3 anos de acompanhamento, está de acordo com a estratégia de acompanhamento de pacientes baseado no teste de tipagem de HLA predisponente (HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8) com a repetição de exames séricos, inicialmente pelo IgA-tTG a cada 2 a 3 anos proposto por Bonamico (Bonamico *et al.*, 2006) e por ESPGHAN de 2012 (Husby *et al.*, 2012). Pois portadores de alelos HLA predisponente para a DC com risco elevado de desenvolver a enfermidade podem sofrer soroconversão dos anticorpos IgA-EMA em qualquer fase da vida, mesmo sem sintomas, reforçando a necessidade de repetição esporádica dos exames sorológicos para a detecção precoce e permitir um tratamento adequado evitando problemas como a malignidade.

Tabela 7 – Sugestões de intervalo de repetição de exames séricos na literatura.

<b>Intervalo entre os exames</b>	<b>Pacientes indicados</b>	<b>Autor</b>
3 a 6 meses	tTG positivo mas EMA negativo (ESPGHAN)	Husby <i>et al.</i> , 2012
1 ano	DM1	Crone <i>et al.</i> , 2003
2 a 3 anos	Parentes e HLA predisponente	Bonamico <i>et al.</i> , 2006
2 a 3 anos	Crianças e adolescentes sem sintomas, mas que pertençam ao grupo de risco (ESPGHAN)	Husby <i>et al.</i> , 2012
4 a 5 anos	Parentes	Goldberg <i>et al.</i> , 2007
7 anos	Parentes	Niveloni <i>et al.</i> , 2000
5 a 10 anos	Parentes e DM1	Collin <i>et al.</i> , 2008
5 a 10 anos	Parentes com menos de 20 anos e acima de 20 anos propõe 1 repetição por volta dos 50 anos	Wolters <i>et al.</i> , 2008

## 8. REFERÊNCIAS

Aine L, Mäki M, Collin P, Keyriläinen O. Dental enamel defects in celiac disease. *J Oral Pathol Med.* 1990;19:241-5.

Akobeng AK, Thomas AG. Systematic review: tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 27:1044–52.

Alessio MG, Tonutti E, Brusca I, Radice A, Licini L, Sonzogni A *et al.* Correlation between IgA tissue transglutaminase antibody ratio and histological finding in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012;55:44-9.

Almeida PL, Gandolfi L, Modelli IC, Martins Rde C, Almeida RC, Pratesi R. Prevalence of celiac disease among first degree relatives of Brazilian celiac patients. *Arq Gastroenterol.* 2008 Jan-Mar;45(1):69-72.

Almeida RC, Gandolfi L, De Nazaré Klautau-Guimarães M *et al.* Does Celiac Disease Occur in Afro-Derived Brazilian Populations? *Am J Hum Biol.* 2012;24:710-2.

Araya M, Mondragón A, Pérez-Bravo F *et al.* Celiac Disease in a Chilean Population Carrying Amerindian Traits. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;31:381-6.

Auricchio S, Troncone R. History of coeliac disease. *Eur J Pediatr.* 1996;155:427-28.

Bai D, Brar P, Holleran S, et al. Effect of gender on the manifestations of celiac disease: evidence for greater malabsorption in men. *Scand J Gastroenterol.* 2005;40:183-7.

Bai JC, Fried M, Corazza GR, Schuppan D, Farthing M, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines on Celiac Disease. *J Clin Gastroenterol.* 2013;47:121-26.

Baker PG, Read AE. Reversible infertility in male coeliac patients. *Br Med J.* 1975;02:316-17.

Barada K, Abu Daya H, Rostami K, Catassi C. Celiac disease in the developing world. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2012;22:773-96.

