

ALESSANDRA DOS SANTOS DOMINGUES

**PREVALÊNCIA DE DOENÇA CELÍACA EM PACIENTES
PEDIÁTRICOS COM DOENÇA DE KAWASAKI DE BRASÍLIA**

BRASÍLIA, 2017

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

ALESSANDRA DOS SANTOS DOMINGUES

**PREVALÊNCIA DE DOENÇA CELÍACA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM
DOENÇA DE KAWASAKI DE BRASÍLIA**

**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, 2017

ALESSANDRA DOS SANTOS DOMINGUES

**PREVALÊNCIA DE DOENÇA CELÍACA EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM
DOENÇA DE KAWASAKI DE BRASÍLIA**

**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: 07/07/2017

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lenora Gandolfi (Presidente)

UnB

Prof. Dr. Luiz Cláudio Gonçalves de Castro (Membro)

UnB

Profa. Dra. Inês Cristina dos Santos Modelli (Membro)

SES-DF

Profa. Dra. Igle Moura Paz Ribeiro (Suplente)

I.Fátima

A meus pais, eterno esteio e porto seguro de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por prover saúde e discernimento aos meus mais difíceis dias.

À minha família, por todo apoio durante esta caminhada.

Aos meus queridos Professores Doutores Lenora Gandolfi e Riccardo Pratesi, por serem exemplos de dedicação e compromisso com a medicina.

À toda equipe do Ambulatório e do Laboratório de Doença Celíaca, pela inestimável parceria.

Aos meus queridos professores dos créditos e disciplinas do Mestrado por construírem meu conhecimento e motivarem minha curiosidade científica.

Aos pacientes que são o alfa e o ômega de toda medicina.

“O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice.

Colhe, pois, a sabedoria.

Armazena suavidade para o amanhã. ”

(Leonardo da Vinci)

RESUMO

A doença celíaca é uma desordem inflamatória autoimune caracterizada por uma intolerância permanente ao glúten, que afeta indivíduos de qualquer faixa etária geneticamente suscetíveis, podendo causar sintomas intestinais e sistêmicos. A predisposição genética está fortemente relacionada aos alelos HLA-DQ2 e DQ8. Familiares de primeiro grau de pacientes celíacos e portadores de outros distúrbios autoimunes, tais como diabetes mellitus tipo I, tireoidite de Hashimoto, apresentam uma prevalência de doença celíaca superior à população geral, a qual é de aproximadamente 1%. Relatou-se também elevada prevalência entre pacientes com a doença de Kawasaki (5,5%), uma vasculite sistêmica aguda autolimitada de etiologia desconhecida que afeta predominantemente crianças menores de 5 anos, podendo acometer adolescentes. Apesar de anormalidades imunológicas serem descritas durante a fase aguda da doença de Kawasaki, a ocorrência de um segundo transtorno imunológico raramente é relatada. Objetivo: determinar a prevalência da doença celíaca em pacientes pediátricos com diagnóstico prévio de doença de Kawasaki atendidas em Serviço de Reumatologia Pediátrica de Brasília e identificar a prevalência dos alelos de predisposição genética nesses pacientes. Metodologia: estudo descritivo de prevalência que incluiu cento e dez crianças com doença de Kawasaki (66 do sexo masculino, idade mediana 4,8 anos) que realizaram a pesquisa dos alelos HLA através do teste de reação em cadeia de polimerase e a pesquisa do anticorpo antitransglutaminase IgA através do teste imunoenzimático ELISA. Nos pacientes com níveis anormais deste anticorpo se realizou ainda a pesquisa do anticorpo antiendomísio IgA através do teste de imunofluorescência indireta, seguido por biópsia duodenal. Resultado: apenas um paciente, do sexo masculino, de 9 anos de idade, diagnosticado com doença de Kawasaki aos 5 anos apresentou anticorpos positivos, HLA-DQ2 e DQ8 além de biópsia duodenal com atrofia vilositária (Marsh 3A). No rastreio dos familiares de primeiro grau deste paciente se obteve o diagnóstico de doença celíaca em sua irmã. A prevalência de genótipos predisponentes para doença celíaca foi de 29,1%, semelhante à população geral. Conclusão: a prevalência de doença celíaca encontrada neste grupo de pacientes com Kawasaki não foi superior à da população geral (0,9% *versus* 1%), assim como a prevalência dos seus

alelos predisponentes (29,1% *versus* 30-40%). Desta forma não se pode afirmar que haja associação entre ambas as condições.

Palavras Chave: Doença Celíaca, Doença de Kawasaki, glúten, anticorpos, HLA, crianças.

ABSTRACT

Celiac disease is an autoimmune inflammatory disorder characterized by a permanent intolerance to gluten, which affects genetically susceptible individuals, at any age, causing intestinal and systemic symptoms. Genetic predisposition is strongly related to HLA DQ2 and DQ8 alleles. First-degree relatives of celiac patients and carriers of other autoimmune disorders, such as type 1 diabetes mellitus, Hashimoto's thyroiditis, have a higher prevalence of celiac disease than the general population, which is approximately 1%. There is also a report of higher prevalence among patients with Kawasaki disease (5.5%), a self-limiting acute systemic vasculitis of unknown etiology that predominantly affects children under 5 years of age, and may affect adolescents. Although immunological abnormalities are described during the acute phase of Kawasaki disease, the occurrence of a second immune disorder is rarely reported. Objective: to determine the prevalence of celiac disease in pediatric patients with Kawasaki disease attending at a reference service in Brasília, and to identify the prevalence of genetic predisposition alleles in those patients. Methods: a descriptive prevalence study that included one hundred and ten children with Kawasaki disease (66 male, median age 4.8 years) who performed the HLA allele research using the polymerase chain reaction test and the IgA anti-transglutaminase antibody by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The anti-endomysial IgA antibody was also investigated through the indirect immunofluorescence test in patients with abnormal levels of this antibody, followed by duodenal biopsy. Results: Only one 9-year-old male patient, diagnosed with Kawasaki disease at age 5, presented positive antibodies, HLA DQ2 and DQ8 in addition to duodenal biopsy with villous atrophy (Marsh 3A). This first-degree relatives screening returned the diagnosis of celiac disease in his sister. The prevalence of predisposing genotypes for celiac disease was 29.1%, similar to the general population. Conclusion: The prevalence of celiac disease in this group of Kawasaki patients was not greater than the general population (0.9% versus 1%), as was the prevalence of predisposing alleles (29.1% vs. 30-40%). This way it can not be stated that there is an association between both conditions.

Keywords: Celiac disease, Kawasaki disease, glutens, antibodies, HLA, Child.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Prevalência de doença celíaca, consumo de trigo e frequência dos haplótipos DQ2 e DQ8 em todo o mundo.....	21
Figura 2 - Família, subfamília e a tribo dos grãos.....	25
Figura 3 - Processo de desaminação.....	26
Figura 4 - Mecanismos da lesão mucosa na doença celíaca.....	28
Figura 5 - Localização do HLA no cromossomo 6.....	30
Figura 6 - Associações de antígenos leucocitários humanos na doença celíaca....	31
Figura 7 - O <i>iceberg</i> da doença celíaca.....	33
Figura 8 - Teste antiendomísio IgA.....	36
Figura 9 - Características histológicas da doença celíaca.....	38
Figura 10 - Fluxograma para o diagnóstico de doença celíaca em pacientes que apresentam sintomas sugestivos.....	40
Figura 11 - Fluxograma para o diagnóstico de DC em pacientes que pertencem a grupos de risco.....	41
Figura 12 - (A) Hiperemia conjuntival, lábios secos e rachados. (B) Língua de morango.....	50
Figura 13 - (A) (B) Exantema maculopapular em pé e períneo. (C) Exantema maculopapular difuso.....	50
Figura 14 - (A) Eritema de mão. (B) Eritema e edema em pé.....	50
Figura 15 - Descamação periungual.....	51
Figura 16 - Fluxograma para avaliação laboratorial e acompanhamento clínico dos pacientes envolvidos na pesquisa.....	65
Figura 17 - Biópsia intestinal do paciente LGAS com doença celíaca compatível com a classificação de Marsh 3 A.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação de Marsh-Oberhuber.....	37
Tabela 2 - Critérios diagnósticos para doença de Kawasaki.....	53
Tabela 3 - Diagnóstico diferencial da doença de Kawasaki.....	53
Tabela 4 - Características de <i>primers</i> utilizados para qPCR.....	59
Tabela 5 - Componentes utilizados por reação de qPCR.....	60
Tabela 6 - Condições de qPCR para os genes <i>DQA1*05</i> , <i>DQB1*02</i> , <i>DQA1*03</i> e HGH.....	62
Tabela 7 - Condições da qPCR para o alelo <i>DQB1*03:02</i> descritos por Profaizer et al, 2011.....	63
Tabela 8 - Distribuição dos alelos de HLA predisponentes para doença celíaca em crianças com diagnóstico de Kawasaki.....	68
Tabela 9 - Descrição do grupo em estudo e dos principais estudos populacionais brasileiros baseados no tTG-IgA ELISA para prevalência da doença celíaca.....	71
Tabela 10 - Comparação das prevalências dos diferentes estudos populacionais brasileiros com os pacientes com doença de Kawasaki.....	72
Tabela 11 - Comparação de resultados do qPCR entre paciente com Kawasaki e indivíduos não celíacos.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC	Aneurisma de artéria coronária
AAP	<i>American Academy of Pediatrics</i>
AHA	<i>American Heart Association</i>
anti-DGP	Antigliadina desaminada
anti-tTG	Antitransglutaminase
APC	<i>Antigen presenting cells</i>
BCG	Vacina contra tuberculose
BLK	Linfócito quinase B
CASP3	Caspase 3
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CXCR3	Receptor 3 de quimiocina
DC	Doença celíaca
DK	Doença de Kawasaki
DM1	Diabetes Mellitus tipo 1
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DO	Densidade Óptica
EDA	Endoscopia digestiva alta
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay</i>
EMA	Anticorpo antiendomísio
ENOS	El Niño-Oscilação Sul
ESPGHAN	<i>European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition</i>
EUA	Estados Unidos da América
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FEPECS	Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde
FITC	Fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína
GWAS	<i>Genome-wide Association Studies</i>
H0	Hipótese nula
H1	Hipótese alternativa
H2SO4	Ácido Sulfúrico

HCB	Hospital da Criança de Brasília
HGH	<i>Human Growth Hormone</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase-Conjugated</i>
h-tTG	<i>Human Tissue Transglutaminase</i>
HUB	Hospital Universitário de Brasília
IFN- γ	Interferon gama
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IGIV	Imunoglobulina intravenosa
IL -15	Interleucina 15
IL 1 β	Interleucina 1 beta
IL 6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
ITPKC	Inositol 1,4,5 trifosfato quinase
LabDC/FM UnB	Laboratório de Pesquisa em Doença Celíaca da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília
LIE	Linfócitos intraepiteliais
LSN	Limite superior da normalidade
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MICA	<i>MHC class I chain-related gene A</i>
ml	Mililitro
mm	Milímetro
ng / μ L	Nanograma / microlitro
NK	<i>Natural killer</i>
NKG2D	<i>C-type lectin-like activating immunoreceptor</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Proteína C reativa
PGRSS	Programa de Gerenciamento de Resíduos Sólidos em Serviços de Saúde
qPCR	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
rpm	Rotações por minuto

SES-DF	Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal
SLMC	Síndrome do linfonodo mucocutâneo
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	Receptor de célula T
TG2	Transglutaminase 2
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i>
Th1	<i>T helper 1</i>
Th2	<i>T helper 2</i>
Th17	<i>T helper 17</i>
TJ	<i>Tight Junctions</i>
Tm	<i>Temperature melting</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
Treg	Células T reguladoras
tTG	Transglutaminase tecidual
U	Unidades arbitrárias
UNB	Universidade de Brasília
VHS	Velocidade de hemossedimentação
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DA DOENÇA CELÍACA	17
2.2 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA CELÍACA	20
2.3 ETIOPATOGENESE DA DOENÇA CELÍACA	24
2.3.1 Fatores Genéticos	30
2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA CELÍACA.....	32
2.5 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA CELÍACA.....	34
2.5.1 Testes Sorológicos	35
2.5.2 Análise Histológica de Biópsias Duodenais	36
2.5.3 Classificações Histológicas	37
2.5.4 Testes Genéticos	38
2.5.5 Etapas do Diagnóstico	39
2.6 GRUPOS DE RISCO E DOENÇAS ASSOCIADAS À DOENÇA CELÍACA	42
2.7 CONSIDERAÇÕES GERAIS E HISTÓRIA DA DOENÇA DE KAWASAKI	43
2.8 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE KAWASAKI	44
2.9 ETIOPATOGENIA DA DOENÇA DE KAWASAKI	46
2.9.1 Teoria Infecciosa	46
2.9.2 Suscetibilidade Genética	47
2.9.3 Desregulação Imune	48
2.10 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA DE KAWASAKI.....	49
2.10.1 Manifestações Cardiovasculares	51
2.10.2 Outras Manifestações Clínicas	51
2.11 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA DOENÇA DE KAWASAKI.....	52
3 OBJETIVOS	55
3.1 OBJETIVO GERAL	55
3.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO	55
4 MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA	56
4.2 POPULAÇÃO.....	56
4.2.1 Critérios de Inclusão	56
4.2.2 Critérios de Exclusão	56
4.3 COLETA DAS AMOSTRAS	57
4.4 EXAMES SOROLÓGICOS.....	57
4.4.1 Pesquisa de Anticorpos Antitransglutaminase IgA (tTG-IgA)	57
4.4.2 Pesquisa de Anticorpos Antiendomísio IgA (EMA-IgA)	58
4.5 TESTE GENÉTICO.....	59
4.5.1 Extração de DNA	59
4.5.2 Análise do DNA Extraído	59
4.5.3 Genotipagem dos Genes HLA-DQ Predisponentes	60
4.6 BIÓPSIA ENDOSCÓPICA DUODENAL	64
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
4.8 ASPECTOS ÉTICOS	66
5 RESULTADOS	67
5.1 RESULTADO DO TESTE GENÉTICO.....	68
5.1.1 PCR em Tempo Real (qPCR)	68
6 DISCUSSÃO	69
7 CONCLUSÃO	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO	93
APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	100
ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	101

1 INTRODUÇÃO

A doença celíaca (DC) é uma desordem sistêmica mediada por fenômenos imunológicos e desencadeada por fragmentos proteicos do glúten presentes em grãos como trigo, centeio e cevada que afeta indivíduos geneticamente predispostos de qualquer faixa etária. O espectro clínico de apresentação é amplo, contemplando manifestações gastrointestinais e extraintestinais, podendo ainda se apresentar de forma assintomática. Desta maneira é caracterizada por uma combinação variável de sinais e sintomas clínicos “glúten dependentes”, anticorpos específicos, alterações histológicas e predisposição genética (1).

O desenvolvimento da DC está estreitamente associado com moléculas do Complexo de Histocompatibilidade Principal (do inglês *Major Histocompatibility Complex* - MHC) de classe II. Mais de 95% dos pacientes celíacos expressam as moléculas HLA-DQ2 e um grupo menor expressa o HLA-DQ8. Entretanto aproximadamente 30 a 40% da população caucasiana detém os alelos que codificam o HLA-DQ2, mas apenas 1% desenvolve a DC, portanto o HLA é um fator necessário, mas não suficiente para desencadear a DC (1) (2).

Atualmente é uma doença considerada frequente, porém, questiona-se sua real prevalência. Apesar da melhor compreensão sobre esta patologia um grande número de pacientes permanece sem diagnóstico devido sua expressão clínica, às vezes sutil ou até mesmo ausente. A proporção entre doença celíaca não detectada e doença diagnosticada permanece alta, mesmo em países desenvolvidos como a Inglaterra e a Finlândia onde essas proporções são de 8:1 e 3:1, respectivamente (3).

Apesar da dificuldade na detecção precoce, da disponibilidade de testes sorológicos sensíveis e específicos e de tratamento disponível, o rastreamento da doença celíaca na população geral ainda está em debate (4).

As diretrizes atuais sobre a DC dividem os pacientes pediátricos em dois grupos para o rastreamento diagnóstico, o primeiro representado por crianças com sintomas sugestivos de DC e o segundo por crianças assintomáticas pertencentes a grupos de risco. A confirmação diagnóstica é baseada na positividade sorológica dos anticorpos antitransglutaminase (anti-tTG) e antiendomísio (EMA) e na histopatologia característica, contudo, as novas diretrizes trazem a possibilidade da não realização da biópsia intestinal em casos específicos de pacientes com sintomas característicos, HLA predisponente e elevados títulos de anti-tTG (1).

A pesquisa do HLA-DQ2 e DQ8 vem ganhando destaque nos últimos anos pelo seu elevado valor preditivo negativo (VPN), isto é, trata-se de uma ferramenta importante para excluir o diagnóstico, podendo ser utilizada no rastreio dos pacientes dos grupos de risco descartando a possibilidade de DC e tornando desnecessária a vigilância sorológica naqueles que não possuam o HLA predisponente. Há diversos grupos de risco bem conhecidos para DC. Neles, a prevalência da DC supera a prevalência encontrada na população geral que é de 1%. Um dos principais grupos de risco é representado pelos familiares de primeiro grau de pacientes celíacos com prevalência de até 20% (1).

Outros grupos de risco incluem indivíduos com anormalidades cromossômicas como síndrome de Down, Turner e Willians. Entre as doenças associadas destacam-se as doenças autoimunes como o diabetes mellitus tipo 1 (DM1) com prevalência média de 8%, doenças autoimunes da tireóide 7% (1) (5). Uma alta prevalência de 5,5% também foi relatada entre pacientes com doença de Kawasaki (DK) (6).

A DK é uma vasculite sistêmica aguda autolimitada, de etiologia desconhecida, que afeta predominantemente lactentes e crianças jovens. Alguns trabalhos sugerem que agentes infecciosos ou superantígenos desencadeiam a ativação exacerbada do sistema imunológico em indivíduos geneticamente susceptíveis (7).

A compreensão de uma possível associação entre DC e a Doença de Kawasaki permitiria uma maior suspeição clínica, visando um diagnóstico mais precoce e a instituição do tratamento adequado, baseado na dieta isenta de glúten (8) (9). O retardo no diagnóstico da DC pode trazer consequências importantes como anemia ferropriva, atraso do crescimento, osteoporose, entre outras complicações (3) (10).

Nosso trabalho avaliou através dos testes sorológicos (antitransglutaminase e antiendomísio IgA) e dos alelos de predisposição genética (HLA-DQ2 e DQ8) a prevalência da DC em pacientes com DK. Uma vez confirmada esta associação, novos estudos deveriam ser conduzidos para avaliar a relevância do rastreio da doença celíaca nos pacientes com DK visto que configurariam um novo grupo de risco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS DA DOENÇA CELÍACA

A história da doença celíaca pode ser contada a partir de uma mudança fundamental da própria história da humanidade que é a passagem de uma vida nômade para a fixação em determinadas áreas geográficas.

Esta mudança pode ser considerada um dos mais importantes marcos históricos na criação das sociedades modernas visto que o agrupamento de pessoas com um objetivo comum criou novos desafios para a humanidade, notadamente na produção de alimentos para subsistência, pois o extrativismo simples esgotava os recursos locais e tornava inevitável a mudança. Isto tornou necessário desenvolver tecnologias de cultivo, principalmente de grãos, particularmente o trigo.

Neste cenário se sobressai uma região denominada como “Crescente Fértil do Oriente”, próximo aos rios Tigre, Eufrates e Alto Nilo, desenvolvida no período neolítico após a era do gelo, onde o trigo era a principal fonte cultivável de alimento para suporte do vasto crescimento populacional que ocorreu no decorrer da história.

O agrupamento de sociedades organizadas com uma dieta largamente baseada no trigo tornou possível a identificação e o estudo de sintomas que posteriormente seriam agrupados no que hoje conhecemos como doença celíaca.

A primeira descrição destes sintomas é historicamente relacionada a textos de “*Aretaeus o Capadócio*” em 250 D.C., o qual descreve em uma área da Turquia que originalmente pertencia ao “Crescente Fértil”, sintomas de pacientes que sofriam de uma doença caracterizada por diarreia, perda de peso e “decaimento geral”, acometendo em particular crianças e adultos jovens. A primeira denominação dada a esta condição foi de “*Koiliakos*” que significa “doença do abdome”, posteriormente “*Coeliac Disease*” e por fim doença celíaca (11).

Após a fixação inicial no “Crescente Fértil” o *Homo Sapiens* expandiu seu conhecimento de cultivo agrícola e seus domínios por todo o mundo, não só para a África, mas também para a Europa, chegando à Austrália e talvez até à América do Sul.

Contudo, acredita-se que em muitas regiões o cultivo principal de outros cereais, que não o trigo, não permitiu observação e relato de casos de doença celíaca. Na China, por exemplo houve cultivo principalmente de milho e arroz, nas Américas

Central e do Sul cultivou-se milho, abóbora, batata, tomate, cacau, mandioca e feijão (12).

Por muitos séculos, o consumo de glúten na Europa foi menor, já que o consumo de grãos era baixo e a fabricação de pães derivados do glúten era artesanal.

Com a revolução industrial e o desenvolvimento do primeiro engenho a vapor no século XIX houve grande avanço na panificação, permitindo que este alimento fosse amplamente difundido na Europa e conseqüentemente aumentou sobremaneira a população exposta ao glúten.

Na América pré-Colombiana, cultivava-se principalmente batata, milho, inúmeras ervas e frutas, portanto o consumo do glúten tem início apenas com a chegada dos colonizadores europeus, quando estes se recusaram a confiar em culturas nativas americanas e, por conseguinte, transportaram as sementes de trigo da Europa para garantir o fornecimento dos alimentos comumente consumidos por eles em seus países de origem (13).

Séculos se passaram sem grandes avanços e a descrição da forma clássica da doença celíaca só ocorre em 1887, sendo atribuída a Samuel Gee, médico inglês, em um escrito inicial complementado por um artigo em 1888, onde definiu o que chamou de "*the coeliac affection*". O relato é notavelmente rico em detalhes, como a aparência das fezes, fraqueza muscular, distensão abdominal, e o caráter crônico da doença, sendo inclusive o primeiro relato que sugere que a mudança na dieta pudesse ter papel no tratamento (11).