- Barker JM, Liu E. Celiac disease: pathophysiology, clinical manifestations, and associated autoimmune conditions. *Adv Pediatr*. 2008;55:349-65.
- Bao F, Bhagat G. Histopathology of celiac disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2012;22:679-94.
- Baydoun A, Maakaron JE, Halawi H *et al*. Hematological manifestations of celiac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2012;47:1401-11.
- Biagi F, Campanella J, Bianchi PI, Zanellati G, Capriglione I, *et al*. GR. The incidence of coeliac disease in adult first degree relatives. *Dig Liver Dis*. 2008;40:97-100.
- Bonamico M, Ferri M, Mariani P, Nenna R, Thanasi E, Luparia RP *et al*. Serologic and genetic markers of celiac disease: a sequential study in the screening of first degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2006;42:150-4.
- Book L, Zone JJ, Neuhausen SL. Prevalence of celiac disease among relatives of sib pairs with celiac disease in U.S. families. *Am J Gastroenterol*. 2003; 98:377-81.
- Brar P, Lee AR, Lewis SK, Bhagat G, Green PH. Celiac Disease in African-Americans. *Dig Dis Sci*. 2006;51:1012-15.
- Cacciari E, Bianchi FB, Salardi S, Bazzoli F; De Franceschi L, Volta U. Late development of IgA antiendomysial antibodies and small intestinal mucosal atrophy after insulin dependent diabetes mellitus onset. *Archives Diseases of Childhood*. 1997;77:465.
- Carroccio A, Vitale G, Di Prima L, Chifari N, Napoli S *et al*. Comparison of Anti-Transglutaminase ELISAs and an Anti-Endomysial Antibody Assay in the Diagnosis of Celiac Disease: A Prospective Study. *Clinical Chemistry*. 2002;48:1546-50.
- Catassi C, Räscht IM, Gandolfi L *et al*. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet*. 1999 Aug 21;354(9179):647-8.
- Catassi C, Kryszak D, Bhatti B *et al*. Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974. *Ann Med*. 2010;42:530-38.
- Castro-Antunes MM, Crovella S, Brandão LAC, Guimarães RL, Motta MEFA, *et al*. *Clinics*. 2011;66:227-31.

Chang M, Green PH. Genetic testing before serologic screening in relatives of patients with celiac disease as a cost containment method. *J Clin Gastroenterol*. 2009 Jan;43(1):43-50.

Chorzelski TP, Suleij J *et al*. IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and celiac disease. *Ann NY Acad Sci*. 1983;420:325-34.

Collin P, Kaukinen K. Serologic screening for coeliac disease in risk groups: is once in the lifetime enough? *Dig Liver Dis*. 2008;40:101-3.

Collin P, Kurppa K, Lindfors K, Mäki M, Kaukinen K. Transient celiac autoimmunity or just temporary fluctuation? *J Clin Gastroenterol*. 2012;46:432-3.

Crone J, Rami B, Huber WD, Granditsch G, Schober E. Prevalence of celiac disease and follow-up of EMA in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2003;37:67-71.

Cummins AG, Roberts-Thomson IC. Prevalence of celiac disease in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol*. 2009;24:1347-51.

Dicke WK. Treatment of celiac disease. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1951 95:124-30.

Dieterich W, Laag E, Schöpfer H *et al*. Autoantibodies to Tissue Transglutaminase as Predictors of Celiac Disease. *Gastroenterology*. 1998;115:1317-21.

Di Sabatino A, Vanoli A, Giuffrida P, Luinetti O, Solcia E *et al*. The function of tissue transglutaminase in celiac disease. *Autoimmun Rev*. 2012;11:746-53.

Drago S, El Asmar R, Di Pierro M *et al*. Gliadin, zonulin and gut permeability: effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol*. 2006;41:408-19.

Dowd B, Walter-Smith J. Samuel Gee, Arteus, and The Coeliac Affectin. *British Medical Journal*. 1947;2:45-7.

Dubé C, Rostom A, Sy R *et al*. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systemic review. *Gastroenterology* 2005;128:s57-67.

Elli L, Contiero P, Tagliabue G, Tomba C, Bardella MT. Risk of intestinal lymphoma in undiagnosed coeliac disease: Results from a registered population with different coeliac disease prevalence. *Dig Liver Dis.* 2012;44:743-7.

Fagundes-Neto U, Freymuller E, Gatti MS, Schmitz LG, Scaletsky I. Enteropathogenic *Escherichia coli* O111ab:H2 penetrates the small bowel epithelium in an infant with acute diarrhoea. *Acta Paediatr.* 1995;84:453-5.

Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology.* 2001;120:636-51.

Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, *et al.* *Arch Intern Med.* 2003;163:286-92.

Fasano A, Catassi C. Coeliac disease in children. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005;19:467-78.