Após a descrição de 1888, outros autores como Herter em 1908, Howland em 1921 e Sidney Haas em 1924 tentaram fazer associação entre componentes da dieta e os sintomas descritos por Gee, contudo apenas em 1950 o pediatra holandês Willem Karel Dicke identificou no trigo o fator desencadeante da doença. Esta descoberta veio quando Dicke observou que algumas crianças internadas no Hospital Infantil Juliana, em Haia, estavam particularmente frágeis por sintomas semelhantes aos descritos por Gee, e que tiveram seu quadro significativamente agravado após a guerra.

Sua perspicaz observação mostrou que houve relação desta piora com o extenso uso de amido de trigo, fornecido pelas tropas da coalizão para melhorar o estado nutricional da população após o fim da guerra e, por fim, em seu estudo de doutorado ele mostrou que essas crianças tinham seu quadro marcadamente melhorado com a exclusão do trigo, centeio e aveia da dieta (11) (12).

A confirmação desta hipótese veio com os colegas de laboratório de Dicke, Weijers e van de Kamer, que conseguiram pela primeira vez medir a gordura fecal. Desta forma foi possível diagnosticar casos menos graves e demonstrar que excluindo o trigo da dieta havia redução do teor de gordura nas fezes, associado à melhora da condição clínica do paciente. Com isso foi definido que o trigo era a pedra fundamental da etiologia da doença celíaca e que a dieta livre deste alimento seria a base de seu tratamento (11).

Alguns anos mais tarde, em 1954, Paulley relatou a primeira descrição das características histológicas das lesões intestinais em pacientes com doença celíaca, em amostras tomadas em cirurgia. Isto levou a grande interesse na introdução da biópsia intestinal para confirmação diagnóstica da DC o que foi conseguido inicialmente na Argentina por Royer e na Inglaterra por Margot Shiner. A partir daí a biópsia intestinal por cápsulas, como a de Crosby-Kugler, foi difundida e bastante utilizada, contudo, este procedimento apresentava desvantagens importantes como a possibilidade de obtenção de um único espécime de tecido e risco de complicações como sangramento e perfuração.

Com o objetivo de obter um maior número de amostras foi desenvolvido um tubo hidráulico de biópsia que posteriormente foi substituído pela endoscopia que além de permitir múltiplos sítios de biópsia, possibilita a visualização direta da mucosa, ajudando a definir o melhor ponto para biópsia e identificar precocemente complicações como perfuração e sangramento, sendo até hoje de grande valia no manejo destes pacientes (11) (12).

Em 1969 a Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN – *European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*) estabeleceu os critérios diagnósticos para DC, ressaltando a importância da realização de três biópsias. A primeira biópsia antes do início da dieta sem glúten, a segunda durante a dieta sem glúten e a terceira após reintrodução do glúten na dieta (14)(15).

Em 1972 foi publicado o primeiro estudo associando alelos HLA com a DC, especificamente o HLA-B8 e posteriormente o HLA-A8. Mais tarde os estudos de clonagem do sistema MHC permitiram evidenciar os verdadeiros genes envolvidos na DC descritos como aqueles que codificam os heterodímeros HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (16). O próximo marco nos métodos diagnósticos ocorreu durante as décadas de 70 e 80 quando surgiram os testes sorológicos. Inicialmente foram descobertos os

anticorpos antireticulina e antigliadina. O anticorpo antiendomísio (EMA) desenvolvido por Chorzelski e colaboradores em 1983 foi o primeiro teste sorológico confiável, devido à sua elevada especificidade, realizado através de imunofluorescência indireta (17).

Walker-Smith em 1990 revisou os critérios diagnósticos da ESPGHAN. Apesar da incorporação dos testes sorológicos, a biópsia duodenal ainda era padrão-ouro (18). Em 1992, Marsh estabeleceu uma classificação histológica que descrevia os diferentes graus de agressão da mucosa intestinal, iniciando com aumento de linfócitos intraepiteliais e culminando com atrofia total das vilosidades e hipoplasia das criptas (19). Dieterich e colaboradores em 1997 identificaram a enzima transglutaminase tecidual (tTG) como o auto antígeno capaz de induzir o aumento da permeabilidade tecidual. Nesta época o método de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para quantificação dos anticorpos antitransglutaminase IgA foi desenvolvido (20).

Em 2012 a ESPGHAN atualizou os critérios diagnósticos. Como as alterações histológicas não são específicas para DC e podem ser encontradas em outras enteropatias, isso enfraquece a significância da biópsia e, simultaneamente, coloca muito mais valor nos marcadores sorológicos. Desta forma o diagnóstico baseia-se nas manifestações clínicas, testes sorológicos, testes genéticos e na biópsia duodenal que pode ser dispensada caso o paciente apresente todos os critérios anteriores e uma antitransglutaminase IgA 10 vezes acima do limite superior da normalidade (1).

2.2 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA CELÍACA

A doença celíaca foi considerada no passado uma condição rara limitada a população pediátrica europeia, com apresentação clínica clássica caracterizada por diarreia crônica, distensão abdominal, esteatorréia, desnutrição e dificuldade de crescimento. Contudo, graças aos avanços das técnicas diagnósticas e à realização de pesquisas epidemiológicas em diversos países foi possível reconhecer que a doença celíaca é uma desordem comum que afeta indivíduos de diferentes etnias, podendo se apresentar de diferentes formas clínicas (1) (21). No que diz respeito ao gênero, assim como na maioria das doenças autoimunes, exhibe predomínio do sexo feminino com uma relação de 2,8:1 (22). Estudos têm demonstrado uma correlação entre a prevalência da DC, o consumo de glúten e a frequência dos genótipos predisponentes HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em todo o mundo (23) (24). (Figura 1)

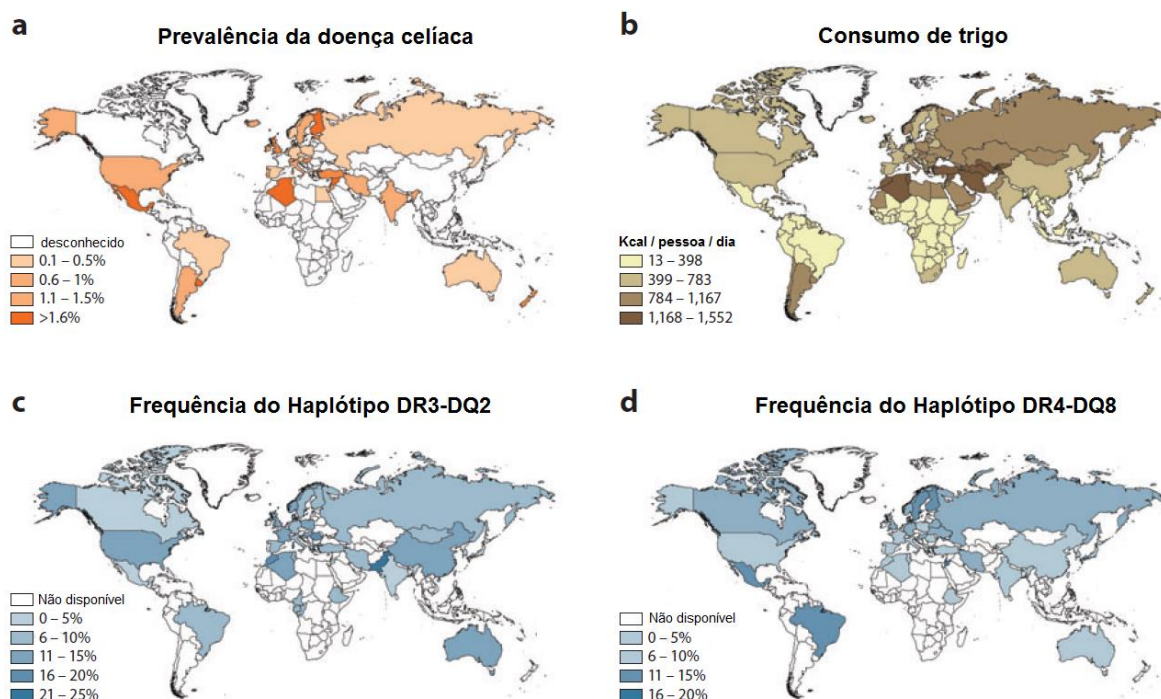


Figura 1 - Prevalência de doença celíaca, consumo de trigo e freqüência dos haplótipos DQ2 e DQ8 em todo o mundo. (a) Prevalência de DC. (b) Consumo de trigo. (c) Frequência do haplotipo DR3-DQ2. (d) Frequência do haplotipo DR4-DQ8. Adaptado de Abadie et al., 2011(24).

Aproximadamente 30% a 40% da população caucasiana detém o haplótipo HLA-DQ2, contudo a prevalência da DC é cerca de 1%, sugerindo que a predisposição genética seja importante, mas não suficiente para o desenvolvimento da doença. Essa prevalência sofre importantes diferenças regionais, cujas razões permanecem desconhecidas (1) (25) (26) (27).

Segundo dados do Relatório BIANUAL sobre os mercados globais de alimentos de outubro de 2015 da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO) o uso estimado do trigo por habitante para 2014 /2015 nos países em desenvolvimento foi de 60,1 kg/ano e nos países desenvolvidos de 96,8 Kg / ano, sendo na Europa de 110,4 Kg/ano e nos Estados Unidos de 82,3 Kg/ano (28).

Embora países como Suécia, Finlândia, Itália, Irlanda do Norte e Alemanha compartilhem uma distribuição semelhante nos níveis de ingestão de glúten e na frequência dos alelos de susceptibilidade genética (HLA-DQ2 e DQ8), apresentam uma prevalência diferente, 3%, 2%, 1,2%, 0,9% e 0,3% respectivamente, sugerindo que outros fatores ambientais e ou genéticos podem afetar significativamente o resultado da patologia (21)(25)(23). A prevalência da DC em países povoados por

indivíduos de origem europeia, como por exemplo, Austrália (0,4%) e Nova Zelândia (1,2%) em grande parte se sobrepõe com dados europeus e americanos (29) (30).

A doença celíaca é uma desordem comum em países do Oriente Médio, Índia e Norte da África, embora as taxas de diagnóstico permaneçam baixas (21) (29). No Oriente Médio a prevalência varia entre 0,8% no Irã e 1% na Turquia e em Israel (31) (32) (33). A utilização estimada de trigo por habitante entre 2014/2015 no Irã foi de 168,3 kg/ano e de 209,0 Kg/ano na Turquia (28).

O conhecimento epidemiológico da DC no continente asiático é bastante limitado, sendo sua frequência maior no norte da Índia, no chamado cinturão celíaco, região que consome maior quantidade de trigo e que apresenta elevada frequência do alelo HLA-DQ2 (30). Makharia e colaboradores encontraram uma prevalência de 1,04% em um estudo populacional no norte da Índia, semelhante a prevalência europeia (34). Atualmente, o número de casos de doença celíaca relatados na China é extremamente baixo. No norte da China o glúten é bastante consumido e a frequência dos alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 encontrado em um estudo recente foi de 18,4% e 8%, respectivamente (35). No entanto, estudos epidemiológicos são necessários para quantificar o impacto desta condição neste país.

Devido à baixa frequência de HLA-DQ2 e o baixo consumo de trigo é provável que a DC seja rara no Japão, na Indonésia, na Coreia, nas Filipinas e em muitas ilhas menores do Pacífico (21). Dados da FAO estimam que entre 2014/2015 o uso do trigo por habitante foi de 42,1 kg/ano, 21,4 kg/ano, 47,5 kg/ano e 23,3 kg/ano nestes 4 países citados anteriormente (28).

Na África a frequência do HLA-DQ2 é mais elevada nas populações do Norte como Saharawi (39%), Líbia (34%), Argélia (28,3%), Marrocos (25%) e Tunísia (23,4%) que consomem uma dieta rica em glúten (36) (37) (38); diferente das populações subsaarianas cuja frequência do alelo HLA-DQ2 e o consumo de trigo são baixos (23). Segundo a FAO o uso estimado de trigo por habitante foi de 211,1 kg/ano na Tunísia, 208,0 Kg/ano na Argélia e 200,1 kg/ano no Marrocos. Já nos países da África subsaariana como Etiópia e Nigéria foi de 40 kg/ano e 20 kg/ano, respectivamente (28).

A maior prevalência de DC no mundo foi descrita em uma população africana que originalmente vivia no Saara Ocidental, o Saharawi, de origem árabe-berbere e que atualmente vive na Argélia. Em 1998 Catassi e colaboradores avaliaram 989 crianças saharawi através de testes sorológicos e biópsia intestinal com cápsula de

Watson. Surpreendentemente encontraram uma prevalência de 5,6%, quase cinco vezes maior do que na maioria dos países europeus (39). Níveis altos de consanguinidade, altas frequências de HLA-DQ2 associada a mudança na dieta tradicional saharawi através da introdução precoce e em grande quantidade de trigo podem explicar em parte esta prevalência (36). Contrariamente em Burkina Faso, o consumo de trigo é quase desprezível e a prevalência de DC é praticamente nula (40).

Alguns países da América do Sul têm realizado estudos epidemiológicos sobre a doença celíaca. No Brasil, a prevalência entre doadores de sangue variou de 1: 681 (0,15%) em Brasília (41) a 1: 214 (0,47%) em São Paulo (42). Porém estes indivíduos representam o segmento mais saudável da população e tendem a subestimar a prevalência de DC. Estudos de rastreamento da população geral brasileira evidenciaram uma prevalência de 1:119 (0,84%) em adultos no Recife e de 1:275 (0,36%) em Brasília, sendo que a prevalência entre os menores de 15 anos foi 2,6 vezes maior que nos adultos, compreendendo taxas de 1:184 (0,54%) e 1:474 (0,21%) respectivamente, indicando que a doença celíaca não é rara no Brasil (43) (44). A região Sul do país apresenta muitos imigrantes caucasianos europeus enquanto as regiões norte e nordeste têm grandes influências ameríndias e africanas (45). Almeida RC e colaboradores não encontraram nenhum caso de DC em descendentes de africanos subsaarianos, residentes em comunidades quilombolas no Brasil, sugerindo uma baixa prevalência da DC nesta população (46).

Estudos em pacientes celíacos realizados nas regiões Nordeste, Centro Oeste e Sul do país revelaram uma frequência dos HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8 de 93,1%, 94,5% e 98,4% respectivamente (47) (48) (49). Houve predomínio do HLA-DQ2 nos três estudos (75,6%, 75% e 79,7% respectivamente) em comparação com HLA-DQ8 (17,8%, 4,2% e 8,1% respectivamente). Entretanto a distribuição das frequências do HLA-DQ2 foi diferente da encontrada nas populações europeias, onde mais de 90% dos celíacos transportam o heterodímero DQ2 (1). Segundo FAO o uso estimado de trigo por habitante para 2014 /2015 no Brasil foi de 51,4 Kg/ano (28).

Na Argentina foi encontrada uma prevalência de 1:167 (0,6%) em uma amostra de 2000 adultos (50) enquanto Mora e colaboradores evidenciaram uma prevalência de 1:79 (1,2%) em uma população pediátrica (51). Esta alta prevalência pode estar correlacionada com a elevada frequência do HLA-DQ8 (> 20%) associado a um consumo de trigo de 117,5 Kg/ano (52) (28).

Em países como Chile, Uruguai, e Venezuela a prevalência é incerta e na Colombia aparentemente a DC é pouco frequente (53).

Pesquisas baseadas em rastreios sorológicos da população geral na Europa e nos Estados Unidos, têm demonstrado aumento tanto da incidência como da prevalência da DC nas últimas décadas (54). Entre 1990 a 2009 a Escócia registrou um aumento na incidência da DC de 6,4 vezes (55). Catassi et al relataram um aumento de cinco vezes na prevalência da DC entre 1974 a 1989 nos Estados Unidos (56). Entre 2000 a 2010 Ludvigsson e colaboradores evidenciaram uma incidência seis vezes maior da DC em uma população norte-americana (57). Fatores ambientais como por exemplo mudanças na quantidade e qualidade do glúten ingerido, padrões de alimentação infantil, espectro de infecções intestinais, colonização da microbiota intestinal, entre outros, podem ser responsáveis por essas mudanças ao longo do tempo (21) (58).

Entretanto a DC permanece altamente subdiagnosticada, mesmo em países onde há tradicionalmente um grande conhecimento sobre esta patologia. Para cada caso de DC clinicamente diagnosticado nos países desenvolvidos, uma média de 5 a 10 casos permanecem não diagnosticados, representando a parte submersa do “iceberg celíaco”, geralmente por causa de queixas atípicas ou mesmo ausentes. Estes casos não diagnosticados permanecem não tratados e, portanto, estão expostos ao risco de complicações a longo prazo (21) (59) (25).

2.3 ETIOPATOGENESE DA DOENÇA CELÍACA

A doença celíaca é uma desordem complexa de etiologia multifatorial que resulta da interação entre fatores ambientais, imunológicos e genéticos. O glúten é o único fator ambiental conhecido como desencadeador de resposta imunológica na doença celíaca. É um composto proteico presente principalmente no trigo, mas também encontrado na cevada, centeio e aveia. Estes grãos pertencem à mesma família (Poaceae), subfamília (Pooideae) e compartilham a mesma origem ancestral. No entanto, trigo, centeio e cevada fazem parte da tribo Triticeae e a aveia da tribo Aveneae (60). (Figura 2)

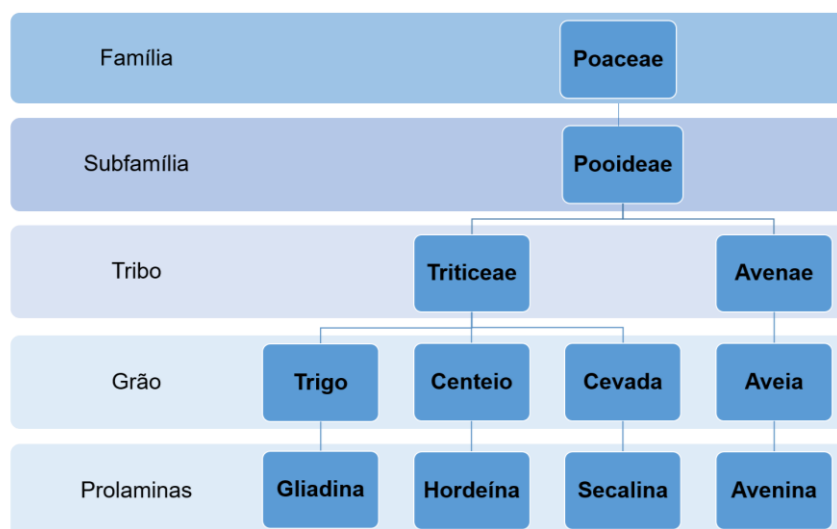


Figura 2 – Família, subfamília e a tribo dos grãos. O trigo, o centeio, a cevada e a aveia pertencem à mesma família de grãos (Poaceae) e à subfamília (Pooideae). No entanto, pertencem a tribos distintas: trigo, centeio e cevada (Triticeae) e Aveia (Avenae). Adaptado de Kupfer et al., 2012 (60).

As frações proteicas do trigo são formadas pela prolamina gliadina, solúvel em álcool e pela glutenina insolúvel em álcool (61). Na cevada, centeio e aveia as prolaminas são denominadas, secalina, hordeína e avenina, respectivamente. As prolaminas da tribo triticeae contêm altos teores de prolina e glutamina, o que as tornam mais resistentes à degradação pelas enzimas gástrica, pancreática e intestinal, resultando em uma grande variedade de peptídeos, divididos em dois grupos (60). Os peptídeos tóxicos capazes de induzir danos na mucosa intestinal e os peptídeos imunogênicos que estimulam os linfócitos T CD4. A gliadina é uma cadeia polipeptídica simples, dividida em quatro grupos principais α , β , γ e ω gliadina, de acordo com a sua mobilidade eletroforética (61).

Os peptídeos de gliadina podem atravessar o epitélio intestinal via paracelular através das junções celulares (*tight junctions* – TJ), em consequência de uma liberação acentuada de zonulina após a ligação de peptídeos de gliadina ao receptor 3 de quimiocina (receptor CXCR3) aumentando a permeabilidade da mucosa intestinal; via transcitose ou via retrotranscitose mediada por imunoglobulina A através do receptor CD71 também chamado receptor de transferrina presente na superfície luminal de células epiteliais intestinais (52). Os peptídeos tóxicos de gliadina, desencadeiam uma resposta imune inata, caracterizada pela produção de interleucina 15 (IL-15) por células epiteliais e células dendríticas da lâmina própria

(62). A expressão exacerbada de IL-15 induz um aumento no número de linfócitos intraepiteliais (LIE), que é característico da doença celíaca. Esta citocina regula a expressão de receptores como o NKG2D (*C-type lectin-like activating immunoreceptor*) e de seus ligantes MICA (*MHC class I chain-related gene A*) nos enterócitos, resultando na apoptose destes enterócitos (63).

A alfa gliadina é o peptídeo mais imunogênico presente no glúten e ao atravessar o epitélio intestinal, liga-se à enzima transglutaminase tecidual (tTG) (52). Nesta ligação ocorre o processo de desaminação, onde radicais amina são retirados de moléculas de glutamina transformando-se em ácido glutâmico cuja carga negativa confere grande afinidade de acoplamento com os epítomos dos alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 expressos na membrana celular das células apresentadoras de antígenos (*Antigen Presenting Cells - APC*) (24). (Figura 3)

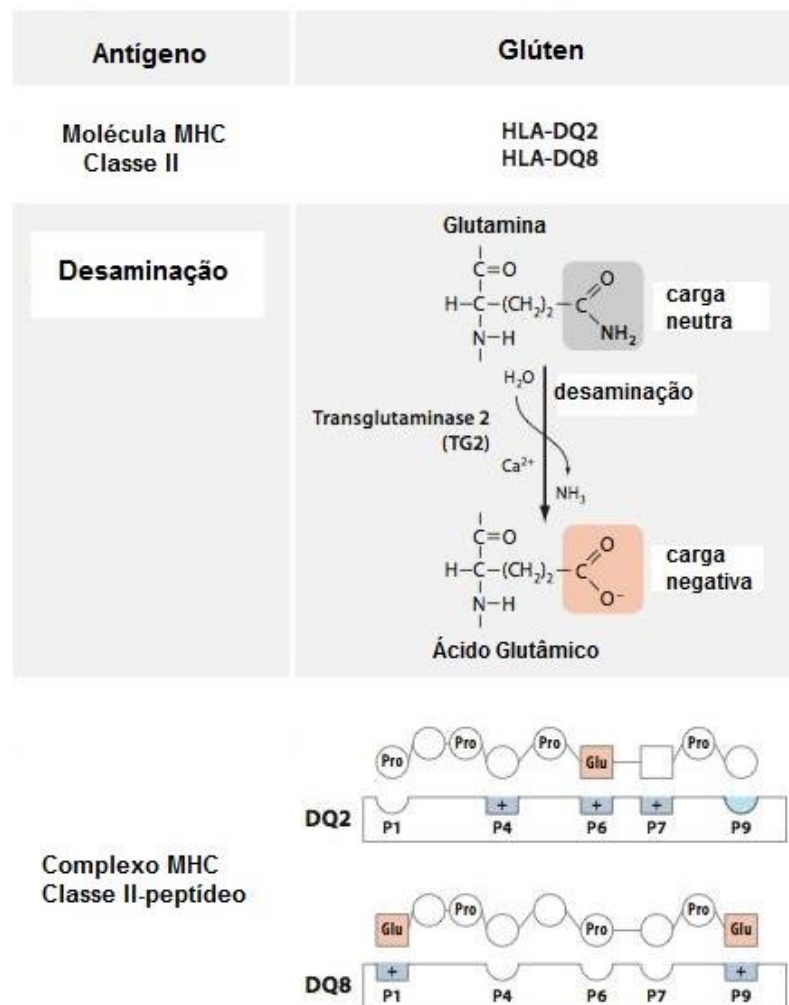


Figura 3 - Processo de desaminação. A enzima transglutaminase 2 ao retirar radicais amina da glutamina a transforma em ácido glutâmico cuja carga negativa confere maior afinidade às moléculas HLA-DQ2 ou HLA-DQ8. Adaptado de Abadie et al., 2011 (24).

Os peptídeos do glúten, após sofrerem desaminação, são reconhecidos pelas APCs e apresentados, através das moléculas HLA-DQ2 e ou DQ8 a células T CD4+, promovendo sua ativação e desencadeando dois tipos de resposta. Uma resposta do tipo T helper 1 (Th1) com produção de citocinas inflamatórias como interferon gama (INF γ) , e fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor Alpha* - TNF α). As citocinas Th1 promovem a citotoxicidade aumentada de LIE ou das células T natural killer (NK) induzindo a morte apoptótica dos enterócitos pelo sistema ligando Fas / Fas (FasL), via perforina-granzima induzida pela IL-15 ou através da via NKG2D-MICA. Além disso, o TNF α induz a secreção de metaloproteinases de matriz pelos fibroblastos intestinais, causando atrofia das vilosidades e hiperplasia de criptas, características da DC (52) (24).

Na resposta do tipo T helper 2 (Th2) temos a ativação e expansão clonal dos linfócitos B que se diferenciam em plasmócitos produtores de anticorpo antitransglutaminase, anti gliadina desaminada e antiendomísio. A interação entre a molécula de transglutaminase tecidual ligada à membrana celular e o anticorpo anti-tTG pode induzir mudanças no citoesqueleto do enterócito com conseqüente lesão no epitélio intestinal (52) (24). (Figura 4)

Embora não se conheça com exatidão o papel de outros fatores ambientais na patogênese da DC, reconhece-se que a microbiota pode afetar a homeostase imune intestinal e a saúde das células epiteliais. Ela compreende bactérias que promovem respostas imunitárias reguladoras e bactérias que promovem respostas imunes inflamatórias (2). Alguns estudos demonstraram uma redução de bactérias produtoras de butirato (*Faecalibacterium prausnitzii*) e representantes do gênero *Bifidobacterium* em doentes com doença celíaca, assim como aumento de bactérias potencialmente patogênicas tais como *Escherichia coli* e *Staphylococcus spp* (64) (65). Estudos adicionais são necessários para avaliar se a disbiose pode constituir um gatilho para a perda de tolerância ao glúten ou se é conseqüência da presença de um ambiente inflamatório (2).

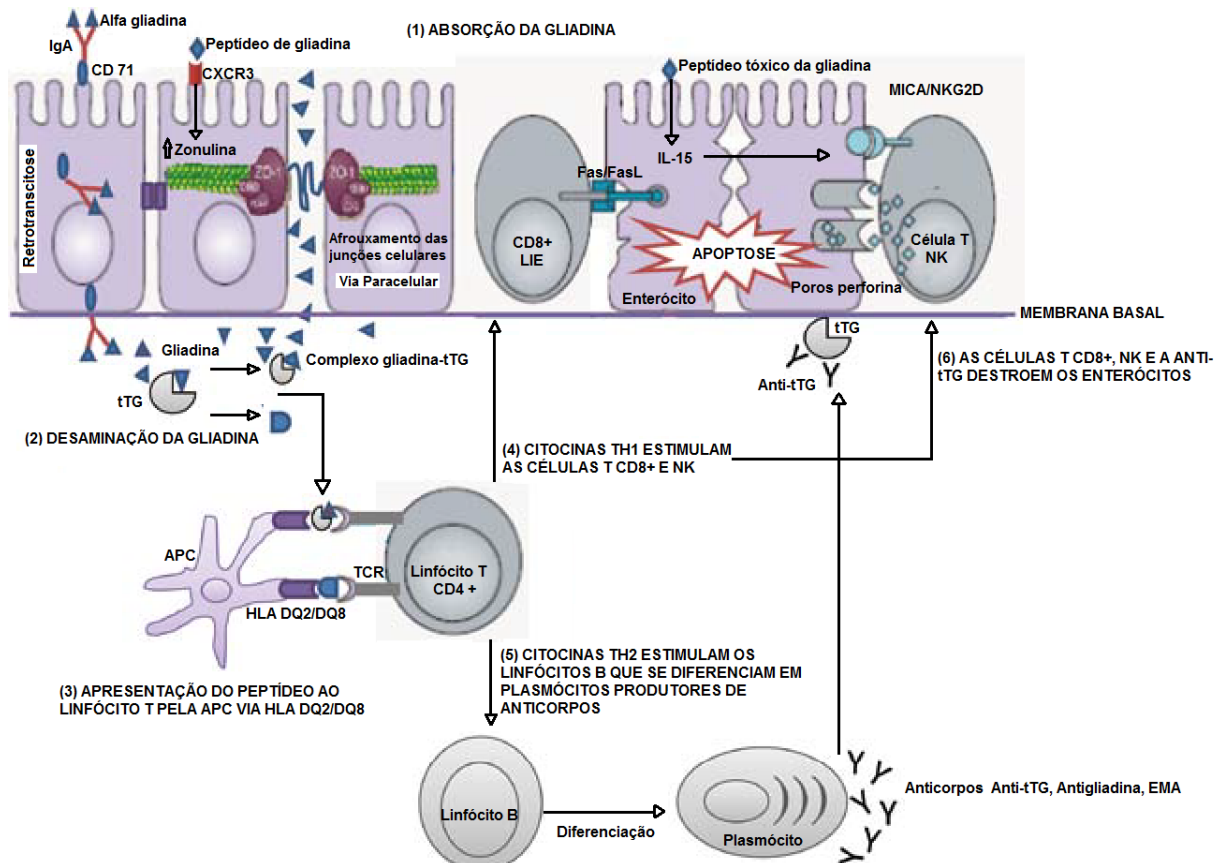


Figura 4 - Mecanismos da lesão mucosa na doença celíaca. Os péptidos de gliadina atravessam o epitélio intestinal. A transglutaminase tecidual (tTG) desamina a gliadina que é então reconhecida por moléculas HLA-DQ2 / DQ8 da célula apresentadora de antigénio (*Antigen Presenting Cells* = APC). A APC apresenta o peptídeo às células T CD4+ desencadeando respostas T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2). TCR: receptor de células T; anti-tTG: anticorpo antitransglutaminase; EMA: anticorpo antiendomísio. Adaptado de Gujral et al.,2012 (52).

As infecções virais, em particular por enterovírus, tais como as infecções por rotavírus, têm sido apontadas como responsáveis pelo aumento da incidência de algumas doenças autoimunes, como doença celíaca e diabetes tipo 1 (2) (66). Estudos têm apontado um aumento da produção de interferon tipo I após infecções virais e bacterianas. Como esta citocina tem propriedade imunestimuladora poderia estar envolvida no desencadeamento de distúrbios autoimunes. Estudos futuros irão estabelecer o papel desempenhado por este e outros fatores na patogênese da doença celíaca (2)

Outro tema bastante discutido é o papel do aleitamento materno na doença celíaca. O leite materno pode prevenir de forma independente as infecções intestinais, modular a microbiota intestinal, aumentar o número de bifidobactérias e aumentar os mecanismos de tolerância oral através de várias moléculas imunomoduladoras,

oferecendo uma elevada plausibilidade biológica para a interpretação de um efeito protetor sobre doenças imunomediadas tais como DC (67). Um estudo recente revelou que o leite de mães com DC têm concentrações reduzidas de compostos imunoprotetores (fator de crescimento transformante $\beta 1$ e imunoglobulina IgA secretora) e bifidobactérias em comparação ao leite de mães saudáveis, o que poderia presumivelmente diminuir os efeitos protetores da amamentação sobre o risco futuro da criança de desenvolver DC (68).

Entretanto há controvérsias sobre o efeito protetor do aleitamento materno e a verdadeira influência da alimentação precoce no desenvolvimento da DC. Lionetti e colaboradores concluíram que nem a introdução tardia do glúten nem a amamentação modificaram a ocorrência da doença celíaca entre crianças de risco, embora a introdução tardia do glúten, a partir dos 12 meses, estivesse associada a um início tardio da doença o que poderia reduzir seu efeito negativo em órgãos vulneráveis, como o cérebro (69).

As atuais recomendações da ESPGHAN afirmam que embora a amamentação tenha benefícios bem estabelecidos para a saúde, nem a amamentação nem a introdução do glúten durante a amamentação demonstraram reduzir o risco de DC. Sendo assim o glúten poderia ser introduzido na dieta da criança entre 4 e 12 meses completos de idade. Em crianças com alto risco de DC, a introdução precoce de glúten (4 versus 6 meses ou 6 versus 12 meses) está associada ao desenvolvimento precoce de autoimunidade da DC (definida como sorologia positiva) e DC. Com base em dados observacionais, o consumo de grandes quantidades de glúten deve ser evitado durante as primeiras semanas após sua introdução e durante a infância. No entanto, as quantidades adequadas de glúten a serem introduzidas no desmame não foram estabelecidas (70). A Sociedade Brasileira de Pediatria recomenda aleitamento materno exclusivo até os 6 meses. A partir do sexto mês de vida, deve-se introduzir a alimentação complementar, mantendo-se o aleitamento materno até os 2 anos de idade ou mais (71).

2.3.1 Fatores Genéticos

A DC tem etiologia multifatorial com genética complexa. Estudos epidemiológicos demonstram prevalência de DC de até 20% nos familiares de primeiro grau de pacientes celíacos e taxa de concordância de 75% em gêmeos monozigóticos e 10% em gêmeos dizigóticos, indicando um componente genético (60) (72) (73).

Os genes do complexo HLA são responsáveis por 40% da herdabilidade genética e estão presentes em quase todos os indivíduos celíacos tornando o diagnóstico desta nosologia muito difícil na sua ausência (24). O termo antígeno leucocitário humano (do inglês *Human Leukocyte Antigen* - HLA) é o nome do Complexo de Histocompatibilidade Principal (do inglês *Major Histocompatibility Complex* - MHC) em humanos. A região HLA está localizada no braço curto do cromossomo 6 (*locus* 6p21.3) e se divide em três classes: I, II e III (60). O HLA-DQ é uma molécula de classe II formada por duas cadeias diferentes (α e β), produzidas de forma independente. Isto significa que, para poder formar cada heterodímero, será necessária a presença de dois genes (HLA DQA e HLA DQB) (60). (Figura 5)

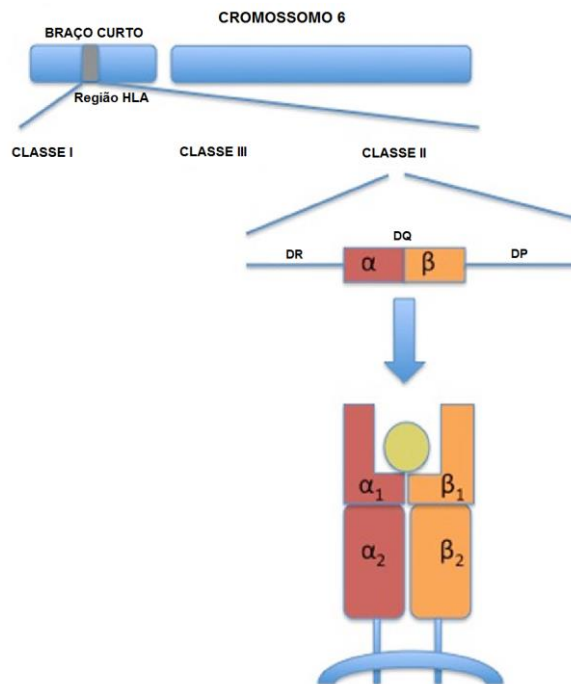


Figura 5 - Localização do HLA no cromossomo 6. Cadeias alfa e beta do HLA-DQ. *Adaptado de Kupfer et al., 2012(60)*

A suscetibilidade genética para DC está fortemente associada aos heterodímeros HLA-DQ2 e HLA-DQ8. Mais de 95% dos celíacos codificam o heterodímero DQ2 (*DQA1*0501, DQB1*0201*) tanto na sua conformação *cis* quando ambos genes estão localizados no mesmo cromossomo, representados pelo haplótipo DR3-DQ2, quanto na conformação *trans* (genes presentes em cromossomos diferentes) representada pelos haplótipos DR5 DQ7 e DR7 DQ2 (1) (24). (Figura 6)

Aproximadamente metade dos casos restantes expressam o DQ8 (*DQA1*0301, DQB1*0302*) geralmente herdado em *cis* no haplótipo DR4 (1) (60). No entanto, 30% a 40% da população mundial detém o haplótipo DQ2, mas apenas 1% desenvolvem a doença, sugerindo que o HLA é importante, mas não suficiente para o desenvolvimento da doença celíaca (1).

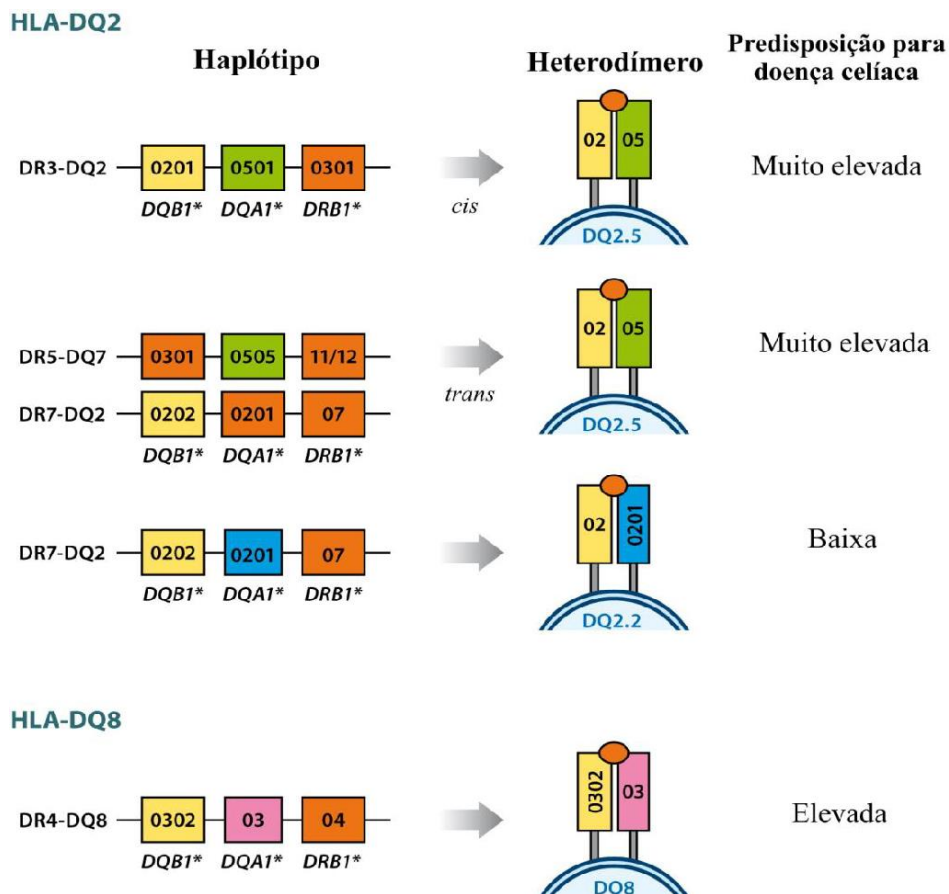


Figura 6 - Associações de antígenos leucocitários humanos (HLA) na doença celíaca (DC). O HLA-DQ2 é o fator de risco genético mais forte associado com DC. O HLA-DQ2.2 é uma variante da molécula HLA-DQ2 com risco muito baixo para DC isoladamente. Adaptado de Abadie et al., 2011(24).

Cada alelo HLA predisponente para DC confere um risco diferente para seu desenvolvimento dependendo da combinação destes alelos. Megiorni e colaboradores após análise de uma população italiana constataram que a presença do HLA-DQ2 (*DQA1*05* e *DQB1*02*) e HLA-DQ8 (*DQA1*03* e *DQB1*03:02*) conferem o maior risco para desenvolvimento de DC (1:7), ao passo que indivíduos sem todos os fatores predisponentes têm um menor risco (1:2518) (74).

Com o surgimento dos estudos de associação genômica ampla (*Genome-wide Association Studies* - GWAS), foi possível a identificação de aproximadamente 64 genes de 40 regiões genômicas não HLA envolvidos na DC. Esse tipo de estudo utiliza métodos de genotipagem por microarranjos para identificar diversos loci em doenças complexas, como DC e outras doenças autoimunes. Alguns loci de susceptibilidade para DC são compartilhados com outras condições autoimunes tais como diabetes mellitus tipo 1 e artrite reumatóide, sugerindo uma sobreposição do mecanismo genético entre elas. O impacto individual de cada uma dessas regiões genômicas não HLA sobre a susceptibilidade à doença celíaca é pequeno, sendo que em conjunto essas regiões explicam apenas cerca de 5% da herdabilidade genética. Aproximadamente 50% da herdabilidade ainda carece de melhor esclarecimento. Os genes não HLA atuam em diversas áreas da cascata imunológica como por exemplo codificando citocinas, quimiocinas e seus receptores, regulando a ativação de células T, entre outras (24).

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA CELÍACA

A doença celíaca é uma desordem sistêmica complexa que afeta indivíduos de todas as faixas etárias. De acordo com as características clínicas, histológicas e sorológicas presentes no momento do diagnóstico, a DC tem sido classificada na forma clássica ou típica, atípica, silenciosa ou assintomática, latente e potencial, representadas pelo “Iceberg celíaco” (75). (Figura 7)

A ponta do iceberg, acima da superfície representa os casos clássicos e a maior parte que se encontra submersa é constituída pelas formas clínicas com pouco ou nenhum sinal e sintoma característico da DC, com ou sem alteração histológica, mas com predisposição genética através dos HLA-DQ2 ou HLA-DQ8.

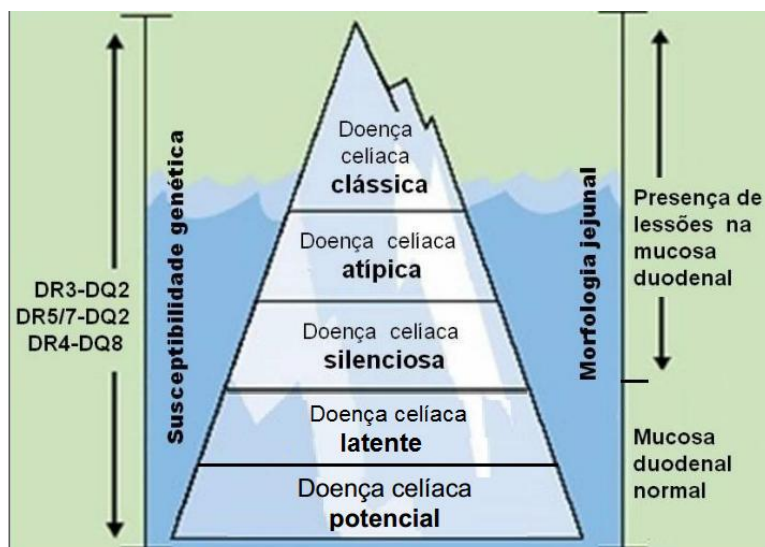


Figura 7 - O iceberg da doença celíaca. Adaptado de Mäki, 1997.

A forma clássica ou típica ocorre geralmente entre 6 e 18 meses de idade, após a introdução do glúten na dieta. Os pacientes apresentam diarreia crônica, esteatorréia, vômitos, anorexia, distensão e dor abdominal, flatulência, irritabilidade, perda pondero-estatural, edema por hipoproteinemia e desnutrição. O panículo adiposo e a massa muscular também reduzem, os músculos ficam hipotônicos, os cabelos secos e quebradiços e a pele se torna xerótica. O comprometimento do intestino delgado proximal decorrente da inflamação da mucosa e posterior atrofia vilositária causando uma síndrome de má absorção pode resultar na depleção de ferro, cálcio, vitaminas lipossolúveis e zinco (75) (76).

Além da presença dos sintomas clínicos clássicos, este grupo apresenta anticorpos antitransglutaminase e antiendomísio positivos e alterações histológicas características, como hiperplasia de cripta e atrofia vilositária e genótipo HLA predisponente (77).