Fasano A, Catassi C. Clinical practice. Celiac disease. *N Engl J Med.* 2012;367:2419-26.

Falchuk ZM, Rogentine GN, Strober W. Predominance of histocompatibility antigen HLA-8 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *F Clin Investig.* 1972;51:1602-5.

Ferguson A, Mac Donald TT, McClure JP, Holden RJ. Cell-mediated immunity to gliadin within the small-intestinal mucosa in coeliac disease. *Lancet.* 1975;1:895-97.

Ferguson A, Blackwell JN, Barnetson RS. Effects of additional dietary gluten on the small-intestinal mucosa of volunteers and of patients with dermatitis herpetiformis. *Scand J Gastroenterol.* 1987;22:543-9.

Fracchia M, Galatola G, Corradi F, Dall'Omo AM, Rovera L *et al.* Coeliac disease associated with Sjögren's syndrome, renal tubular acidosis, primary biliary cirrhosis and autoimmune hyperthyroidism. *Digestive and Liver Disease.* 2004;36:489-91.

Freeman HJ. Biopsy-defined adult celiac disease in Asian-Canadians. *Can J Gastroenterol.* 2003;17:433-36.

Freeman HJ. Neurological disorders in adult celiac disease. *Can J Gastroenterol.* 2008;22:909-11.

Freeman HJ. Risk factors in familial forms of celiac disease. *World J Gastroenterol* 2010;16:1828-31.

Frost AR, Band MM, Conway GS. Serological screening for coeliac disease in adults with Turner's syndrome: prevalence and clinical significance of endomysium antibody positivity. *Eur J Endocrinol*. 2009;160:675-79.

Gandolfi L, Pratesi R, Cordoba JC, Tauil PL, Gasparin M, Catassi C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:689-92.

Godfrey JD, Brantner TL, Brinjikji W, Christensen KN, Brogan DL et al. Morbidity and mortality among older individuals with undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology*.2010;139:763-69.

Goldberg D, Kryszak D, Fasano A, Green PHR. Screening for celiac disease in family members: is follow-up testing necessary? *Dig Dis Sci* . 2007;52:1082-86.

Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S *et al*. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*. 2002;50:624-28.

Green PH, Rostami K, Marsh MN. Diagnosis of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;19:389-400.

Gudjonsdottir AH, Nilsson S, Ek J, *et al*. The risk of celiac disease in 107 families with at least two affected siblings. *J Gastroenterol Nutr*. 2004;38:338-42.

Hadjivassiliou M, Grünewald R, Sharrack B, Sanders D, Lobo A *et al*. Gluten ataxia in perspective: epidemiology, genetic susceptibility and clinical characteristics. *Brain*. 2003;126:685-91.

Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A *et al*. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *JPediatr Gastroenterol Nutr*. 2005;40:1-19.

Högberg L, Fälth-Magnusson K, Grodzinsky E, Stenhammar L. Familial prevalence of coeliac disease: a twenty-year follow-up study. *Scand J Gastroenterol*. 2003;38:61-5.

Hovell CJ, Collett JA, Vautier G, Cheng AJ, Sutanto E *et al.* High prevalence of coeliac disease in a population-based study from Western Australia: a case for screening? *Med J Aust.* 2001;175:247-50.

Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A *et al.* ESPGHAN guidelines for the diagnosis of coeliac disease in children and adolescents. An evidence-based approach. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;54:136-60.

Katz KD, Rashtak S, Lahr BD *et al.* Screening for celiac disease in a North American population: sequential serology and gastrointestinal symptoms. *Am J Gastroenterol.* 2011;106:1333-9.

Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F *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.* 2003 ;64:469-77.

Kneepkens CM, von Blomberg BM. Clinical practice : coeliac disease. *Eur J Pediatr.* 2012;171:1011-21.

Karinen H, Kärkkäinen P, Pihlajamäki J, *et al.* HLA genotyping is useful in the evaluation of the risk for coeliac disease in the 1<sup>st</sup> degree relatives of patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.* 2006;41:1299-1304.

Kupfer SS, Jabri B. Pathophysiology of celiac disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2012;22:639-60.