Na forma atípica o início dos sintomas tende a ser mais tardio, acometendo crianças entre 5 e 7 anos de idade, adolescentes e adultos. Alguns pacientes podem referir sintomas gastrointestinais discretos como distensão abdominal, náuseas, vômitos e constipação. Entretanto os sintomas extraintestinais são os mais frequentes destacando-se a anemia ferropriva, anemia por deficiência de vitamina B12 ou ácido fólico, osteopenia, retardo no crescimento ou no desenvolvimento puberal, hipoplasia do esmalte dentário, estomatite aftosa, dermatite herpetiforme, ataxia, epilepsia, cefaléia, artralgia, artrite, miopatias, manifestações psiquiátricas, elevação das

aminotransferases, infertilidade, aborto de repetição (75) (76) (78). Os pacientes apresentam marcadores sorológicos positivos, biópsia com alterações de graus variados, muitas vezes com atrofia vilositária e genética compatível com DC (1).

No último consenso da ESPGHAN foi acordado o uso da nomenclatura sinais e sintomas gastrointestinais e extraintestinais no lugar de sintomas clássicos e atípicos, uma vez que as manifestações atípicas podem ser consideravelmente mais comuns do que os sintomas clássicos. Por outro lado, as definições de DC silenciosa, latente e potencial ainda são válidas.

A DC silenciosa é definida pela presença de alelos HLA predisponentes, sorologias positivas e achados histológicos compatíveis com DC, mas sem sinais e sintomas que justifiquem uma suspeita clínica (1). A maioria dos casos são identificados através de programas de rastreamento populacional envolvendo indivíduos aparentemente saudáveis e rastreamento de grupos de risco. Entretanto uma anamnese detalhada pode revelar sintomas sutis como irritabilidade, fadiga relacionados com a DC que melhoram após o início do tratamento (75) (76) (79).

A DC na sua forma latente se caracteriza pela presença de alelos HLA predisponentes e mucosa intestinal normal em paciente que já apresentou uma enteropatia dependente de glúten em algum momento da sua vida. O indivíduo pode ou não ter sintomas e sorologia positiva (1).

Finalmente a forma potencial é definida pela presença de sorologia positiva e predisposição genética, mas sem anormalidades histológicas em biópsias duodenais. O paciente poderá apresentar sinais e sintomas ou desenvolver uma enteropatia dependente de glúten mais tarde (1).

2.5 DIAGNÓSTICO DA DOENÇA CELÍACA

Segundo as novas diretrizes o diagnóstico da DC depende das manifestações clínicas glúten dependentes, quando presentes; da presença de testes sorológicos positivos; da presença de genes *HLA-DQ2* e ou *HLA-DQ8* predisponentes; das anormalidades histopatológicas na biópsia intestinal e da resposta clínica após dieta isenta de glúten (1). A DC deve ser investigada nas crianças e adolescentes com sinais e sintomas gastrointestinais ou extraintestinais sugestivos e em indivíduos assintomáticos pertencentes a grupos de risco como parentes de primeiro grau de

celíacos, indivíduos com doenças autoimunes associadas à DC como DM1, doença autoimune da tireoide, síndrome de Down, Turner ou Williams, entre outros (1).

2.5.1 Testes Sorológicos

Na década de 1980 foram identificados anticorpos específicos circulantes no soro de pacientes celíacos não tratados, permitindo o desenvolvimento dos testes sorológicos (9). Inicialmente utilizou-se o anticorpo antigliadina que se tornou obsoleto devido a sua baixa sensibilidade e especificidade, sendo posteriormente substituído pelo anticorpo antigliadina deamidada (anti-DGP) que mostrou maior sensibilidade e especificidade, 94% e 99% respectivamente, sendo utilizado em situações especiais (80).

Atualmente os principais testes sorológicos usados no rastreio da DC são a antitransglutaminase IgA (anti-tTG IgA) e o antiendomísio IgA (EMA IgA). O primeiro é um exame quantitativo de alta sensibilidade (98%) e especificidade (97%), de fácil manuseio e menor custo realizado através da técnica imunoenzimática ELISA (80). Este marcador sorológico também é útil durante o acompanhamento do paciente celíaco, para detectar possíveis transgressões à dieta.

O segundo é um teste manual, observador dependente realizado por imunofluorescência indireta que detecta os anticorpos antiendomísio entre as miofibrilas da camada muscular lisa em cortes de esôfago de macaco ou do cordão umbilical humano, utilizados como substrato antigênico. Quando o EMA é positivo, observa-se através do microscópio um rendilhado em favo de mel de coloração verde brilhante (Figura 8). Por isso é mais caro do que os testes automatizados. Apesar destas limitações quando bem interpretado por observador experiente apresenta sensibilidade e especificidade próximas a 100%, sendo considerado um exame de alto valor preditivo positivo (VPP) (1) (80) (81).

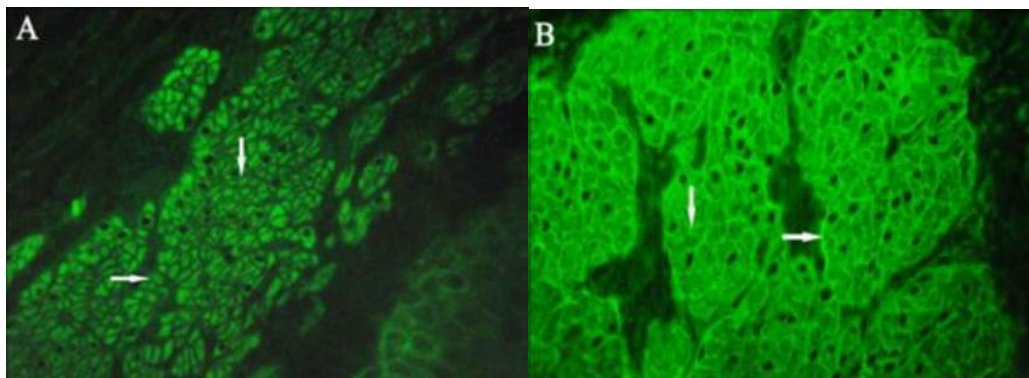


Figura 8 – Teste antiendomísio IgA. Secção criostática de 4 micrômetros de espessura do terço inferior do esôfago de primata (Macaco Rhesus) fixado em lâmina para realização de teste de imunofluorescência indireta para detectar a presença de anticorpos da classe IgA antiendomísio (EMA-IgA). A) EMA-IgA Negativo: ausência de fluorescência (seta). B) EMA-IgA positivo: fluorescência de cor verde brilhante em forma de rendilhado ou favo de mel no tecido conjuntivo que envolve cada fibra do feixe da musculatura lisa (seta). Imagem cedida pelo Laboratório de Pesquisa em Doença Celíaca-FM-UnB.

2.5.2 Análise Histológica de Biópsias Duodenais

O papel principal da histologia no diagnóstico da DC tem sido questionado por várias razões. A atrofia vilositária não é um achado patognomônico da DC, podendo estar presente em diversas patologias como infecções parasitárias, giardíase, entre outras (82). As características histológicas do intestino delgado na DC são extremamente variáveis quanto ao grau de gravidade e as lesões podem estar limitadas a pequenas áreas ou até mesmo restritas ao bulbo duodenal. Além disso, a interpretação deste exame depende da coleta e preparação adequada das amostras e está propensa a uma alta variabilidade interobservador (1) (83).

Durante a endoscopia digestiva alta (EDA) realiza-se a biópsia do bulbo duodenal e da segunda ou terceira porção duodenal com retirada de 1 e 4 fragmentos respectivamente. O relatório do patologista deve incluir uma descrição da orientação, presença ou não de vilosidades normais ou grau de atrofia e alongamento das criptas, relação entre vilosidade-cripta, número de linfócitos intraepiteliais (LIE) e a classificação segundo Marsh-Oberhuber (1).

2.5.3 Classificações Histológicas

Michael Marsh desenvolveu a primeira classificação histológica sobre a enteropatia da DC em 1992. As anormalidades vistas na mucosa intestinal foram classificadas em Marsh 0 (padrão pré-infiltrativo) fragmentos sem alterações histológicas, considerado normal; Marsh 1 (padrão infiltrativo) aumento dos LIE acima de 40 linfócitos por 100 enterócitos; Marsh 2 (padrão hiperplásico) aumento dos LIE e hiperplasia de criptas; Marsh 3 (padrão destrutivo) aumento de LIE, hiperplasia de criptas e graus variáveis de atrofia vilositária e Marsh 4 (padrão hipoplásico) caracterizado por atrofia vilositária total com hipoplasia de cripta (19) (84).

A classificação de Marsh foi modificada por Oberhuber, subdividindo o Marsh 3 de acordo com a altura das vilosidades em Marsh 3A, atrofia parcial; Marsh 3B atrofia subtotal e Marsh 3C atrofia total. Na classificação de Marsh-Oberhuber o padrão hipoplásico (Marsh 4) foi retirado e considera-se aumento de LIE acima de 30 linfócitos por 100 enterócitos (85). (Tabela 1 e Figura 9)

Tabela 1 - Classificação de Marsh-Oberhuber

CLASSE	DENOMINAÇÃO	DESCRIÇÃO
Marsh 0	Pré-Infiltrativa	Vilosidade e cripta sem alteração. LIE em quantidade normal
Marsh 1	Lesão Infiltrativa	Aumento de LIE \geq 30 por 100 enterocitos
Marsh 2	Lesão hiperplásica	Aumento de LIE e hiperplasia de cripta
Marsh 3 A	Lesão Destrutiva	Aumento de LIE, hiperplasia de cripta e atrofia vilositária discreta
Marsh 3 B		Aumento de LIE, hiperplasia de cripta e atrofia vilositária parcial
Marsh 3 C		Aumento de LIE, hiperplasia de cripta e atrofia vilositária total

Adaptado de Bao et al; 2012 (82).

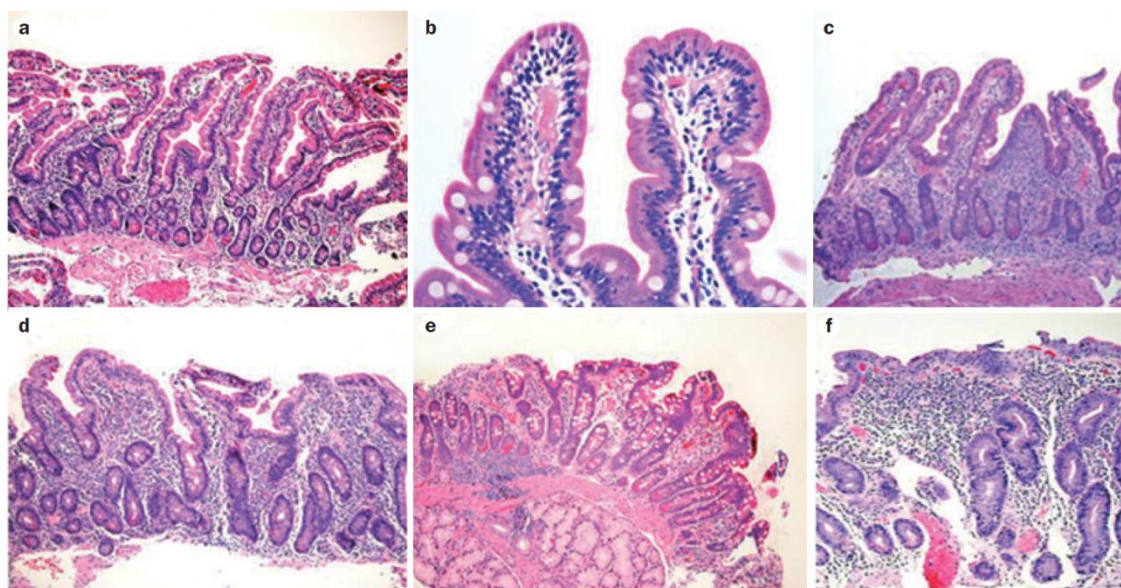


Figura 9 - Características histológicas da doença celíaca. A e B vilosidade normal e aumento de linfócitos intra-epiteliais (LIE); C Hiperplasia de cripta; D atrofia vilositária discreta, E atrofia vilositária parcial e F atrofia vilositária total (86).

2.5.4 Testes Genéticos

A doença celíaca apresenta uma forte predisposição genética associada principalmente ao HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (1). Os genes que codificam o heterodímero DQ2 são expressos por mais de 95% dos pacientes com diagnóstico de DC, enquanto aproximadamente metade dos casos restantes expressam o DQ8 (1) (87).

A ausência do HLA-DQ2 e HLA-DQ8 tem um alto valor preditivo negativo para o diagnóstico de DC, isto é, a chance de um indivíduo que não apresenta esses genes desenvolver DC é extremamente baixa, enquanto que a presença desses marcadores tem um valor preditivo positivo baixo, tendo em vista que 30% a 40% da população caucasiana detém o haplótipo HLA-DQ2, mas apenas 1% desenvolve a doença (88). A tipagem do HLA deve ser realizada em pacientes com diagnóstico incerto de DC, como por exemplo, em pacientes com anticorpos específicos negativos e discretas alterações histológicas do intestino delgado (1).

2.5.5 Etapas do Diagnóstico

Na abordagem diagnóstica inicial dos pacientes pediátricos sintomáticos, recomenda-se a pesquisa da anti-tTG IgA e dosagem da IgA sérica. Indivíduos que apresentem níveis baixos de IgA no soro (IgA sérico total < 0,2 g / L), deverão ser submetidos a um teste de anticorpos específicos para DC da classe IgG como por exemplo anti-tTG IgG, antigliadina deaminada IgG (anti-DGP IgG) (1). Entretanto, Pallav e colaboradores relataram que a deficiência parcial de IgA não afeta o desempenho diagnóstico do teste sorológico anti-tTG IgA na triagem para DC (89).

Para a correta interpretação da sorologia deve-se levar em conta o padrão de consumo de glúten. Se a exposição ao glúten for baixa ou inexistente por um longo período (meses a anos), o resultado negativo não é confiável. Os anticorpos anti-DGP podem ser utilizados em pacientes com sorologia convencional negativa (anti-tTG e EMA), mas que apresentam sintomas clínicos altamente sugestivos de DC, especialmente crianças abaixo de 2 anos de idade (9) (1). Um diagnóstico diferencial que deve ser descartado em menores de 2 anos com síndrome disabsortiva é a alergia à proteína do leite de vaca. Portanto, indivíduos que apresentem anti-tTG IgA negativa com IgA sérica normal ou nos casos de deficiência de IgA, anti-DGP IgG negativo, dificilmente terão DC.

Se o resultado da anti-tTG IgA for positiva, estes pacientes devem ser encaminhados ao especialista. Segundo as novas diretrizes, quando a anti-tTG IgA é maior que 10 vezes o limite superior da normalidade (>10 x LSN), devemos solicitar o EMA IgA em uma nova amostra de sangue, evitando um possível falso positivo da amostra anterior e o teste genético (HLA). Estando ambos positivos o diagnóstico de DC poderá ser confirmado sem a necessidade de biópsia duodenal e a dieta livre de glúten instituída.

Caso o EMA IgA seja negativo e o HLA-DQ2 ou DQ8 esteja presente, a biópsia duodenal deverá ser realizada. Pacientes com padrão histológico normal (Marsh 0) ou com aumento dos LIE (Marsh 1), são definidos como casos inconclusivos e devem permanecer sob investigação. Padrão histológico revelando aumento de LIE e hiperplasia de criptas (Marsh 2) ou atrofia vilositária (Marsh 3) recebem o diagnóstico de DC. Se o EMA for positivo e o HLA negativo, considerar biópsia duodenal. No caso de ambos negativos (EMA e HLA), considerar um falso positivo da anti-tTG IgA.

No entanto, quando a anti-tTG IgA for positiva, porém menor que 10 x LSN devemos realizar a endoscopia com biópsias duodenais (1). (Figura 10)

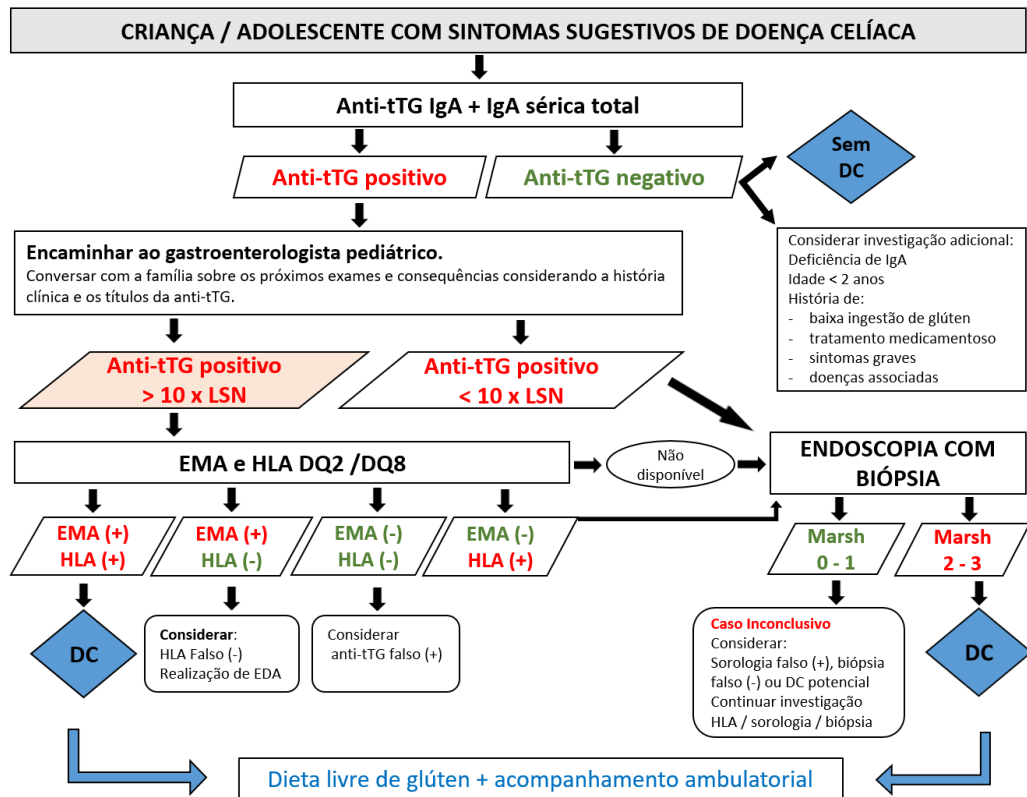


Figura 10 - Fluxograma para o diagnóstico de doença celíaca em paciente que apresentam sintomas sugestivos. Doença celíaca (DC), imunoglobulina A (IgA), antitransglutaminase (anti-tTG), antiendomíseo (EMA), antígeno leucocitário humano (HLA), EDA (endoscopia digestiva alta), limite superior da normalidade (LSN). Adaptado de Husby et al., 2012 (1).

Pacientes assintomáticos pertencentes a grupos de risco devem ser sempre diagnosticados com biópsia duodenal. Neste grupo, a pesquisa inicial dos alelos predisponentes pode excluir de rastreios posteriores aqueles que não abrigam os HLA-DQ2 ou DQ8 (90). Indivíduos com positividade DQ2 ou DQ8 ou sem teste genético, devem dosar a anti-tTG IgA. Os pacientes portadores dos alelos predisponentes que apresentam anti-tTG IgA negativa na ausência da deficiência de IgA não tem DC, porém, poderão desenvolvê-la em outro momento da vida, sendo necessário a realização de testes sorológicos periódicos. O intervalo para as coletas não está bem definido, sendo recomendado um rastreio a cada 2 - 3 anos para evitar os efeitos prejudiciais da DC sobre o crescimento e a saúde óssea (1).

Se a anti-tTG IgA for positiva e maior que 3 vezes LSN, o paciente deve ser encaminhado para realização de endoscopia com biópsia duodenal. Porém quando a anti-tTG IgA for positiva e menor que 3 vezes LSN podemos estar diante de um resultado falso-positivo. Nestes doentes, o EMA pode ajudar a distinguir entre títulos falsos e verdadeiros positivos do anti-tTG. Caso o EMA seja positivo, a probabilidade de DC aumenta devido à alta especificidade deste exame. Nesta situação, o paciente deve ser encaminhado para endoscopia. Pacientes com padrão histológico Marsh 0 ou Marsh 1, são definidos como casos inconclusivos. Devem manter uma dieta normal e seguir em acompanhamento, realizando exames regulares. Aqueles com padrão histológico Marsh 2 ou Marsh 3 recebem o diagnóstico de DC e devem instituir a dieta livre de glúten. Se o EMA for negativo o paciente deve ser acompanhado, mantendo uma dieta normal contendo glúten e o anti-tTG repetido a cada 3 - 6 meses até que os níveis de anticorpos se tornem negativos ou se elevem e seja indicado a realização de uma endoscopia. (Figura 11)

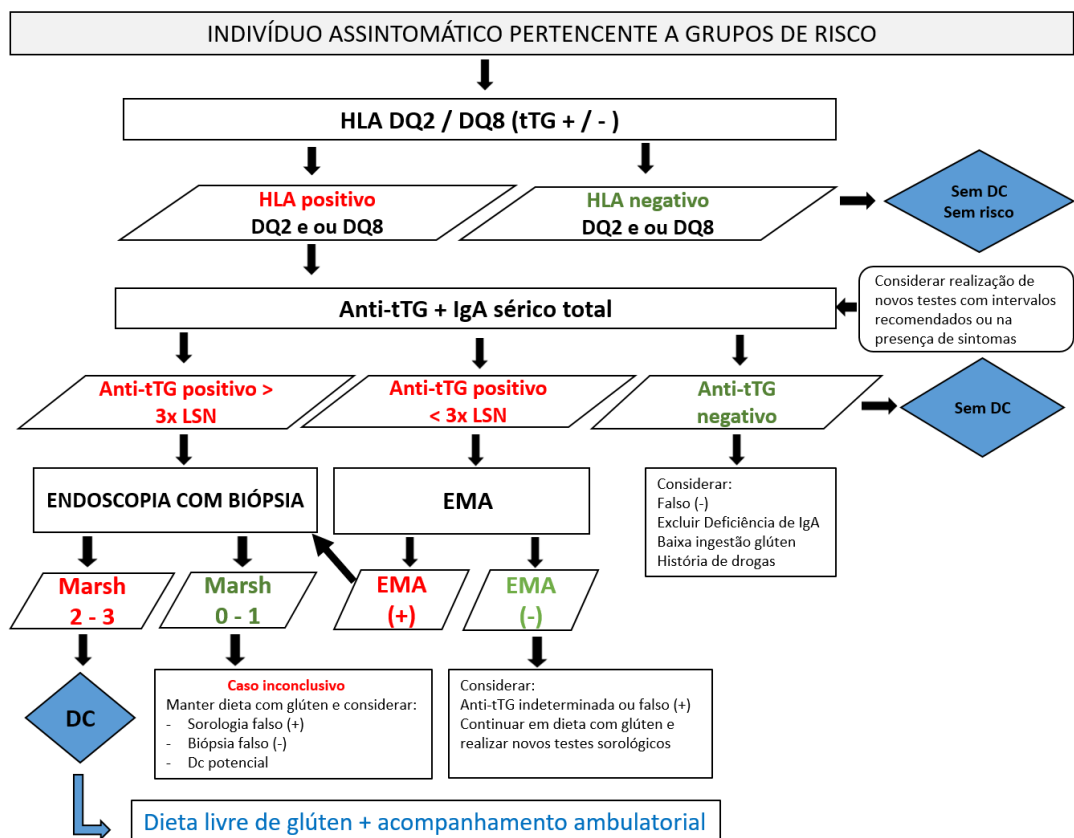


Figura 11 - Fluxograma para o diagnóstico da doença celíaca em pacientes que pertencem a grupos de risco. Adaptado de Husby et al., 2012 (1).

2.6 GRUPOS DE RISCO E DOENÇAS ASSOCIADAS À DOENÇA CELÍACA

Uma elevada prevalência de DC tem sido encontrada em associação com várias condições, tanto em crianças como em adultos, comparada à prevalência que ocorre na população geral. Os parentes de primeiro grau representam pacientes de elevado risco, apresentando uma prevalência de até 20% (91) (92). A DC também está associado a transtornos cromossômicos, como Síndrome de Down (5 - 12%) (1) (93); Síndrome de Turner (2 - 5%) (94) (95) e Síndrome de Williams (9,5%) (96).

As doenças autoimunes são três a dez vezes mais prevalentes na DC do que na população em geral, ocorrendo em 12 a 30% dos pacientes celíacos (97). Uma base patogênica comum envolvendo susceptibilidade genética, gatilhos ambientais semelhantes e perda da barreira intestinal com aumento da permeabilidade poderiam explicar esta associação. Mais de 60% dos *loci* de susceptibilidade associados à DC são compartilhados com pelo menos outra condição autoimune, sugerindo mecanismos patogênicos comuns (98).

A relação entre DC e o diabetes mellitus tipo 1 tem sido extensivamente investigada e sua prevalência varia entre 3% a 16% (5) (1) (99) (100). Aproximadamente 90% dos indivíduos com DM1 têm HLA-DQ2 ou HLA-DQ8, em comparação com 40% da população geral. Portanto a DC e o DM1 compartilham uma base genética (101). O DM1 é provavelmente a forma mais grave de autoimunidade associada à doença celíaca, já que 5% dos celíacos têm DM1 e vice-versa (102) (103). A triagem para DC em crianças e adolescentes com diabetes mellitus tipo 1 está sendo cada vez mais realizada. Naqueles com DM1 e DC confirmados, a adesão à dieta sem glúten permite a recuperação pômbero-estatural, reversão da anemia, melhora da densidade óssea, entre outros benefícios (104). Uma vez que a soroconversão negativo para positivo dos autoanticorpos para DC pode ocorrer após 10 anos do diagnóstico do diabetes, é necessário a realização de vários testes sorológicos ao longo dos anos (105).

As doenças autoimunes da tireóide, como a tireoidite de Hashimoto e a doença de Graves, estão associadas à doença celíaca, com uma prevalência até 10 vezes superior à da população geral (106) (107) (108).

Outras condições que apresentam elevada prevalência de DC são a doença de Addison 5–12% (109), desordens dermatológicas como dermatite herpetiforme 11,5% (110), alopecia areata 41,5% (111), desordens gastrointestinais como hepatite

autoimune 4 a 21,5% (112), cirrose biliar primária (3-7%) (113), desordens reumatológicas como síndrome de Sjögren 15% (114), síndrome antifosfolípídica 14% (115), artrite reumatoide juvenil 2,5 - 7% (113).

Além destas associações, um estudo italiano evidenciou uma elevada prevalência de doença celíaca em crianças com doença de Kawasaki (6). Neste estudo, 90 crianças com DK foram investigadas quanto à ocorrência de um segundo transtorno autoimune. Todos os pacientes realizaram rastreamento para doença celíaca através dos testes sorológicos antigliadina, antitransglutaminase e antiendomísio. A prevalência da DC nos pacientes com DK foi de 5,5%, muito superior à prevalência da população geral que é de 1 %. Os cinco pacientes que apresentaram sorologias positivas, confirmaram o diagnóstico histologicamente. Os pacientes também foram avaliados quanto à função tireoidiana através da dosagem do hormônio estimulante da tireóide, da tiroxina e da triiodotironina e dos anticorpos anti-tireoglobulina e anti-peroxidase. Entretanto nenhum paciente apresentou hipotireoidismo subclínico ou tireoidite autoimune (6). A coexistência das duas afecções, DK e DC, nunca havia sido relatada. Portanto mais estudos precisam ser realizados em busca da elucidação desta possível associação.

2.7 CONSIDERAÇÕES GERAIS E HISTÓRIA DA DOENÇA DE KAWASAKI

A DK também conhecida como síndrome do linfonodo mucocutâneo é uma vasculite febril aguda, autolimitada frequente na infância que afeta vasos de médio calibre com predileção pelas artérias coronárias (116). Mais de 50 anos se passaram desde os primeiros relatos de caso no Japão, contudo a etiologia e a patogênese permanecem desconhecidas (117).

Em janeiro de 1961 o doutor Tomisaku Kawasaki observou pela primeira vez no Japão um menino de 4 anos e 3 meses que apresentava um complexo de sintomas clínicos caracterizado por febre alta persistente, hiperemia conjuntival bilateral, alterações da mucosa da orofaringe, eritema polimorfo em todo o corpo, eritema e edema das mãos e pés e linfadenopatia cervical que não havia sido descrito pela literatura médica até aquele período. Entre 1961 a 1966 Kawasaki identificou 50 casos semelhantes e publicou o primeiro trabalho sobre essa nova doença, chamada de síndrome do linfonodo mucocutâneo (SLMC) em 1967 (118). O artigo original publicado em japonês por Kawasaki foi traduzido para o inglês e publicado em 2002

(119). A SLMC posteriormente chamada de doença de Kawasaki foi descrita como uma doença aparentemente autolimitada benigna que afetava lactentes e crianças menores de 5 anos. Entretanto, em 1970 o Comitê de Pesquisa de DK patrocinado pelo governo japonês ao realizar a primeira avaliação epidemiológica nacional foi surpreendido com alguns relatos de morte súbita revelando uma face mais agressiva da doença. Quatro casos de morte súbita foram autopsiados, sendo evidenciado aneurismas com trombose nas artérias coronárias e o diagnóstico histopatológico foi de periarterite nodosa infantil. Nessa época, o comitê tomou consciência de que a doença de Kawasaki era uma espécie de síndrome vasculítica (120). O doutor Kato, cardiologista pediátrico japonês identificou através da angiografia coronária, aneurismas coronários em alguns pacientes que não apresentavam sinais clínicos de doença cardíaca (121)

Em 1974, Kawasaki e colaboradores lançaram a primeira publicação sobre a DK na língua inglesa (122). Nesta mesma época, Melish et al relataram os primeiros caso da DK nos Estados Unidos (EUA) (123). Em 1976, a ecocardiografia bidimensional tornou-se disponível e foi introduzida para o manejo da doença de Kawasaki.

No ano de 1994 houve uma reunião sobre síndromes vasculíticas sistêmicas em Chapel Hill, Carolina do Norte. Nesta ocasião as vasculites foram divididas em três grupos de acordo com o diâmetro do vaso acometido, sendo reconhecido o envolvimento de artérias de médio calibre na doença de Kawasaki.

Mais de meio século se passaram e a etiologia e a patogênese da DK permanecem desconhecidas. Quanto ao diagnóstico não existe nenhum exame laboratorial específico, sendo feito com base nos mesmos critérios clínicos descritos por Kawasaki em 1961.

Quanto ao tratamento, em 1984 o doutor Furusho introduziu o uso da imunoglobulina intravenosa, utilizado até os dias de hoje (124).

2.8 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE KAWASAKI

Atualmente a DK já foi descrita em mais de 60 países, incluindo Ásia, Oriente Médio, América Latina e África, bem como na América do Norte e Europa (125). Aproximadamente 80% das crianças com DK são menores de 5 anos de idade, porém outras faixas etárias como os adolescentes podem ser afetadas (126). A idade de

início precoce da doença sugere que a susceptibilidade pode estar ligada à maturação do sistema imunológico. Quanto ao gênero é mais prevalente no sexo masculino com relação de 1,5 :1,0 (127). A sua incidência difere amplamente entre os grupos étnicos sendo maior nas populações asiáticas. É marcadamente mais prevalente no Japão e em crianças descendentes de japoneses, com incidência anual de aproximadamente 265 casos por 100.000 crianças com menos de cinco anos de idade. Em segundo lugar está a Coreia do Sul com 134 casos por 100.000 crianças menores de 5 anos. Estima-se que 1% das crianças nascidas no Japão terão DK até os 10 anos de idade. Três grandes epidemias foram registradas no Japão em 1979, 1982 e 1986. (128) (129).

Embora uma epidemia nacional similar não tenha sido observada desde 1990, a incidência da DK nos países da Ásia Oriental (Japão, Coreia do Sul e Taiwan) têm aumentado progressivamente, sendo 10 a 20 vezes maior do que nos EUA e na Europa (125).

Na Europa, a incidência anual varia entre 4,9 a 15,2 e nos Estados Unidos entre 19 a 24,7 / 100.000 crianças < 5 anos, sendo mais comum nos americanos descendentes dos asiáticos e das ilhas do pacífico (50,4 / 100.000), sugerindo uma importante contribuição genética para a susceptibilidade da enfermidade (125) (130) (131) .

Rodo et al 2011 verificaram que os casos de DK diagnosticados no Japão, no Havaí e em San Diego, EUA, aumentam quando os padrões de vento troposférico chegam da Ásia Central, sugerindo um agente causal comum transportado pelo vento. Esses autores postularam a hipótese de um agente infeccioso aerossolizado, possivelmente um fungo da espécie *Candida*, como potencial etiologia da DK (132) (133). Uma associação estatística da DK em Santiago, Chile com padrões de vento troposférico do Norte, sugere que a poeira transportada do deserto do Atacama poderia transportar um agente causal. Um novo resultado é que a dinâmica de Índices El Niño de Oscilação do Sul (ENSO) também explica parte da variabilidade da patologia com uma diminuição quando a La Niña está se dissipando ou El Niño está em ascensão. Portanto, a dinâmica da escala climática pode ser levada em conta em estudos futuros em todo o mundo (134).

Não há evidências para apoiar a disseminação de pessoa para pessoa, embora o agrupamento temporal e espacial dos casos esteja bem documentado (135).

O primeiro estudo italiano realizado através da utilização de dados administrativos nas regiões da Toscana e Emilia Romagna no período de 2008 a 2013 encontrou uma taxa de incidência de DK de 17,6 para 100.000 crianças menores de 5 anos (136). A atual prevalência nos países em desenvolvimento ainda é desconhecida. Como não há marcadores laboratoriais específicos ou achado clínico patognomônico, muitos casos são diagnosticados tardiamente ou deixam de ser diagnosticados. No Brasil, um dos estudos revelou que apenas 46% dos pacientes receberam imunoglobulina intravenosa no prazo de 10 dias após o início dos sintomas, indicando um atraso no diagnóstico destas crianças (137). Um fator que poderia contribuir para futuros estudos epidemiológicos desta patologia seria a obrigatoriedade da notificação de todos os casos suspeitos e ou diagnosticados, como sugerido por Borzutzky et al, 2012. Estes mesmos autores relataram o primeiro estudo epidemiológico de base populacional que avaliou as taxas de hospitalização e a incidência estimada da DK na América Latina. A incidência encontrada foi de 6,8 por 100.000 crianças menores de 5 anos no período 2001 a 2007 no Chile. (138).

Em relação aos picos sazonais, no Japão, Coreia e Taiwan a doença parece ser mais prevalente no verão e no inverno, enquanto na Europa e nos EUA os picos sazonais são observados no inverno e na primavera (130).

2.9 ETIOPATOGENIA DA DOENÇA DE KAWASAKI

Apesar da etiopatogenia permanecer desconhecida, muitos trabalhos sugerem uma provável interação de um gatilho infeccioso desencadeando uma resposta imunológica anormal em indivíduos geneticamente predispostos (7) (139) (140).

2.9.1 Teoria Infecciosa

Algumas características clínicas da DK como por exemplo a maior ocorrência dos 6 meses aos 4 anos de idade (141); a apresentação clínica autolimitada, geralmente não recorrente, manifestada por febre elevada, erupção cutânea, enantema, hiperemia conjuntival, adenomegalia (142), os padrões epidemiológicos como os picos sazonais (143) e a ocorrência de epidemias sugerem fortemente uma causa infecciosa (128).

Vários patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, adenovírus, Parvovírus B19, vírus do herpes humano 6, rotavírus, coronavírus humano, bocavírus, parainfluenza, Epstein-Barr, dengue, varicela-zoster, sarampo e vírus da gripe foram associados à DK (144) (145).

Além disso, estudos de microscopia eletrônica realizados após autópsia de pacientes com DK detectaram a presença de corpos de inclusão intracitoplasmáticos no epitélio brônquico ciliado contendo agregado de proteína viral e RNA apoiando uma etiologia viral e sugerindo que a porta de entrada do agente seja o trato respiratório (146). O epitélio brônquico proximal apresenta a maior infiltração de células plasmáticas produtoras de IgA e a IgA produzida age contra o antígeno específico que provavelmente está no epitélio brônquico, indicando uma resposta imune antígeno dirigida (147) (148).

Outro dado que sugere esta teoria infecciosa seria a correlação da sazonalidade da DK com ventos troposféricos da região do nordeste da China ao Japão sugerindo um possível patógeno transmitido pelo vento (133).

No entanto, após cinco décadas de pesquisa nenhum agente causal foi efetivamente reconhecido como o responsável pela DK (139).

Uma outra teoria aventada é da estimulação imunológica por superantígenos bacterianos tais como as toxinas estafilocócicas e estreptocócicas. Os superantígenos atuam através da sua ligação na região V β do receptor das células T promovendo uma resposta imunológica exacerbada que resultaria na liberação de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF α), interleucina 6 e interferon gama (IFN- γ) (149). Entretanto até este momento nenhuma toxina bacteriana foi detectada no sangue periférico de pacientes com DK, tornando improvável que tal toxina seja responsável pela inflamação difusa (146).

2.9.2 Suscetibilidade Genética

De acordo com dados epidemiológicos, a DK apresenta uma maior incidência no Japão, Coreia e Taiwan e nos descendentes asiáticos (125) (130). Alguns estudos têm relatado que irmãos de pacientes com DK têm um risco dez vezes maior de desenvolver a doença do que a população geral, enquanto as crianças com história paterna de DK apresentam uma incidência duas vezes maior (150) (151) (152). Esses

dados sugerem que fatores genéticos possam desempenhar um papel importante na patogênese da DK.

Inicialmente, os pesquisadores tentaram identificar a relação da doença de Kawasaki com os antígenos leucocitários humanos e encontraram uma provável associação com os HLA-DRB1, HLA B5, Bw51 e Bw44 (153) (154). Atualmente existem muitas pesquisas em andamento visando detectar possíveis genes responsáveis pela suscetibilidade genética da DK. Com a conclusão do projeto genoma humano e com o progresso da genética molecular e dos estudos da associação genoma larga, avanços consideráveis foram alcançados. Alguns dos genes mais amplamente estudados que se encontram consistentemente associados com DK na população asiática incluem inositol 1,4,5-trifosfato 3-quinase C (*ITPKC*), caspase-3 (*CASP3*), linfócito quinase B (*BLK*), CD40 e HLA. Na população europeia destacam-se os genes *FCGR2A* e *ABCC4* (139) (155).

A identificação do agente etiológico e dos genes que conferem susceptibilidade à DK são os melhores meios para ajudar o diagnóstico e o tratamento, prevenindo o desenvolvimento das lesões coronarianas (156).

2.9.3 Desregulação Imune

A ativação do sistema imunológico e a cascata de fatores inflamatórios são consideradas como características importantes da DK. Um grande número de células T, células mononucleares, macrófagos, neutrófilos, são observados em vários tecidos de órgãos de casos fatais de DK aguda (140).

Na DK destaca-se o eixo interleucina 6 (IL-6) / linfócitos T auxiliar 17 (Th17). A IL-6, em combinação com o fator de crescimento transformador beta (*Transforming growth factor beta* - TGF β), polariza as células T indiferenciadas em direção a um fenótipo Th17, com posterior invasão da parede do vaso e produção de citocinas pró-inflamatórias (126) (157). Jia et al demonstraram que crianças com DK aguda apresentam um desequilíbrio entre as células Th17 / T reguladoras (Treg) que poderia estar envolvido na perturbação da homeostase imune (158). As células Th17 induzem a produção de citocinas com propriedades pró-inflamatórias como a IL-17. Diferentemente, as células T reguladoras que expressam a FOXP3 tem uma ação anti-inflamatória através da liberação de citocinas como IL-10 e TGF β 1 (159).

Portanto, a expansão de Th17 e a depleção de linfócitos Treg podem ser consideradas características da doença de Kawasaki aguda (139) (140).

2.10 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA DOENÇA DE KAWASAKI

De acordo com *Gupta et. al. 2016*, o curso da DK pode ser dividido clinicamente em três fases:

Fase febril aguda: este período tem duração de 10 a 14 dias, sendo caracterizado por febre, exantema polimórfico, vermelhidão dos olhos, inflamação da língua e mucosa faríngea, lábios secos rachados, presença de linfadenopatia cervical unilateral, irritabilidade extrema, edema nas extremidades e descamação perineal. A miocardite pode estar presente e manifestar-se como taquicardia e insuficiência cardíaca congestiva. Outras manifestações clínicas como por exemplo pirúria estéril e reativação do local de inoculação da vacina contra tuberculose (Bacilo de Calmette e Guerin = BCG) podem ser vistas durante esta fase. No entanto, elas não fazem parte dos critérios diagnóstico da DK.

Fase subaguda: Inicia-se da segunda a quarta semana após o início dos sintomas. Nesta fase ocorre a descamação periungual e resolução dos achados clínicos observados na fase aguda. As alterações da artéria coronária (aneurismas coronarianos) são principalmente detectadas através do ecocardiograma durante este período. Uma pequena proporção de crianças também pode desenvolver artrite envolvendo uma ou mais articulações.

Fase convalescente: Após a quarta semana ocorre o desaparecimento de todos os sinais clínicos e a maioria das crianças tornam-se assintomáticas. Os exames que avaliam atividade inflamatória como por exemplo a proteína C reativa (PCR), velocidade de hemossedimentação (VHS) e a contagem das plaquetas geralmente retornam ao normal. O relevo horizontal das unhas conhecidas como linhas de Beau podem aparecer durante esta fase (160).

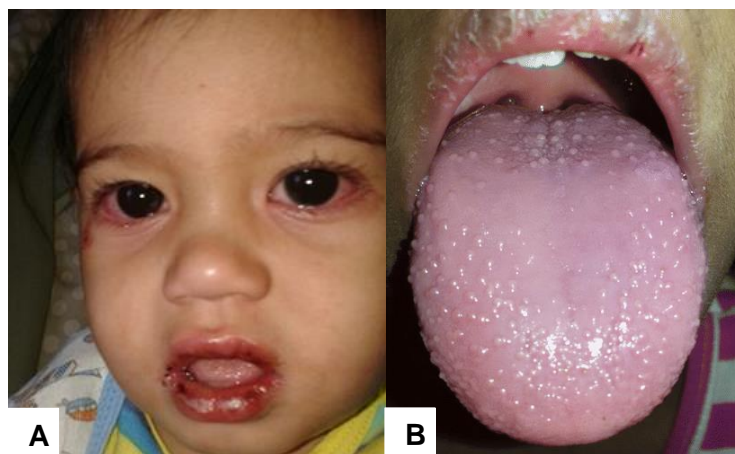


Figura 12 - (A) Hiperemia conjuntival, lábios secos e rachados. *Cortesia Dra. Cristina Medeiros Ribeiro de Magalhães, Serviço de Reumatologia do HCB.* (B) Língua de morango. Fonte: Kole et al., 2015 (161).

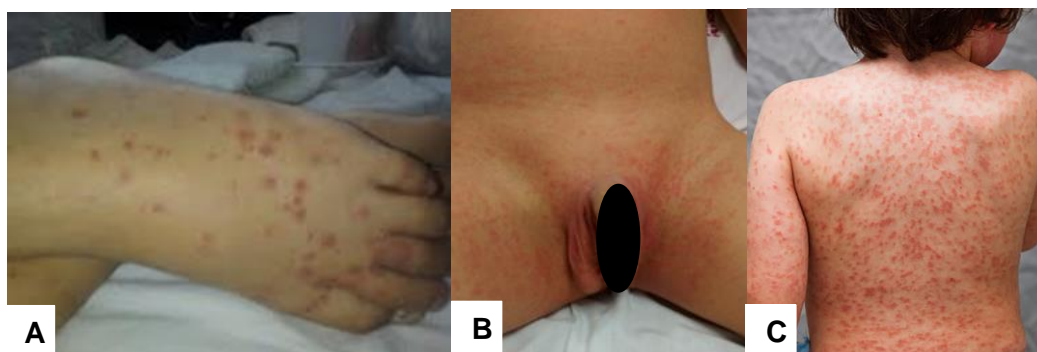


Figura 13 – (A) e (B) Exantema maculopapular em pé e períneo. *Cortesia Dra. Cristina Medeiros Ribeiro de Magalhães, Serviço de Reumatologia do HCB.* (C) Exantema maculopapular difuso. Fonte: Gupta et al., 2015 (160).