Kurppa K, Collin P, Lindfors K, Mäki M, Kaukinen K. Spontaneous Negative Seroconversion of Endomysial Antibodies Does Not Exclude Subsequent Celiac Disease. *JPGN.* 2011;53:576-79.

Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K, *et al.* Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology.* 2008;135:194-204.e3.

Larussa T, Suraci E, Nazionale I, Leone I, Montalcini T *et al.* No evidence of circulating autoantibodies against osteoprotegerin in patients with coeliac disease. *World J Gastroenterol.* 2012;18:1622-7.

Lewis C, Book L, Black J, Sawitzke A, Cannon-Albright L *et al.* Celiac disease and human leukocyte antigen genotype: accuracy of diagnosis in self-diagnosed

individuals, dosage effect, and sibling risk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;31:22-7.

Lewis NR, Scott BB. Systematic review: the use of serology to exclude or diagnose coeliac disease (a comparison of the endomysial and tissue transglutaminase antibody tests). *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24:47-54.

Licchetta L, Bisulli F, Di Vito L, La Morgia C, Naldi I *et al.* Epilepsy in coeliac disease: not just a matter of calcifications. *Neurol Sci.* 2011;32:1069-74.

Lillemäe K, Ress K, Harro J, Merenäkk L, Maaros HI *et al.* A 10-year serological follow-up of celiac disease in an Estonian population. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011;00:1-3.

Lionetti E, Catassi C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int Rev Immunol.* 2011;30:219-31.

Liu E, Rewers M, Eisenbarth GS: Genetic testing: who should do the testing and what is the role of genetic testing in the setting of celiac disease? *Gastroenterology.* 2005;128:S33–S37.

Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, Laurila K, Collin P *et al.* Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26:1217-25.

Louka AS, Nilsson S, Olsson M, Talseth B, Lie BA *et al.* HLA in coeliac disease families: a novel test of risk modification by the 'other' haplotype when at least one DQA1\*05-DQB1\*02 haplotype is carried. *Tissue Antigens.* 2002;60:147-54.

Losolsky MS. A History of Coeliac Disease. *Digestive Diseases* 2008;26:11220.

Ludvigsson JF, Ansved P, Fälth-Magnusson K, Hammersjö JA, Johansson C *et al.* Symptoms and signs have changed in Swedish children with coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004;38:181-6.

Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A *et al.* The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.* 2012 Feb 16. [Epub ahead of print]

Ludvigsson JF, Rubio-Tapia A, Chowdhary V, Murray JA, Simard JF. Increased Risk of Systemic Lupus Erythematosus in 29,000 Patients with Biopsy-verified Celiac Disease. *J Rheumatol.*2012;39:1964-70.

Ludvigsson JF. Mortality and malignancy in celiac disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am.* 2012;22:705-22.

Maglio M, Tosco A, Paparo F, Auricchio R, Granata V *et al.* Serum and intestinal celiac disease associated antibodies in children with celiac disease younger than 2 years of age. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;50:43-8.

Mäki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet.*1997;349:1755-59.

Mäki M, Kallonen K, Lähdeaho ML, Visakorpi JK.. Changing pattern of childhood coeliac disease in Finland. *Acta Paediatr Scand.*1988;77:408-12.

Mäki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M *et al.* Prevalence of Celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med.* 2003;348:2517-24.

Malamut G, Chandesris O, Verkarre V, Meresse B, Callens C, *et al.* Enteropathy associated T cell lymphoma in celiac disease: A large retrospective study. *Dig Liver Dis.* 2013;9. 8658:00438-0. doi: 10.1016/j.dld.2012.12.001. [Epub ahead of print]

Marsh MN. Grains of truth: evolutionary changes in small intestinal mucosa in response to environmental antigen challenge. *Gut.* 1990;31:111-4.

Marsh MN. Mucosal pathology in gluten sensitivity. *Coeliac Disease.* 1992;ed M Marsh:136-91.

Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology.* 1992;102:330-54.

Martinelli D, Fortunato F, Tafuri S, Germinario CA, Prato R. Reproductive life disorders in Italian celiac women. A case-control study. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:89.

Martins RCA, Gandolfi L, Modelli IC, Almeida RC, Castro LC, *et al.* Serologic screening and genetic testing among brazilian patients with celiac disease and their first degree relatives. *Arq Gastroenterol.* 2010;47:257-62.