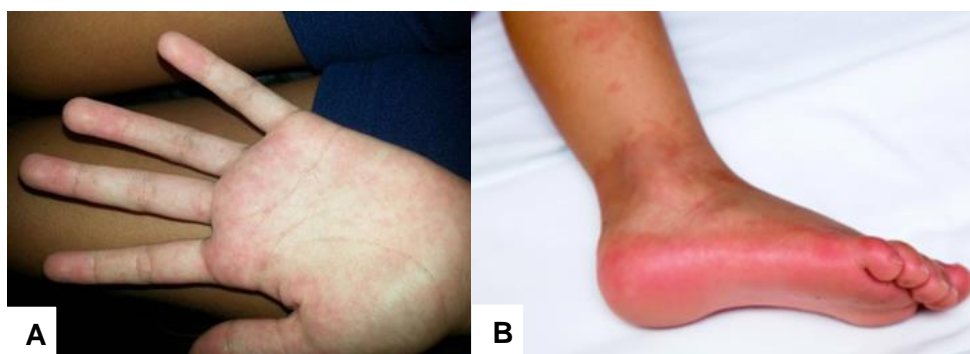


Figura 14 – (A) Eritema de mão. *Cortesia Dra. Cristina Medeiros Ribeiro de Magalhães, Serviço de Reumatologia do HCB.* (B) Eritema e edema em pé. Fonte:Gupta et al., 2015 (160).

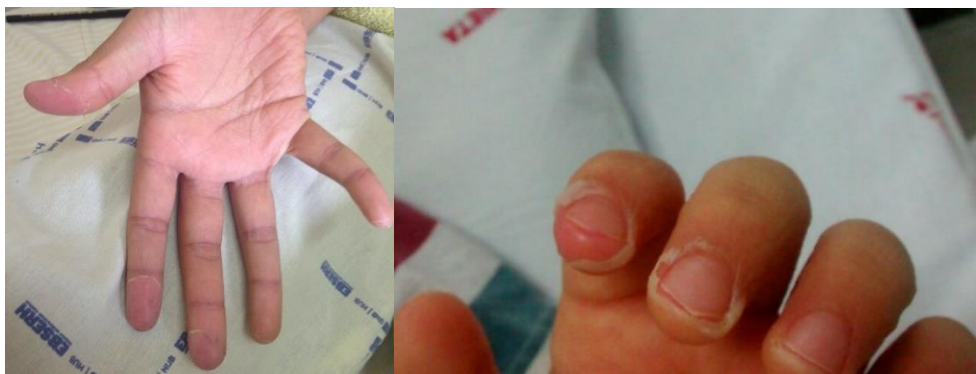


Figura 15 - Descamação periungual. Cortesia Dra. Cristina Medeiros Ribeiro de Magalhães, Serviço de Reumatologia do HCB.

2.10.1 Manifestações Cardiovasculares

A DK é a principal causa de doenças cardíacas pediátricas adquiridas em países desenvolvidos, incluindo a América do Norte, Europa e Japão (130). O pericárdio, o miocárdio, o endocárdio, as válvulas e as artérias coronárias podem ser afetados pelo processo inflamatório difuso de DK (162). A complicação mais característica e temida é a ocorrência de aneurisma da artéria coronária (AAC) que pode ser observada em 15-25% dos pacientes não tratados. As lesões podem ter diferentes graus de gravidade como por exemplo uma dilatação da artéria coronária assintomática até aneurismas gigantes (> 8 mm de diâmetro interno) com risco significativo de trombose e ruptura (142).

2.10.2 Outras Manifestações Clínicas

O envolvimento do trato gastrointestinal na DK ocorre em 2,3% dos casos. As manifestações clínicas incluem distensão e dor abdominal, vômitos e diarreia (163). Alves e colaboradores relataram diarreia associada a vômitos e dor abdominal em 61% dos casos de Kawasaki e vômito isolado em 44% (164). Os achados patológicos do intestino delgado relacionados à DK são degeneração, necrose e descamação das células epiteliais, bem como exsudatos inflamatórios na lâmina própria e na camada muscular. Vasculite e trombose das pequenas artérias submucosas ou hemorragia submucosa são freqüentemente observadas (163) (165).

Raramente, a doença de Kawasaki se apresenta como um abdome cirúrgico agudo (166). Alguns pacientes podem desenvolver hepatomegalia e icterícia. A

distensão acalculosa aguda da vesícula biliar (hidropsia), pode aparecer durante as primeiras 2 semanas da doença em 15% dos pacientes, identificada através de uma ultrassonografia abdominal (167) (168). Alterações do sistema nervoso central podem ser representadas através da paralisia transitória do nervo facial periférico unilateral que ocorre raramente. A perda auditiva neurossensorial de alta frequência transitória (20 a 35 dB) pode ocorrer durante a fase aguda, mas a perda auditiva neurossensorial persistente é rara (169) (170).

2.11 DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA DOENÇA DE KAWASAKI

Os critérios clínicos descritos pelo doutor Tomisaku Kawasaki no início dos anos 60 continuam sendo a base do diagnóstico da doença de Kawasaki atualmente (123). Não existe nenhum teste diagnóstico específico ou característica clínica patognomônica da DK. Portanto, uma história completa e um exame físico detalhado são essenciais para identificar os critérios clínicos estabelecidos. Em 2004 a Associação Americana do Coração (*American Heart Association - AHA*) publicou os critérios diagnósticos para a doença de Kawasaki (142). Estes critérios são semelhantes aos da Sociedade Japonesa de Circulação (171). O que difere as duas é que na Sociedade Japonesa cinco dos seis critérios devem estar presentes para confirmar o diagnóstico, enquanto na norte americana a febre é um critério obrigatório e quatro dos cinco critérios restantes são necessários para estabelecer o diagnóstico. Portanto o diagnóstico da DK depende da presença de febre por 5 dias ou mais, associada a quatro dos cinco critérios clínicos relacionados a seguir (Tabelas 2 e 3):

Tabela 2 - Critérios diagnósticos para doença de Kawasaki

Febre por 5 dias ou mais, associada a 4 dos 5 critérios:	Frequência %
1- Alterações da cavidade oral e dos lábios: lábios rachados e eritematosos, língua vermelha (aspecto de morango)	96,5
2- Exantema polimorfo: eritema maculopapular, multiforme ou escarlatiniforme, envolvendo extremidades, tronco e períneo	96
3- Conjuntivite bilateral não purulenta	89
4- Alterações nas extremidades: eritema e edema de mãos e pés na fase aguda e descamação periungual das mãos e dos pés nas semanas 2 e 3	75,6
5- Linfonodo cervical aumentado: geralmente unilateral (> 1,5 cm de diâmetro)	62,7
Exclusão de outras doenças com achados semelhantes	

Adaptado de Newburger et al., 2004 (142), e Saguil et al., 2015 (172).

Tabela 3 - Diagnóstico diferencial da doença de Kawasaki

Infecções virais (sarampo, adenovírus, enterovírus, vírus de Epstein-Barr)
Escarlatina
Síndrome da pele escaldada estafilocócicas
Síndrome do choque tóxico
Linfadenite cervical bacteriana
Reações de hipersensibilidade aos medicamentos
Síndrome de Stevens-Johnson
Artrite reumatóide juvenil
Febre maculosa
Leptospirose
Reação de hipersensibilidade ao mercúrio (acrodinia)

Adaptado de: Newburger et al. 2004 (142)

O tratamento padrão com imunoglobulina intravenosa (IGIV) e aspirina permanece inalterado desde a diretriz de tratamento da American Heart Association (AHA) de 2004 (142). A instituição da IGIV nos primeiros 10 dias de doença reduz o risco de desenvolvimento de anomalias da artéria coronária de 25% para

aproximadamente 5% (117). O mecanismo de ação da IGIV permanece desconhecido, mas o efeito anti-inflamatório generalizado provavelmente inibe a progressão da DK, impedindo o desenvolvimento das anormalidades das artérias coronárias. A dose utilizada é de 2 g / kg, dose única infundida durante 12 horas. O tratamento ainda deve ser administrado às crianças após o décimo dia de doença em casos de persistência da febre, ou se houver elevação das provas de atividade inflamatória, como PCR e VHS ou se houver anormalidades da artéria coronária (142).

A Aspirina é administrada na fase aguda da DK, concomitantemente com a IGIV na dose de 80-100 mg / kg / dia a cada 6 horas. As altas doses da aspirina apresentam um efeito antiinflamatório, porém isoladamente ela não reduz a frequência de desenvolvimento de anormalidades coronarianas. Portanto sua associação com a IGIV parece proporcionar um efeito anti-inflamatório aditivo. A duração do tratamento com aspirina em altas doses varia de acordo com cada instituição. Algumas instituições reduzem a dose da aspirina para 3-5 mg / kg /dia após um período de 48-72h sem febre. No entanto há serviços que mantêm altas doses até o décimo quarto dia da doença, independentemente da resolução da febre. Em baixas doses ela tem um efeito anti-plaquetário. A suspensão da aspirina pode ser realizada quando não houver evidência de anormalidades coronárias e a contagem de plaquetas estiver normalizada. Entretanto, se houver anormalidades coronarianas a Aspirina é mantida em baixas doses indefinidamente (142).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a prevalência da doença celíaca (DC) em pacientes pediátricos com diagnóstico prévio de doença de Kawasaki (DK) atendidas em Serviço de Reumatologia Pediátrica de Brasília, Brasil.

3.2 OBJETIVO SECUNDÁRIO

Determinar a prevalência de genótipos HLA-DQ predisponentes para DC em crianças com DK de Brasília.

Comparar a prevalência de DC encontrada no grupo estudado com estudos de prevalência na população geral do Brasil.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

Trata-se de um estudo observacional de prevalência de doença celíaca em pacientes pediátricos com diagnóstico prévio de doença de Kawasaki. Devido à baixa prevalência da doença de Kawasaki a amostra foi obtida por conveniência, sendo captados para esta pesquisa pacientes com diagnóstico de DK acompanhados no Serviço de Reumatologia Pediátrica de Referência em doença de Kawasaki do Distrito Federal, localizado no Hospital da Criança de Brasília José Alencar (HCB), Brasília/DF, Brasil, de acordo com sua demanda ambulatorial de rotina. O período de estudo foi de junho de 2014 a junho de 2016.

4.2 POPULAÇÃO

O estudo incluiu 110 pacientes pediátricos, 44 do sexo feminino com diagnóstico prévio de DK acompanhados no HCB. A idade no momento do diagnóstico da doença de Kawasaki variou de 0,3 a 9 anos (média: 3,4 anos, desvio padrão: 2,1; mediana 3,0). O diagnóstico de DC foi realizado de acordo com a última diretriz da Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN) (1). A faixa etária dos participantes variou de 1 a 15,5 anos (média 5,3; desvio padrão:3,3; mediana 4,6).

4.2.1 Critérios de Inclusão

Possuir diagnóstico prévio de Doença de Kawasaki em acordo com os critérios da Academia Americana de Pediatria e da Associação Americana do Coração (142), e estar em acompanhamento ambulatorial regular.

Estar consumindo glúten regularmente no período da coleta dos exames.

4.2.2 Critérios de Exclusão

Recusa dos pais ou responsáveis na participação da pesquisa.

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS

Os responsáveis pelos pacientes foram inicialmente informados e concordaram com a utilização, para fins de pesquisa, de excedentes de amostras de sangue colhidas durante o acompanhamento clínico regular e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B). Para este trabalho, foram utilizados 5 mililitros (mL) de sangue total colhido por punção venosa no laboratório do HCB e encaminhados ao Laboratório de Pesquisa em Doença Celíaca da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (LabDC/FMUnB), seguindo as normas H3-A6 e H21-A5 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) que estabelecem os critérios adequados para a coleta, transporte e processamento das amostras de sangue. O material foi distribuído em dois tubos, um contendo o anticoagulante ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA) para posterior extração do ácido desoxirribonucleico (DNA) e o outro contendo gel separador para isolamento do soro sanguíneo. O soro centrifugado a 4.500 rotações por minuto (rpm) durante cinco minutos foi catalogado e estocado a -20°C no LabDC para posterior realização dos exames sorológicos antitransglutaminase IgA (anti-tTG IgA) e antiendomísio IgA (EMA IgA). Os soros remanescentes foram descartados em lixo biológico conforme o Programa de Gerenciamento de Resíduos Sólidos em Serviços de Saúde (PGRSS), adotado pela UnB.

4.4 EXAMES SOROLÓGICOS

4.4.1 Pesquisa de Anticorpos Antitransglutaminase IgA (tTG-IgA)

Este exame sorológico, de elevada sensibilidade é a primeira ferramenta utilizada no rastreamento da doença celíaca. Trata-se de um teste imunoenzimático *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) designado para mensuração quantitativa dos anticorpos tTG-IgA nas amostras de soro. O Kit comercial utilizado é o QUANTA Lite® h-tTG IgA ELISA, INOVA Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA. De acordo com as recomendações do fabricante, o material foi analisado à temperatura ambiente (20 a 26°C). As amostras de soro de cada paciente foram diluídas 1:100 em Tampão fosfato-salino ou *Phosphate Buffered Saline* (PBS) com pH 7,2 e homogeneizadas em agitador mecânico. Em seguida, 100 microlitros (µL) de cada

soro diluído foram colocados nos poços da placa de poliestireno (96 poços) sensibilizados com transglutaminase tecidual humana (h-tTG) e incubados por trinta minutos.

Após este procedimento, a placa de poliestireno foi para a máquina *Thermo Plate-Washer* realizar um ciclo de três lavagens automatizadas com 300 µL de tampão de lavagem (tampão fosfato com 0,05% de Tween 20). Na próxima etapa foram adicionados 100 µL de anticorpo de detecção de anti-IgA humana, seguidos de 100 µL de anti-anticorpo IgA de cabra conjugado com uma peroxidase de rábano ou *Horseradish Peroxidase-Conjugated* (HRP). A placa foi incubada durante 30 minutos, seguida de lavagens como descrito anteriormente. Para a revelação da reação, foram adicionados 100 µL da solução de substrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB 3,3,5,5') com peróxido de hidrogênio a cada poço, incubados por 30 minutos à temperatura ambiente, no escuro. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 0,334 molar (H₂SO₄) e a leitura realizada no espectrofotômetro *Thermo Plate Reader* (TP-Reader™) usando filtro de 450 nm.

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, os resultados foram obtidos. Valores menores que 20 U foram considerados negativos, entre 21 e 30 U indeterminados ou limítrofes, e maiores que 30 U positivos, conforme sugere o fabricante.

4.4.2 Pesquisa de Anticorpos Antiendomísio IgA (EMA-IgA)

Amostras de soro dos pacientes foram submetidas ao teste de imunofluorescência indireta para detectar a presença de anticorpos antiendomísio IgA (EMA IgA). O Kit comercial empregado foi o QUANTA Lite® *Endomysial Primate Distal Esophageous* (INOVA Diagnostics, Inc. San Diego, CA, USA), cujas lâminas utilizam substratos com secções criostáticas de 4 micrômetros (µm) de espessura da porção distal do terço inferior do esôfago de primata (Macaco Rhesus). Os anticorpos específicos presentes no soro do paciente celíaco irão reagir contra o endomísio que recobre as fibras lisas da camada muscular do esôfago. O teste foi realizado seguindo as recomendações do fabricante.

Amostras de soro diluídas 1:5 em solução PBS (pH 7,2) foram incubadas em lâmina por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente (15 a 30°C). Em

seguida, cada lâmina foi lavada três vezes com tampão PBS por meio de esguichos utilizando pipeta Pasteur. Após a lavagem as lâminas foram incubadas no mesmo tampão por 5 minutos e este procedimento foi repetido mais uma vez. Na etapa seguinte, 30 µL do anticorpo de detecção, anticorpo anti-IgA humano marcado com fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) procedente do kit comercial (*INOVA Diagnostics, Inc. San Diego, CA, USA*), foi adicionado a cada secção criostática da lâmina contendo corte de esôfago de macaco e realizado uma nova incubação em câmara úmida por 30 minutos, seguida por lavagem com tampão PBS, como descrito anteriormente.

As lâminas foram secas, montadas e analisadas por microscopia de fluorescência no microscópio Zeiss Axiophot 2 com filtro de excitação 450nm à 490nm e emissão de 520nm, e observadas em um aumento de 400x. As lâminas foram avaliadas por dois observadores experientes, de forma independente. Os resultados foram considerados positivos quando a fluorescência de coloração verde brilhante em forma de rendilhado ou favo de mel fosse observada no tecido conjuntivo que envolve cada fibra do feixe da musculatura lisa. Na ausência da fluorescência os resultados foram considerados negativos.

4.5 TESTE GENÉTICO

4.5.1 Extração de DNA

As amostras de sangue coletadas no tubo contendo EDTA foram submetidas a extração do DNA pelo método de *Salting out* (110) por meio de coluna de sílica, usando *kit* comercial *Illustra™ Blood genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) seguindo as recomendações do fabricante. Cada amostra de DNA obteve uma concentração final entre 10ng/µL a 100ng/µL, sendo armazenada a uma temperatura de -20° C. Após a extração do DNA, as amostras de sangue foram devidamente tratadas e descartadas como resíduos biológicos.

4.5.2 Análise do DNA Extraído

Através do equipamento *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer* (*Nanodrop Technologies*, Wilmington, DE, USA), que utiliza a leitura espectrofotométrica nas

densidades óticas (DO) 260 nm e 280 nm, determinamos a quantidade do DNA extraído. Quando a razão dessas densidades óticas (A260/A280) foi entre 1.8 e 2.0, o grau de pureza do DNA foi considerado adequado para a realização das análises. Após avaliação, a concentração das amostras foi ajustada para 15 ng/μL.

4.5.3 Genotipagem dos Genes HLA-DQ Predisponentes para DC através da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

4.5.3.1 Realização da PCR em Tempo Real (qPCR)

As amostras de DNA foram utilizadas para amplificação dos alelos *DQA1*05 - DQB1*02* (DQ2) e *DQA1*03 - DQB1*03:02* (DQ8). A amplificação desses alelos foi realizada pelo método de PCR em tempo real (q-PCR ou real time PCR), utilizando o aparelho *Step-One Instrument (Applied BioSystems – Life Technologies™, Carlsbad, USA)*. Sequências específicas de *primers* para os alelos *DQA1*05*, *DQB1*02* e *DQA1*03*, previamente descritas por Olerup e colaboradores foram usadas (173). Para o alelo *DQB1*03:02* usamos as sequências dos *primers* previamente descrito por Profaizer e colaboradores (174) (Tabela 4).

Tabela 4 - Características de *primers* utilizados para qPCR

Alelo	Sequência		Produto de PCR
	Forward	Reverse	
DQA1*05	5'-ACG GTC CCT CTG GCC AGT A-3'	5'-AGT TGG AGC GTT TAA TCA GAC-3'	186pb
DQB1*02	5'-GTG CGT CTT GTG AGC AGA AG -3'	5'-GCA AGG TCG TGC CGA GCT- 3'	205pb
DQA1*03	5'-TTC ACT CGT CAG CTG ACC AT-3'	5'-CAA ATT GCG GGT CAA ATC TTC T-3'	183pb
DQB1*03:02	5'-GCG CGT GCG TCT TGT GAC C-3'	5'-CTG TTC CAG TAC TCG GCG GCA-3'	127pb
HGH	5'-GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3'	5'-TCA CGG ATT TCT GTT GTG TTT-3'	439pb

Como controle endógeno da reação de PCR, foi usado um par de *primers* de uma região conservada do gene HGH, o Hormônio do Crescimento Humano (*human growth hormone*) de acordo com Profaizer e colaboradores (174). Todos os *primers* foram usados em uma concentração de 0,5 μ M.

Quatro reações por amostra foram realizadas para amplificar individualmente cada alelo. As reações foram feitas em triplicata, conforme protocolo desenvolvido no nosso laboratório e detalhado a seguir (175). Componentes por reação: 1 μ L de *primer forward*, 1 μ L de *primer reverse*, 10 μ L de SYBR Green (Absolute qPCR SYBR Green Rox Mix - Thermo Fisher Scientific Inc, Vilnius, Lithuania), 2 μ L de DNA genômico e 6 μ L de água ultra pura (Thermo Fisher Scientific Inc, Vilnius, Lithuania) para um volume final de 20 μ L por reação (Tabela 5). Utilizamos como controle positivo, amostras previamente genotipadas para cada um dos alelos estudados. Como controle negativo e de contaminação foi usada uma amostra contendo todos os componentes da reação exceto DNA. As reações de PCR foram adicionadas a placas de 48 poços (*Applied BioSystems – Life Technologies™, Carlsbad, USA*), centrifugadas durante um minuto a 1300 rpm em centrífuga refrigerada *MPW 351R (Med. Instruments)* e, em seguida, colocadas no aparelho *Step-One Instrument*.

Tabela 5 - Componentes utilizados por reação de qPCR

Componente	Volume	Concentração
Primer Forward	1 μ L	10 μ M
Primer Reverse	1 μ L	10 μ M
Syber Green Rox Mix	10 μ L	2 X
DNA	2 μ L	15 ng/ μ L
Água ultra pura	6 μ L	-
Total	20 μ L	-

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

a etapa da curva de melting (essa etapa é realizada em 3 passos: 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e uma etapa final de aumento da temperatura de 60-95°C por meio de incrementos de 0,3°C com simultâneas medições do sinal de SYBR Green (Tabela 6).

Tabela 6 - Condições de qPCR para os genes *DQA1*05*, *DQB1*02*, *DQA1*03* e *HGH*

Etapas	Temperatura (° C)	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95	10 minutos	1
Desnaturação	95	15 segundos	32
Anelamento e extensão	60	60 segundos	32
Curva de melting - Passo 1	95	15 segundos	
Curva de melting - Passo 2	60	60 segundos	1
Curva de melting - Passo 3	60-95*	-	

*A temperatura aumenta de 60 a 95° C em intervalos de 0,3° C com monitoramentos simultâneos do sinal do SYBR Green.