Matysiak-Budnik T, Malamut G, Patey-Mariaud de Serre N, Grosdidier E *et al.* Long-term follow-up of 61 coeliac patients diagnosed in childhood: evolution toward latency is possible on a normal diet *Gut* 2007;56:1379-86.

Megiorni F, Mora B, Bonamico M, Barbato M, Nenna R *et al.* HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Human Immunology.* 2009;70: 55-9.

Megiorni F, Pizutti A. HLA-DQ1 and HLA-DQB1 in celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *J Bio Med Sci.* 2012;19:88.

Meijer JWR, Wahab PJ, Mulder CJJ. Small intestinal biopsies in celiac disease: duodenal or jejunal? *Virchows Arch.* 2003;442:124-28.

Melo SB, Fernandes MI, Peres LC, Troncon LE, Galvão LC. Prevalence and demographic characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. *Dig Dis Sci.* 2006;51:1020-5.

Meresse B, Curran SA, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M *et al.* Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in CD. *J Exp Med.* 2006;203:1343-55.

Meresse B, Malamut G, Cerf-Bensussan N. Celiac disease: an immunological jigsaw. *Immunity.* 2012;36:907-19.

Metso S, Hyytiä-Ilmonen H, Kaukinen K, Huhtala H, Jaatinen P *et al.* Gluten-free diet and autoimmune thyroiditis in patients with celiac disease. A prospective controlled study. *Scand J Gastroenterol.* 2012;47:43-8.

Modelli IC, Gandolfi L, Almeida RC, Araújo GMAC, Picanço MA, Pratesi R. Serologic screening for celiac disease in symptomatic 12 to 36 month-old children. *Arq Gastroenterol.* 2010;47:61-5.

Molberg Ø, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C *et al.* Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 1998;4:713-17.

Molteni N, Bardella MT, Bianchi PA. Obstetric and gynecological problems in women with untreated celiac sprue. *J Clin Gastroenterol.* 1990;12:37-39.

Morón B, Cebolla A, Manyani H, Alvarez-Maqueda M, Megías M *et al.* Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide. *Am J Clin Nutr.* 2008;87:405-14.

Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M *et al.* The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med.* 2010;42:587-95.

Nass FR, Kotze LMS, Nisihara RM, Messias-Reason IJ, Utiyama RR. Serological and clinical follow-up of relatives of celiac disease patients from southern Brazil.

Naveh Y, Rosenthal E, Ben-Arieh Y, Etzioni A. Celiac disease-associated alopecia in childhood. *J Pediatr.* 1999;134:362-64.

Neville BW, DDACBJE: Oral and maxillofacial pathology. 2nd edition. Philadelphia: WB Saunders; 2002.

Nieuwenhuis WP, Kneepkens CM, Houwen RH, de Beer HJ, Mulder CJ, Mearin ML. Guideline 'Coeliac disease and dermatitis herpetiformis'. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2010;154:A1904.

Nistico L, Fagnani C, Coto I, Percopo S, Cotichini R *et al.* Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut.* 2006;55:803-8.

Niveloni S, Pedreira S, Sugai E, Vazquez H, Smecuol E *et al.* The natural history of gluten sensitivity: report of two new celiac disease patients resulting from a long-term follow-up of nonatrophic, first-degree relatives. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:463-8.

Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1999;11:1185-94.

Oberhuber G. Histopathology of celiac disease. *Biomed Pharmacother.* 2000;54:368-72.

Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA, Cortez AJ, Carvalho FO *et al.* High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007;19:43-9.

Panetta F, Nobili V, Sartorelli MR, Papa RE, Ferretti F *et al.* Celiac disease in pediatric patients with autoimmune hepatitis: etiology, diagnosis, and management. *Paediatr Drugs.* 2012;14:35-41.

Paveley WF. From Arateus to Crosby: a history of coeliac disease. *BMJ* 1988;297:1646-1649.

Pereira MG. *Epidemiologia teoria e prática.* 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Coogan; 2001.

Pereira MA, Ortiz-Agostinho CL, Nishitokukado I, Sato MN, Damião AO *et al.* Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. *World J Gastroenterol.* 2006;12:6546-50.

Pittschieler K, Gentili L, Niederhofer H. Onset of coeliac disease: a prospective longitudinal study. *Acta Paediatr.* 2003;92:1149-52.

Poulain C, Johanet C, Delcroix C, Lévy-Marchal C, Tubiana-Rufi N. Prevalence and clinical features of celiac disease in 950 children with type 1 diabetes in France. *Diabetes Metab.* 2007;33:453-8.

Pratesi R, Gandolfi L, Garcia SG, Modelli IC, Lopes de Almeida P *et al.* Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population. *Scand J Gastroenterol.* 2003;38:747-50.

Rashid M, Zarkadas M, Anca A, Limeback H. . Oral manifestations of celiac disease: a clinical guide for dentists. *J Can Dent Assoc.* 2011;77:b39.

Rashtak S, Ettore MW, Homburger HA, Murray JA. Comparative usefulness of deamidated gliadin antibodies in the diagnosis of celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6:426-32; quiz 370.

Remes-Troche JM, Ramírez-Iglesias MT, Rubio-Tapia A, Alonso-Ramos A, Velazquez A *et al.* Celiac disease could be a frequent disease in Mexico: prevalence

of tissue transglutaminase antibody in healthy blood donors. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40:697-700.

Romanos J, van Diemen CC, Nolte IM, Trynka G, Zhernakova A *et al.* Analysis of HLA and non-HLA alleles can identify individuals at high risk for celiac disease. *Gastroenterology.* 2009 Sep;137(3):834-40, 840.e1-3.

Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan EL, Johnson DR, Page W *et al.* Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology.* 2009;137:88-93.

Salmi TT, Hervonen K, Kautiainen *et al.* Prevalence and incidence of dermatitis herpetiformis: a 40-year prospective study from Finland. *Br J Dermatol.* 2011 Aug;165:354-9.

Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *Lancet* 2006; 367:2010-18.

Sapone A, Bai J, Ciacci C, Dolinsek J, Green P, Hadjivassilou M *et al.* Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Medicine.* 2012;10:13.

Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M *et al.* Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)- gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut.* 2008;57:747-754.

Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F *et al.* Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science.* 2002 Sep 27;297(5590):2275-9.

Shakeri R, Zamani F, Sotoudehmanesh R, Amiri A, Mohamadnejad M, *et al.* Gluten sensitivity enteropathy in patients with recurrent aphthous stomatitis. *BMC Gastroenterol.* 2009; 9:44.

Shewry, P.R. Improving the protein content and composition of cereal grain. *J. Cereal Sci.* 2007;46:239-50.

Simell S, Hoppu S, Simell T, Ståhlberg MR, Viander M *et al.* Age at development of type 1 diabetes- and celiac disease-associated antibodies and clinical disease in genetically susceptible children observed from birth. *Diabetes Care.* 2010;33:774-9.

Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to particular HLA-DQ  $\alpha/\beta$  heterodimer. *J Exp Med*. 1989;169:345-50.

Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology*. 1993;105:910-22. Erratum in: *Gastroenterology*. 1994;106:1133.

Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:647-55.

Sollid LM, Lie BA. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005;3:843-51.

Stokes PL, Asquith P, Holmes GK, Mackintosh P, Cooke WT. Histocompatibility antigens associated with adult coeliac disease. *Lancet* 1972;2:162-64.

Swigonski NL, Kuhlenschmidt HL, Bull MJ, Corkins MR, Downs SM. Screening for celiac disease in asymptomatic children with Down syndrome: cost-effectiveness of preventing lymphoma. *Pediatrics*. 2006;118:594-602.

Szklo M, Nieto FJ. *Epidemiology: Beyond the basics*. Jones and Batlett Publishers. 2007; 2<sup>nd</sup> ed.

Tatar G, Elsurer R, Simsek H, Balaban YH, Hascelik G *et al*. Screening of Tissue Transglutaminase Antibody in Healthy Blood Donors for Celiac Disease Screening in the Turkish Population. *Digestive Diseases and Sciences*. 2004; 49:1479-84.

Troncone R, Kosova R. Short stature and catch-up growth in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51 Suppl 3:S137-8.