O alelo *DQB1*03:02* foi amplificado de acordo com as condições descritas por Profaizer et al, 2011 (174). Uma etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguida de 6 etapas de amplificação e por fim segue-se a etapa da curva de *melting*; essas condições estão descritas em detalhes na tabela 7.

Tabela 7 - Condições da qPCR para o alelo *DQB1*03:02*, Profaizer et al, 2011

Etapas	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
	95°C	20 segundos	
Amplificação 1	71°C	45 segundos	2
	72°C	10 segundos	
	95°C	20 segundos	
Amplificação 2	70°C	45 segundos	10
	72°C	10 segundos	
	95°C	20 segundos	
Amplificação 3	69°C	45 segundos	10
	72°C	10 segundos	
Amplificação 4	95°C	20 segundos	
	67°C	45 segundos	5
	72°C	10 segundos	
Amplificação 5	95°C	20 segundos	
	66°C	45 segundos	5
	72°C	10 segundos	
Amplificação 6	95°C	20 segundos	
	65°C	45 segundos	2
	72°C	10 segundos	
Curva de <i>melting</i>	95°C	5 segundos	
	50°C	1 minuto	1
	97°C	Contínuo	

4.5.3.2 Análise dos Dados Processados Pela Técnica de PCR em Tempo Real

Para garantir a qualidade do produto amplificado foi realizada a análise das curvas de desnaturação (curva de *melting*) obtidas no final de cada reação de PCR em tempo real. A *Temperature melting* (T_m) média correspondente a cada alelo alvo foi de $80,12 \pm 0,1^\circ\text{C}$ para o alelo *DQA1*05*; $86,49 \pm 0,13^\circ\text{C}$ para *DQB1*02*; $80,69 \pm 0,11^\circ\text{C}$ para *DQA1*03*; $86,15 \pm 0,23^\circ\text{C}$ para *DQB1*03:02* e $83,53 \pm 0,07^\circ\text{C}$ para o gene HGH.

4.6 BIÓPSIA ENDOSCÓPICA DUODENAL

A EDA com biópsia duodenal é um exame extremamente invasivo e os achados histológicos não são específicos da doença celíaca, podendo ser encontrados em outras enteropatias (82). De acordo com a nova diretriz pode ser dispensada caso o paciente apresente sintomatologia sugestiva de DC, anti-tTG IgA maior que 10 vezes o LSN, EMA positivo e presença do HLA-DQ2 e ou DQ8, caso contrário a avaliação histológica deverá ser realizada (1). Portanto, a biópsia duodenal foi indicada para o paciente que apresentasse testes sorológicos positivos, porém tTG IgA menor que 10 x LSN. A EDA foi realizada pela equipe médica do Serviço de Endoscopia Pediátrica do HCB através do aparelho FUJINON EPX 4400, de fabricação japonesa. Os fragmentos obtidos (quatro) foram cuidadosamente abertos, orientados e fixados em formol a 10% e encaminhados para o Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatológica conveniado ao HCB para preparo das lâminas e análise histopatológica. As amostras foram processadas de forma padrão, fixadas e coradas com hematoxilina-eosina e posteriormente analisadas seguindo a classificação de Marsh-Oberhuber (85). O material foi examinado por um patologista experiente com auxílio do microscópio trinocular Oxion modelo OX.3035 acoplado para documentação fotográfica.

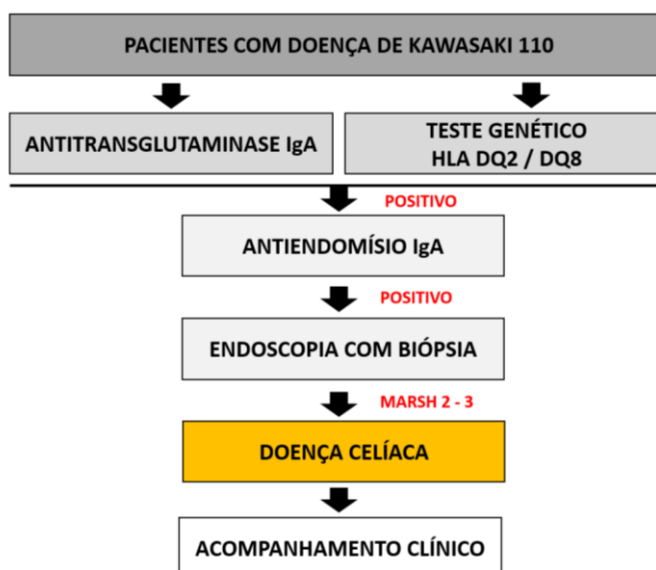


Figura 16 - Fluxograma para avaliação laboratorial e acompanhamento clínico dos pacientes envolvidos na pesquisa.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A prevalência foi calculada considerando-se o total de pacientes com testes sorológicos positivos (anti-tTG IgA e EMA IgA), biópsia com achados sugestivos de DC de acordo com a classificação de Marsh-Oberhuber e presença do HLA predisponente.

Outros parâmetros estatísticos (média, mediana, desvio padrão) foram calculados por forma convencionais, utilizando a planilha eletrônica Microsoft Windows Excell 2007.

A comparação com dados da literatura foi feita através do Teste Exato de Fisher para análises de contingência com grupos menores que 1.000 indivíduos e do teste e qui-quadrado para grupos maiores. O software estatístico utilizado para estes cálculos foi o GraphPad Prism 7 for Windows. O poder estatístico do teste relativo à amostra foi calculado utilizando o software G*Power 3.0.10.

Para avaliação dos resultados utilizou-se a convenção habitual de considerar adequados um erro “tipo 1” menor que 5% (valor de “p” menor que 0,05) e um “erro tipo 2” menor que 20%.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo segue os princípios da última Declaração de Helsinki instituído em 2013. A pesquisa possui aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS), que integra a Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal (SES-DF), registrado sob o número do parecer 1.037.234.

5 RESULTADOS

No presente estudo foram avaliados 110 pacientes com diagnóstico prévio de DK, dos quais 66 (60%) eram do sexo masculino, relação de 1,5:1. A idade no momento do diagnóstico da doença de Kawasaki variou de 0,3 a 9 anos (média: 3,4 anos, desvio padrão: 2,1; mediana 3,0 anos). A faixa etária dos participantes no momento do rastreamento da doença celíaca variou de 1 a 15,5 anos (média 5,3; DP 3,3; mediana 4,8).

Apenas 1 (0,9%) paciente do sexo masculino com DK diagnosticada aos 5 anos de idade apresentou marcadores sorológicos positivos (anti-tTG IgA 114,1 U/ml e EMA positivo) aos 9 anos de idade. A determinação dos alelos HLA predisponentes revelou a presença dos HLA-DQ2 e DQ8 neste caso. Como parte do rastreio recomendado pela literatura, após assinatura de novo termo de consentimento livre e esclarecido, este participante foi submetido à EDA com biópsia duodenal. A análise histopatológica dos fragmentos revelou atrofia vilositária parcial associada à hiperplasia de criptas e aumento de LIE (Marsh 3A), demonstrando total concordância com as sorologias, confirmando o diagnóstico de doença celíaca. Durante a análise clínica não foram evidenciados sinais e ou sintomas sugestivos de doença celíaca. (Figura 17)

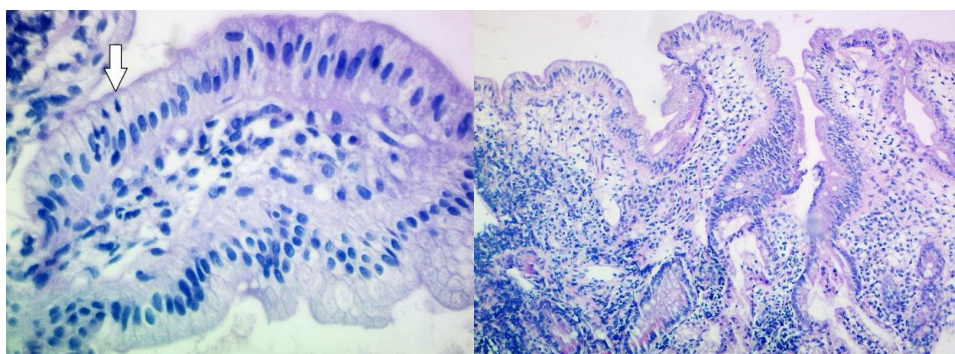


Figura 17 - Biópsia intestinal do paciente LGAS com doença celíaca compatível com a classificação de Marsh 3A. A) detalhe do linfócito intraepitelial (400 x) - seta; B) observa-se atrofia parcial das vilosidades associada a hiperplasia de criptas e aumento de LIE (400 X) (coloração: hematoxilina-eosina). Fonte: Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatológica conveniado ao HCB.

Tendo em vista que familiares de primeiro grau de pacientes celíacos fazem parte do grupo de risco para o desenvolvimento da doença celíaca realizou-se o rastreamento sorológico e pesquisa dos HLA predisponentes nestes familiares (pai, mãe, uma irmã e um irmão). Sua irmã apresentou sorologias positivas (anti-tTG IgA

93 U/ml e EMA IgA), além de também possuir o HLA-DQ2 e DQ8. Foi submetida à endoscopia com biópsia e em sua análise histopatológica foram evidenciadas alterações compatíveis com a classificação de Marsh 1 (aumento de linfócitos intraepiteliais ≥ 30 por 100 enterócitos). Na avaliação dos HLA predisponentes para DC identificou-se o HLA-DQ8 em sua mãe, o HLA-DQ2 em seu pai e a associação HLA-DQ2 e HLA-DQ8 em seu outro irmão. Atualmente o paciente celíaco encontra-se em dieta isenta de glúten, com normalização dos testes sorológicos e segue em acompanhamento no Ambulatório de Doença Celíaca do HUB onde recebe avaliação multidisciplinar de gastroenterologistas pediátricos, nutricionistas, dentista, psicólogos e terapeuta ocupacional. Sua família também está sendo acompanhada no mesmo serviço.

5.1 RESULTADO DO TESTE GENÉTICO

5.1.1 PCR em Tempo Real (qPCR)

Dos 110 pacientes com diagnóstico prévio de doença de Kawasaki foram identificados alelos de alto risco para DC em 32 (29,1%), com a seguinte distribuição: 15 (13,6%) apresentaram apenas o DQ2, 14 (12,7 %) apenas o DQ8 e 3 (2,7%) os alelos que codificam para DQ2 e DQ8. (Tabela 8)

Dos 78 (70,9%) participantes restantes, 43 apresentaram variantes de menor risco que o DQ2 e DQ8, sendo que 19 (17,3%) apresentaram apenas o alelo DQB1*02 (cadeia β do DQ2) e 24 (21,8%) apresentaram outras variantes de baixo risco. Os 35 pacientes restantes (31,8%) foram negativos para todos os alelos de risco para DC.

Tabela 8 – Distribuição dos alelos de HLA predisponentes para doença celíaca em crianças com diagnóstico de Kawasaki.

Genótipo	N	%
DQ2	15	13,6
DQ8	14	12,7
DQ2 e DQ8	3	2,7
Total	32	29,1

Resultados obtidos por qPCR

6 DISCUSSÃO

A prevalência da DC vem aumentando nos últimos anos, o que pode ser explicado pela maior acurácia dos testes sorológicos atuais, associada a maior compreensão do espectro e manifestações extraintestinais da doença (1) (30). Entretanto, mesmo nos países desenvolvidos para cada caso diagnosticado de DC, uma média de cinco casos permanece não diagnosticado, geralmente por causa de queixas sutis ou mesmo ausentes (176).

A DC tem sido associada a desordens cromossômicas e a diversas doenças autoimunes. Sabe-se que cerca de 30% de todos os pacientes celíacos têm uma ou mais doenças autoimunes (177) (113). Dentre as diversas desordens relacionadas à DC uma surpreendente associação com DK foi observada em um estudo italiano que evidenciou uma prevalência de DC de 5,5% (6).

Os participantes deste estudo caso-controle foram admitidos no Hospital Infantil de Florença, Itália, entre janeiro de 2000 e dezembro de 2004. O grupo foi composto por 90 crianças (57 do sexo masculino e 33 do sexo feminino, com idade média de 5,2 anos, faixa etária de 1,6-14,1 anos) com DK e 150 crianças pareadas por sexo e idade internadas para pequenas cirurgias formaram o grupo controle. Eles avaliaram a prevalência de doença celíaca e doenças autoimunes da tireóide nestes dois grupos. Todos realizaram dosagem dos anticorpos anti gliadina, antiendomísio e antitransglutaminase para pesquisa da DC. Um total de cinco pacientes com DK (três meninos, duas meninas) apresentaram sorologias positivas para DC em comparação com 1 paciente (0,6%) do grupo controle. O diagnóstico de DC foi confirmado histologicamente. A prevalência de DC encontrada nos pacientes com DK foi de 5,5% e no grupo controle 0,6% ($P < 0,05$).

Uma possível justificativa para esta relação entre DK e DC poderia estar vinculada ao comprometimento da mucosa intestinal em decorrência da vasculite acarretando um aumento da sua permeabilidade, permitindo uma maior exposição ao glúten e possivelmente o desenvolvimento da DC em indivíduos geneticamente predispostos (178). Outro ponto que poderia ser um racional teórico para suportar tal associação seria que diversos estudos tem relatado disbiose nos pacientes com DC e também na DK e como uma microbiota intestinal comensal bem equilibrada contribui para a função de barreira mucosa do intestino esta disbiose poderia predispor às duas doenças (64) (65) (179) .

Em virtude do pequeno número de pacientes e da elevada prevalência de DC encontrada nos pacientes com DK no estudo italiano foi levantada a necessidade de novos estudos sobre o tema, pois a confirmação de uma possível associação entre DC e a DK permitiria uma maior suspeição clínica e um diagnóstico mais precoce, o que é importante na prevenção de futuras complicações.

A despeito do exposto acima a literatura não trouxe, nestes 11 anos, novos estudos sobre essa associação, permanecendo lacunas quanto a real prevalência de DC nos pacientes com DK.

Em nosso estudo apenas um (0,9%), dentro de um universo de 110 pacientes com doença de Kawasaki teve o diagnóstico de doença celíaca, confirmado por antitransglutaminase IgA e antiendomísio IgA positivos, biópsia duodenal Marsh 3A e presença do HLA-DQ2 e HLA-DQ8.

Portanto a prevalência de DC entre os pacientes com doença de Kawasaki estudados não foi superior à prevalência da população geral mundial, que é estimada em aproximadamente 1% (1) (30).

Na avaliação da prevalência da DC a consideração geográfica é importante, pois podem haver agrupamentos genéticos, e ou condições ambientais relativas ao consumo de glúten que alterem a prevalência da DC (23) (24).

No Brasil há grandes estudos populacionais que buscam estimar a prevalência da DC. Alguns deles utilizaram doadores de sangue e mostraram prevalências mais baixas, provavelmente por utilizarem uma população mais saudável, outros utilizaram amostras da população geral, dentre os quais destacamos os três abaixo (41) (42).

Pratesi e colaboradores 2003, avaliaram a prevalência de DC em uma grande amostra da população brasileira. O grupo de estudo incluiu 2034 pacientes menores de 15 anos externos de um hospital geral sem queixas gastroenterológicas que compareceram ao laboratório de análises clínicas para coleta dos exames de rotina. Realizou-se a pesquisa do anticorpo antiendomísio IgA e da antigliadina IgG nos casos de deficiência de IgA e aqueles com sorologias positivas foram submetidos a biópsia intestinal. A prevalência encontrada foi de 0,54% (44).

Crovella et al 2007, determinaram a prevalência da DC em 1074 moradores do Recife, utilizando dois testes rápidos baseados na detecção do anticorpo antitransglutaminase no soro e em uma gota de sangue. Avaliou-se nos casos positivos a pesquisa da antitransglutaminase por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), teste genético e biópsia intestinal. Ambos os ensaios rápidos foram positivos

em 25 /1074 indivíduos, mas apenas 9/25 foram confirmados positivos pelo ensaio ELISA. Estes nove indivíduos apresentaram HLA-DQ2 e biópsia intestinal compatível com doença celíaca. A prevalência de DC neste estudo foi de 0,84% (43).

Conceição et al 2015, realizaram um estudo transversal com amostra probabilística de 1.213 adolescentes de 11 a 17 anos, de ambos os sexos estudantes do ensino fundamental das escolas públicas de Salvador/BA. O anticorpo antitransglutaminase IgA determinado pela técnica ELISA foi adotado para triagem da DC. O teste sorológico foi positivo em 6 adolescentes, que determinou uma soroprevalência de 0,49% (180). (Tabela 9)

Tabela 9 – Descrição do grupo em estudo e dos principais estudos populacionais brasileiros baseados no IgA-tTG ELISA para prevalência da doença celíaca.

Estudo	Local	Distribuição etária (anos)	Relação masc/fem (%)	Número de indivíduos	Prevalência de positividade do IgA-tTG* (%)	Teste utilizado
Este estudo	Brasília	1-15	60/40	110	0,91	IgA-tTG ELISA
S. Crovella et al. 2007	Recife	12-45	51/49	1074	0,84	IgA-tTG ELISA
Pratesi et al. 2003	Brasília	1-14	40/60	2034	0,54	IgA-tTG ELISA
Conceição et al. 2015	Salvador	11-17	40/60	1213	0,49	IgA-tTG ELISA

*IgA-tTG= antitransglutaminase IgA

Nota-se que a prevalência encontrada no grupo de pacientes com Kawasaki (0,91%) foi levemente maior que a dos inquéritos populacionais brasileiros (0,84%, 0,54% e 0,49%), contudo, a despeito das diferenças entre os grupos de cada estudo, a comparação destas prevalências não mostrou significância estatística. (Tabela 10)

Tabela 10 - Comparação das prevalências dos diferentes estudos populacionais brasileiros com este estudo.

Estudos comparados	Prevalência (%)	OR	IC
Este estudo x Pratesi et al.	0,91 x 0,54 ($p=0,61$)	1,68	0,15 – 9,46
Este estudo x Crovella et al.	0,91 x 0,84 ($p=0,57$)	1,09	0,10 – 6,63
Este estudo x Conceição et al.	0,91 x 0,49 ($p=0,84$)	1,57	0,14 – 9,63

Odds ratio e intervalos de confiança calculados pelo “*Teste de X²*”.

Como mencionado anteriormente a DC tem uma elevada prevalência entre os familiares de primeiro grau considerados grupos de risco para desenvolvimento da DC. Fasano e colaboradores realizaram um estudo epidemiológico multicêntrico nos Estados Unidos onde identificaram uma prevalência de 1:22 (4,5%) e 1:39 (2,6%) entre os parentes de primeiro e segundo grau, respectivamente (73). Estes resultados foram semelhantes aos encontrados por Almeida e colaboradores que relataram uma prevalência de DC entre os familiares de primeiro grau de 4,8% (92).

Tendo em vista a elevada prevalência da doença celíaca neste grupo de risco, realizamos o rastreamento sorológico e a pesquisa do HLA predisponente entre os familiares de primeiro grau do único paciente com diagnóstico de DC neste trabalho. Os pais e o irmão não apresentaram sorologias positivas, contudo todos tiveram HLA predisponente, portanto não se descarta a possibilidade de desenvolverem a doença no futuro. Além disso foi confirmado o diagnóstico de DC potencial na irmã, também assintomática.

Portanto a ocorrência da doença celíaca neste paciente com DK pode estar mais fortemente relacionada a sua história familiar positiva para doença celíaca, tornando-se um possível viés na estimativa da associação com a DK.

Utilizando-se o trabalho italiano com base para estimativa prévia da prevalência, poderíamos traçar como hipótese nula (h_0) uma prevalência de DC de 5,5% na população com Kawasaki, e como hipótese alternativa (h_1) uma prevalência semelhante à da população geral (1%). Neste caso o resultado encontrado em nosso grupo se assemelha mais à hipótese alternativa, com tendência a rejeitar a hipótese nula. Contudo, apesar da diferença entre as prevalências identificada entre o trabalho italiano e o grupo atual em estudo ser clara (5,5% x 0,91%), em decorrência da

reduzida dimensão da nossa amostra o poder estatístico para essa afirmação é baixo (0,64).

É provável que a DK, assim como a DC, seja uma desordem poligênica. Uma nova fase na investigação da DK foi iniciada graças aos avanços na tecnologia de genotipagem que permite a análise de possíveis genes de suscetibilidade para DK e a sobreposição de alguns destes componentes genéticos com outras patologias (181).

Diferentemente da DC que está estreitamente associada com moléculas HLA-DQ2 e HLA-DQ8, o envolvimento da região HLA na susceptibilidade à doença de Kawasaki tem sido controverso, e algumas associações positivas observadas em coletas de amostras relativamente pequenas não foram confirmadas em estudos de replicação subsequentes (1) (154).

Além da DC, outras doenças autoimunes como por exemplo diabetes mellitus tipo 1 e as doenças autoimunes da tireoide compartilham um fundo genético através da presença do HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (9). Isto explica em parte a elevada prevalência da DC nestas patologias que fazem parte do grupo de risco.

O presente trabalho encontrou uma prevalência de 29,1% para os alelos que codificam o DQ2 e ou DQ8 nos pacientes com DK. Este resultado é semelhante ao da população geral que apresenta 30% a 40% dos alelos predisponentes (1).

A sensibilidade do teste HLA-DQ2 é elevada (mediana 91%) e, quando combinada com o HLA-DQ8 pode chegar a 99,8%. Entretanto sua especificidade é baixa (mediana de 54%). Portanto este teste tem um valor preditivo negativo de quase 100% e um baixo valor preditivo positivo. Com isso a chance de um indivíduo que não apresente esses alelos desenvolver DC é extremamente pequena (1).