Tursi A, Giorgetti G, Brandimarte G, Rubino E, Lombardi D, Gasbarrini G: Prevalence and clinical presentation of subclinical/silent celiac disease in adults: an analysis on a 12-year observation. *Hepatogastroenterology* 2001, 48:462-4.

van Belle G, Fisher LD, Heagerty PJ, Lumley T. *Biostatistics a methodology for the health sciences*. 2nd ed. United States of America (USA): Wiley-Interscience; 2004.

van der Wal Y, van Veelen P, Pena S et al. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol* 1998;161:1585-88.

Vande Voort JL, Murray JA, Lahr BD, Van Dyke CT, Kroning CM, Moore SB, Wu TT. Lymphocytic duodenitis and the spectrum of celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2009 Jan;104(1):142-8.

Ventura A, Magazzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology* 1999;117(2):297-303.

Vermeulen BA, Hogen Esch CE, Yuksel Z, Koning F, Verduijn W *et al*. Phenotypic variance in childhood coeliac disease and the HLA-DQ/DR dose effect. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44:40-5.

Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekelä I, Patrikainen H *et al*. Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in elderly people: a population-based study. *BMC Gastroenterol*.2009;9:49.

Vilppula A, Collin P, Mäki M, Valve R, Luostarinen M *et al*. Undetected coeliac disease in the elderly a biopsy-proven population-based study. *Dig Liver Dis*. 2008;40:809-13.

Volta U, Tovoli F, Caio G. Clinical and immunological features of celiac disease in patients with type 1 diabetes mellitus. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2011;5:479-87.

Walker MM, Murray JA, Ronkainen J, Aro P, Storskrubb T al. Detection of Celiac Disease and Lymphocytic Enteropathy by Parallel Serology and Histopathology in a Population-Based Study. *Gastroenterology*. 2010;139:112-9.

Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J *et al*. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990;65:909–11.

Wang N, Shen N, Vyse TJ, Anand V, Gunnarson I *et al*. Selective IgA deficiency in autoimmune diseases. *Mol Med*. 2011;17:1383-96..

Weinstein WM. Latent celiac sprue. *Gastroenterology*. 1974;66:489-93.

West J, Logan RF, Hill PG, Lloyd A, Lewis S *et al.* Seroprevalence, correlates, and characteristics of undetected coeliac disease in England. *Gut.* 2003;52:960-5.

Wolters VM, Wijmenga C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am J Gastroenterol.* 2008;103:190-95.

Wouters J, Weijerman ME, van Furth AM, Schreurs MW, Crusius JB *et al.* Prospective human leukocyte antigen, endomysium immunoglobulin A antibodies, and transglutaminase antibodies testing for celiac disease in children with Down syndrome. *J Pediatr.* 2009;154:239-42.

Wu J, Xia B, von Blomberg BM, Zhao C, Yang XW *et al.* Coeliac disease in China, a field waiting for exploration. *Rev Esp Enferm Dig.* 2010;102:472-7.

## ANEXO 1-PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA



Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

### PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: 018/11

Título do Projeto: “Prevalência de soro-conversão entre familiares de celíacos”.

Pesquisadora Responsável: Rosa Harumi Uenishi

Data de Entrada: 04/03/11

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto 018/11 com o título: “Prevalência de soro-conversão entre familiares de celíacos”, analisado na 3ª Reunião Ordinária, realizada no dia 12 de abril de 2011.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 13 de abril de 2011.

  
Prof. Nairi Monsore  
Coordenador do CEP-FS/UnB

## **APÊNDICE 1-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - HUB

PESQUISA: Prevalência de soroconversão entre familiares de celíacos

PESQUISADORA: Rosa Harumi Uenishi

ORIENTADORES: Prof<sup>a</sup> Dra Lenora Gandolfi e Prof Dr Riccardo Pratesi

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Por meio deste termo de consentimento livre e esclarecido convido o(a) Senhor(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado: Prevalência de soroconversão entre familiares de celíacos. Fui informado que a doença celíaca é uma doença intestinal, que já nascemos com ela, mas poderemos desenvolver ou não, dependendo da nossa alimentação com trigo, cevada e outros cereais, que tem uma substância chamada glúten. Entendi que quando temos parentes com a doença celíaca poderemos desenvolver a qualquer momento mesmo que os testes iniciais sejam negativos, pois não se sabe quantas vezes é necessário realizar os exames sorológicos em familiares de celíacos, já que estudos revelam a existência de soroconversão em parentes.

Soube da importância deste projeto, pois estes dados ajudarão médicos e profissionais a dar maior atenção a esta doença e propor um novo acompanhamento e tratamento. Foi me explicado que se for positivo para Doença Celíaca, posso ter tido exposição muito prolongada ao glúten ou ter desenvolvido a doença sem perceber e que isso pode trazer, por exemplo, problemas como má absorção de importantes nutrientes, levando a outras doenças, ou mesmo intensificando-as. Foi me dito que se não houver tratamento, posso desenvolver outras complicações e ter redução na qualidade e expectativa de vida. Fui informado que para eu ou o sujeito

sob minha responsabilidade, participar da pesquisa deve-se tirar sangue de uma das veias do braço, que é um procedimento comum em medicina e que tem risco muito pequeno para a saúde. Foi garantido para mim pelos pesquisadores, que os testes realizados são confiáveis e realizados por profissionais com ampla experiência. Eu não pagarei nada pelo exame e o resultado será informado para mim. O resultado do meu teste será mantido em privacidade e meu nome ou sujeito sob minha responsabilidade, não será identificado em nenhum relatório ou publicação. Os dados fornecidos serão arquivados no laboratório de pesquisa em pediatria e centro de pesquisa em doença celíaca (B1-94/13 FM/FS) sob os cuidados e responsabilidade dos pesquisadores.

No caso do resultado do meu exame der positivo, haverá uma assistência continuada pelo médico do Serviço de Gastroenterologia do HUB, mas poderei procurar por outro serviço se desejar. A minha recusa em participar da pesquisa, não implicará em qualquer prejuízo na prestação da assistência para mim, pela equipe do Serviço de Gastroenterologia do HUB. Mesmo após a assinatura desse termo de consentimento, ficarei livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento, também sem qualquer prejuízo.

Dessa maneira, depois de ter sido devidamente informado, declaro que concordo voluntariamente ou permito que o sujeito sob minha responsabilidade, participe do projeto e se tiver qualquer dúvida poderei entrar em contato com o responsável pela pesquisa, que é a Prof<sup>a</sup> Dra. Lenora Gandolfi e Prof Dr Riccardo Pratesi pelo telefone (61)3307-2134 ou com Rosa Harumi Uenishi pelos telefones (61)3307-2134, (61)8244-6160. O Comitê de comissão de ética em pesquisa CEP/FS UnB pelo telefone (61) 3107-1989 também estará disponível para quaisquer esclarecimentos.

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ 201 \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente ou responsável pelo paciente: \_\_\_\_\_

Assinatura do médico responsável: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE 2-FORMULÁRIO DA PESQUISA

Ambulatório de Doença Celíaca– HUB/UnB

Prevalência de soroconversão entre familiares de celíacos

Nº DNA:\_\_\_\_\_HLA:\_\_\_\_\_

Consome glúten regularmente? S N Obs.:\_\_\_\_\_

Registro da pesquisa:\_\_\_\_\_ Data:\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Nome:\_\_\_\_\_

Sexo: M F Idade atual: \_\_\_\_\_anos. Data de Nascimento:\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Responsável:\_\_\_\_\_

Telefones:\_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Email:\_\_\_\_\_

Parente do DC:\_\_\_\_\_

Parentesco:\_\_\_\_\_

Suspeita de DC? S N Motivo:\_\_\_\_\_

### Histórico:

**Sintomas:** Diarreia Distensão abdominal Dores articulares Constipação

Dor abdominal recorrente Aftas recidivantes Gases/Flatulencia Outros:

**Condições ou desordens associadas:** Diabetes de tipo1 Síndrome genética

Tiroidite de Hashimoto Outro:

**Exame Anterior Negativo:** Em\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ aos\_\_\_\_anos.

**Exames atuais:** Em\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_ aos\_\_\_\_anos

Peso:\_\_\_\_\_Altura:\_\_\_\_\_ IMC:\_\_\_\_\_

IgA-tTG:\_\_\_\_\_ IgA-EMA: Positivo:\_\_\_\_\_/4 Negativo. Biópsia: Marsh\_\_\_\_\_