Os dados sobre prevalência de HLA encontrados no nosso estudo também estão de acordo com os obtidos por Selleski et al., em seu estudo de dissertação realizado na mesma região geográfica. Ela avaliou a prevalência de genótipos HLA-DQ predisponentes para DC em crianças celíacas e não celíacas de Brasília. Foram incluídas na pesquisa 100 crianças celíacas (59 do sexo feminino) e 110 crianças não-celíacas (63 do sexo feminino). A faixa etária dos participantes foi de 1 a 15 anos em ambos os grupos. Considerando apenas o grupo não celíaco a prevalência dos alelos HLA-DQ2 e ou HLA-DQ8 foi de 33,6%.

As variantes DQ2 e DQ8 estavam presentes em 1 (0,9%) paciente não celíaco, 20 (18,2%) pacientes tinham apenas o HLA-DQ2 e 16 (14,5%) apenas o HLA-DQ8.

Apesar das limitações impostas pelas diferenças entre a amostra de pacientes com Kawasaki e o grupo de indivíduos não celíacos do estudo acima citado: idade média (5,3 x 7,5 anos, $p = 0,001$) e relação homem / mulher (60/40% e 44/56 respectivamente, $p = 0,02$), a comparação da prevalência de HLA predisponente entre os indivíduos com DK e os não celíacos não mostrou diferença com significância estatística (182). (Tabela 11)

Tabela 11 - Comparação de resultados do qPCR entre este estudo e indivíduos não celíacos.

Genotipo	Este estudo (n=110)		Indivíduos não celíacos (n=110)		p
	N	%	N	%	
DQ2 / DQ8*	3	2,7	1	0,9	0,621
DQ2	15	13,6	20	18,2	0,463
DQ8	14	12,7	16	14,5	0,844
Total	32	29,1	37	33,6	0,561

*Pacientes com DQ2 e DQ8 simultaneamente positivos.

No nosso trabalho o paciente com diagnóstico de DC apresentou HLA-DQ2 e DQ8 e está de acordo com o gradiente de risco apresentado na literatura, onde a presença de ambos os genes HLA-DQ2 e HLA-DQ8 conferem o maior risco para desenvolvimento de DC (1:7) (74).

Até este momento, não há registro na literatura de outros estudos que tenham observado associação entre Doença Celíaca e Doença de Kawasaki, além disso, a ocorrência de um segundo transtorno autoimune em um paciente com DK raramente é relatada.

Nosso estudo não encontrou aumento de prevalência de DC entre pacientes com doença de Kawasaki. Não se permite, portanto, afirmar que há associação entre estas condições, contudo existem limitações potenciais que devem ser observadas.

Em primeiro lugar, foi um estudo de prevalência baseado em um pequeno tamanho de amostra, tendo em vista a raridade da doença de Kawasaki. Conforme citado acima, este pequeno número de pacientes faz com que o poder estatístico do estudo seja baixo, não sendo possível afirmar que a prevalência da DC nestes pacientes é realmente estatisticamente semelhante à da população geral.

Em segundo lugar, a falta da análise da IgA sérica poderia mascarar o diagnóstico de algum paciente analisado neste estudo, embora nenhum paciente apresentasse clínica compatível com deficiência de IgA na análise do prontuário, além

disso, considerando-se a prevalência de deficiência de IgA na população geral de 0,3% e na população celíaca de 2,5%, a possibilidade de um dos pacientes com anti-tTG IgA negativo e HLA predisponente (31 pacientes) apresentar deficiência de IgA é baixa.

Em terceiro lugar, a DC pode manifestar-se em diferentes momentos da vida, portanto um tTG-IgA negativo isolado não é capaz de descartar completamente a possibilidade de DC nos pacientes com genética predisponente. Para isso seria necessário um acompanhamento mais prolongado.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo a prevalência de doença celíaca em pacientes pediátricos com diagnóstico prévio de doença de Kawasaki foi de 0,9%.

A prevalência de genótipos HLA-DQ2 e ou HLA-DQ8 foi de 29,1%.

Neste estudo não se reproduziu o aumento de prevalência de DC nos pacientes com doença de Kawasaki, o que não confirma os achados do estudo anterior de prevalência na população italiana (5,5%) e aparentemente não foi maior que a prevalência mundial (0,9% x 1,0%).

Além disso a comparação com estudos de prevalência nacionais não mostrou diferenças significantes entre a prevalência da DC em pacientes com DK e na população geral.

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a prevalência dos HLA-DQ2 e ou DQ8 encontrada neste estudo (29,1%) e no grupo de crianças não celíacas (33,6%), sendo ambas semelhantes à prevalência encontrada na população geral que é de 30 a 40%.

Portanto não podemos afirmar que exista uma associação entre DK e DC nessa população, contudo são necessários mais estudos para avaliar a real prevalência da DC em pacientes com DK, bem como a necessidade e relevância do rastreio para a doença celíaca neste grupo de pacientes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Husby S et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *Jpgn*. 2012 Jan;54(1):136–60.
2. Sollid LM, Jabri B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nature reviews Immunology*. 2013 Mar 15;13(4):294–302.
3. Lewis NR, Holmes GKT. Risk of morbidity in contemporary celiac disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010 Dec 10;4(6).
4. Aggarwal S, Lebwohl B, Green PHR. Screening for celiac disease in average-risk and high-risk populations. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*. 2012 Jan;5(1):37–47.
5. Volta U, Tovoli F, Caio G. Clinical and immunological features of celiac disease in patients with Type 1 diabetes mellitus. *Expert review of gastroenterology & hepatology*. 2011 Jul 10;5(4):479–87.
6. Stagi S, Simonini G, Ricci L, de Martino M, Falcini F. Coeliac disease in patients with Kawasaki disease. Is there a link? *Rheumatology*. 2006 Jan 31;45(7):847–50.
7. Yim D, Curtis N, Cheung M, Burgner D. Update on Kawasaki disease: Epidemiology, aetiology and pathogenesis. Vol. 49, *Journal of Paediatrics and Child Health*. 2013. p. 704–8.
8. Green PHR, Lebwohl B, Greywoode R. Celiac disease. Vol. 135, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015. p. 1099–106.
9. Kelly CP, Bai JC, Liu E, Leffler DA. Advances in diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*. 2015 May;148(6):1175–86.
10. Ciccocioppo R, Kruzliak P, Cangemi GC, Pohanka M, Betti E, Lauret E, et al. The spectrum of differences between childhood and adulthood celiac disease. Vol. 7, *Nutrients*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2015. p. 8733–51.
11. Losowsky MS. A history of coeliac disease. Vol. 26, *Digestive Diseases*. 2008. p. 112–20.
12. Gasbarrini GB, Mangiola F, Gerardi V, Ianiro G, Corazza GR, Gasbarrini A. Coeliac disease: An old or a new disease? History of a pathology. Vol. 9, *Internal and Emergency Medicine*. Springer Milan; 2014. p. 249–56.
13. Parada A, Araya M. El gluten. Su historia y efectos en la enfermedad celíaca.

- Revista Médica de Chile. 2010 Oct;138(10):1319–25.
14. Meeuwisse G. Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paediatr Scand*. 1970;59:461.
 15. Nevoral J. Celiac Disease in Children: What Has Changed? *International Journal of Celiac Disease*. 2014 May 5;2(1):18–23.
 16. Sollid L, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *The Journal of experimental medicine*. 1989 Jan 1;169(January):345–50.
 17. Chorzelski T, Jarzabek-Chorzelska M, Jabłońska S, Orth G, Rzeska G. An immunofluorescence complement-fixation test for detection of human papilloma viruses in various warts and wartlike lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Archives of Dermatological Research*. 1983;275(1):53–7.
 18. Walker-Smith JA, Guandalini S, Shmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *ArchDisChild*. 1990 Aug;65(0003–9888 SB–A SB–M):909–11.
 19. 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 Jan;102(1):330–54.
 20. Dieterich W, Laag E, Schopper H, Volta U, Ferguson A, Gillett H, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology*. 1998 Dec;115(6):1317–21.
 21. Catassi C, Gatti S, Lionetti E. World perspective and celiac disease epidemiology. *Digestive Diseases*. 2015 Apr 22;33(2):141–6.
 22. Thomas HJ, Ahmad T, Rajaguru C, Barnardo M, Warren BF, Jewell DP. Contribution of histological, serological, and genetic factors to the clinical heterogeneity of adult-onset coeliac disease. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2009 Jan;44(9):1076–83.
 23. Lionetti E, Catassi C. Co-localization of gluten consumption and HLA-DQ2 and -DQ8 genotypes, a clue to the history of celiac disease. *Digestive and Liver Disease*. 2014;46(12):1057–63.
 24. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annual*

- Review of Immunology. 2011 Apr 23;29(1):493–525.
25. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, Mcmillan S, et al. The prevalence of celiac disease in Europe: Results of a centralized, international mass screening project. *Annals of Medicine*. 2010 Dec 11;42(8):587–95.
 26. Rubio-Tapia A, Ludvigsson JF, Brantner TL, Murray JA, Everhart JE. The Prevalence of Celiac Disease in the United States. *The American Journal of Gastroenterology*. 2012 Oct 31;107(10):1538–44.
 27. Mardini HE, Westgate P, Grigorian AY. Racial Differences in the Prevalence of Celiac Disease in the US Population: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 2009–2012. *Digestive Diseases and Sciences*. 2015 Jun 11;60(6):1738–42.
 28. Biannual Report on Global Food Markets [Internet]. *Food Outlook*. 2015. Available from: [http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/newsroom/docs/Food Outlook October 2015.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/newsroom/docs/Food_Outlook_October_2015.pdf)
 29. Bai J, Zeballos E, Fried M, Corraza G. World Gastroenterology Organisation Practice Guidelines: Celiac disease. *World Gastroenterology Organisation*. 2013 Feb;48(2):1–18.
 30. Lionetti E, Gatti S, Pulvirenti A, Catassi C. Celiac disease from a global perspective. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2015 Jun;29(3):365–79.
 31. Bahari A, Karimi M, Sanei-Moghaddam I, Firouzi F, Hashemi M. Prevalence of celiac disease among blood donors in sistan and balouchestan province, Southeastern Iran. *Archives of Iranian Medicine*. 2010;13(4):301–5.
 32. Tatar G, Elsurer R, Simsek H, Balaban YH, Hascelik G, Ozcebe OI, et al. Screening of tissue transglutaminase antibody in healthy blood donors for celiac disease screening in the Turkish population. *Digestive diseases and sciences*. 2004 Sep;49(9):1479–84.
 33. Israeli E, Hershcovici T, Grotto I, Rouach Z, Branski D, Goldin E. Prevalence of celiac disease in an adult Jewish population in Israel. *Israel Medical Association Journal*. 2010 May;12(5):266–9.
 34. Makharia GK, Verma AK, Amarchand R, Bhatnagar S, Das P, Goswami A, et al. Prevalence of celiac disease in the northern part of India: a community based study. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2011 May;26(5):894–900.
 35. Yuan J, Gao J, Li X, Liu F, Wijmenga C, Chen H, et al. The tip of the “Celiac

- Iceberg” in China: A systematic review and meta-analysis. Paul F, editor. PLoS ONE. 2013 Dec 4;8(12):e81151.
36. Catassi C, Doloretta Macis M, Räscht IM, De Virgiliis S, Cucca F. The distribution of DQ genes in the Saharawi population provides only a partial explanation for the high celiac disease prevalence. *Tissue antigens*. 2001 Dec;58(6):402–6.
 37. Alarida K, Harown J, Di Pierro MR, Drago S, Catassi C. HLA-DQ2 and -DQ8 genotypes in celiac and healthy Libyan children. *Digestive and Liver Disease*. 2010;42(6):425–7.
 38. Gonzalez-Galarza FF, Christmas S, Middleton D, Jones AR. Allele frequency net: A database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Research*. 2011 Jan 1;39(SUPPL. 1):D913–9.
 39. Catassi C, Räscht IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Asmar R, et al. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet*. 1999 Aug 21;354(9179):647–8.
 40. Cataldo F, Lio D, Simpore J, Musumeci S. Consumption of Wheat Foodstuffs Not a Risk for Celiac Disease Occurrence in Burkina Faso. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2002 Aug;35(2):233–4.
 41. Gandolfi L, Pratesi R, Cordoba JCM, Tauil PL, Gasparin M, Catassi C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *American Journal of Gastroenterology*. 2000 Mar;95(3):689–92.
 42. Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA, Cortez AJP, Carvalho FO, Bordin JO, et al. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. *European journal of gastroenterology & hepatology*. 2007 Jan;19(1):43–9.
 43. Crovella S, Brandao L, Guimaraes R, de Lima Filho JL, Arraes LC, Ventura A, et al. Speeding up coeliac disease diagnosis in the developing countries. *Digestive and Liver Disease*. 2007;39(10):900–2.
 44. Pratesi R, Gandolfi L, Garcia SG, Modelli IC, Lopes de Almeida P, Bocca AL, et al. Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2003 Jul;38(7):747–50.
 45. Pena SDJ, di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy F de SG, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. Harpending H, editor. PLoS ONE. 2011 Feb 16;6(2):e17063.

46. Almeida RC, Gandolfi L, De Nazaré Klautau-Guimarães M, Ferrari Í, Sousa SMB, Abe-Sandes K, et al. Does celiac disease occur in afro-derived brazilian populations? *American Journal of Human Biology*. 2012 Sep;24(5):710–2.
47. Castro-Antunes MM, Crovella S, Brandão LAC, Guimaraes RL, Motta MEFA, Silva GAP da. Frequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 in celiac patients and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil. *Clinics (São Paulo, Brazil)*. 2011;66(2):227–31.
48. Gandolfi L, Pratesi R, Uenishi RH, Almeida FC De, Selleski N, Karla Y, et al. Presence of DQ2 . 2 Associated with DQ2 . 5 Increases the Risk for Celiac Disease. *Autoimmune diseases*. 2016;2016:5409653.
49. Cecilio LA, Bonatto MW. The Prevalence of Hla Dq2 and Dq8 in Patients With Celiac Disease, in Family and in General Population. *Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva*. 2015;28(3):183–5.
50. Gomez JC, Selvaggio GS, Viola M, Pizarro B, La Motta G, De Barrio S, et al. Prevalence of celiac disease in Argentina: Screening of an adult population in the La Plata area. *American Journal of Gastroenterology*. 2001 Sep;96(9 SUPPL.):2700–4.
51. Mora M, Litwin N, Toca C, Azcona MI, Neffa RS, Ortiz G, et al. Prevalencia De Enfermedad Celíaca: Estudio Multicéntrico En Población Pediátrica En Cinco Distritos Urbanos De Argentina. *Rev Argent Salud Pública*. 2010 Dec 1;1(6):26–31.
52. Gujral N, Freeman HJ, Thomson ABR. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. Vol. 18, *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Inc; 2012. p. 6036–59.
53. Parra-Medina R, Molano-Gonzalez N, Rojas-Villarraga A, Agmon-Levin N, Arango M-T, Shoenfeld Y, et al. Prevalence of celiac disease in latin america: a systematic review and meta-regression. *PloS one*. 2015;10(5):e0124040.
54. Kang JY, Kang AHY, Green A, Gwee KA, Ho KY. Systematic review: Worldwide variation in the frequency of coeliac disease and changes over time. Vol. 38, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2013. p. 226–45.
55. White LE, Merrick VM, Bannerman E, Russell RK, Basude D, Henderson P, et al. The rising incidence of celiac disease in Scotland. *Pediatrics*. 2013 Oct 1;132(4):e924-31.
56. Catassi C, Kryszak D, Bhatti B, Sturgeon C, Helzlsouer K, Clipp SL, et al. Natural

- history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974. *Annals of Medicine*. 2010 Oct 27;42(7):530–8.
57. Ludvigsson JF, Rubio-Tapia A, van Dyke CT, Melton LJ, Zinsmeister AR, Lahr BD, et al. Increasing incidence of celiac disease in a North American population. *The American journal of gastroenterology*. 2013 May 19;108(5):818–24.
 58. Carlsson A, Agardh D, Borulf S, Grodzinsky E, Axelsson I, Ivarsson S-A. Prevalence of celiac disease: before and after a national change in feeding recommendations. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2006 Jan 26;41(5):553–8.
 59. Bai JC, Fried M, Corazza GR, Schuppan D, Farthing M, Catassi C, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines on Celiac Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2013 Feb;47(2):121–6.
 60. Kupfer SS, Jabri B. Pathophysiology of Celiac Disease. Vol. 22, *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*. NIH Public Access; 2012. p. 639–60.
 61. Balakireva A, Zamyatnin A. Properties of Gluten Intolerance: Gluten Structure, Evolution, Pathogenicity and Detoxification Capabilities. *Nutrients*. 2016 Oct 18;8(10):644.
 62. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V, Auricchio S, et al. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*. 2003 Jul 5;362(9377):30–7.
 63. Barone M, Troncone R, Auricchio S. Gliadin Peptides as Triggers of the Proliferative and Stress/Innate Immune Response of the Celiac Small Intestinal Mucosa. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014 Nov 7;15(11):20518–37.
 64. De Palma G, Nadal I, Medina M, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, et al. Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BMC Microbiology*. 2010 Feb 24;10(1):63.
 65. Sánchez E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Intestinal *Staphylococcus* spp. and virulent features associated with coeliac disease. *Journal of Clinical Pathology*. 2012 Sep;65(1):830–4.
 66. Stene LC, Honeyman MC, Hoffenberg EJ, Haas JE, Sokol RJ, Emery L, et al. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: A longitudinal study. *American Journal of Gastroenterology*. 2006 Oct;101(10):2333–40.

67. Silano M, Agostoni C, Sanz Y, Guandalini S. Infant feeding and risk of developing celiac disease: a systematic review. *BMJ open*. 2016 Jan 25;6(1):e009163.
68. Olivares M, Albrecht S, De Palma G, Ferrer MD, Castillejo G, Schols HA, et al. Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. *European journal of nutrition*. 2015 Feb 4;54(1):119–28.
69. Lionetti E, Castellaneta S, Francavilla R, Pulvirenti A, Tonutti E, Amarri S, et al. Introduction of Gluten, HLA Status, and the Risk of Celiac Disease in Children. *New England Journal of Medicine*. 2014 Oct 2;371(14):1295–303.
70. Szajewska H, Shamir R, Mearin L, Ribes-Koninckx C, Catassi C, Domellöf M, et al. Gluten Introduction and the Risk of Coeliac Disease: A Position Paper by the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2016 Mar;62(3):507–13.
71. Departamento de Nutrologia. Manual de orientação para a alimentação do lactente, do pré-escolar, do escolar, do adolescente e na escola/Sociedade Brasileira de Pediatria. Rio de Janeiro; 2012.
72. Greco L. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*. 2002 May;50(5):624–8.
73. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Coletti RB, Drago S, et al. Prevalence of Celiac Disease in At-Risk and Not-At-Risk Groups in the United States. *Archives of Internal Medicine*. 2013 Feb 10;163(3):286–92.
74. Megiorni F, Mora B, Bonamico M, Barbato M, Nenna R, Maiella G, et al. HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Human Immunology*. 2009 Jan;70(1):55–9.
75. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology*. 2001 Feb;120(3):636–51.
76. Lionetti E, Catassi C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *International reviews of immunology*. 2011 Jul 29;30(4):219–31.
77. Freeman HJ. Celiac disease: A disorder emerging from antiquity, its evolving classification and risk, and potential new treatment paradigms. *Gut and Liver*. 2015 Jan;9(1):28–37.
78. Admou B, Essaadouni L, Krati K, Zaher K, Sbihi M, Chabaa L, et al. Atypical celiac disease: From recognizing to managing. Vol. 2012, *Gastroenterology Research and Practice*. Hindawi Publishing Corporation; 2012. p. 1–9.

79. Kneepkens CMF, Von Blomberg BME. Clinical practice: Coeliac disease. Vol. 171, *European Journal of Pediatrics*. 2012. p. 1011–21.
80. Harris LA, Park JY, Voltaggio L, Lam-Himlin D. Celiac disease: clinical, endoscopic, and histopathologic review. *Gastrointestinal Endoscopy*. 2012 Sep;76(3):625–40.
81. Alessio M, 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. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2011 Jul;55(1):1.
82. Bao F, Bhagat G. Histopathology of Celiac Disease. *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*. 2012 Oct;22(4):679–94.
83. Corazza GR, Villanacci V, Zambelli C, Milione M, Luinetti O, Vindigni C, et al. Comparison of the Interobserver Reproducibility With Different Histologic Criteria Used in Celiac Disease. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2007 Jul;5(7):838–43.
84. Marsh MN, Crowe PT. Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity. *Bailliere's Clinical Gastroenterology*. 1995 Jun;9(2):273–93.
85. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. Vol. 11, *European journal of gastroenterology & hepatology*. 1999. p. 1185–94.
86. Husby S, Murray JA. Diagnosing coeliac disease and the potential for serological markers. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2014 Sep 30;11(11):655–63.
87. Tack GJ, Verbeek WHM, Schreurs MWJ, Mulder CJJ. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nature Publishing Group*. 2010 Apr 9;7(4):204–13.
88. Vives-Pi M, Takasawa S, Pujol-Autonell I, Planas R, Cabre E, Ojanguren I, et al. Biomarkers for Diagnosis and Monitoring of Celiac Disease. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2013 Apr;47(4):308–13.
89. Pallav K, Xu H, Leffler DA, Kabbani T, Kelly CP. Immunoglobulin A deficiency in celiac disease in the United States. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2016 Jan;31(1):133–7.
90. Csizmadia CG, Mearin ML, Oren A, Kromhout A, Crusius JB, von Blomberg BM, et al. Accuracy and cost-effectiveness of a new strategy to screen for celiac

- disease in children with Down syndrome. *The Journal of pediatrics*. 2000 Dec;137(6):756–61.
91. Rubio-Tapia A, Van Dyke CT, Lahr BD, Zinsmeister AR, El-Youssef M, Moore SB, et al. Predictors of family risk for celiac disease: a population-based study. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2008 Sep;6(9):983–7.
 92. Almeida PL de, Gandolfi L, Modelli IC, Martins R de C, Almeida RC de, Pratesi R. Prevalence of celiac disease among first degree relatives of Brazilian celiac patients. *Arquivos de gastroenterologia*. 45(1):69–72.
 93. Wouters J, Weijerman ME, van Furth AM, Schreurs MWJ, Crusius JBA, von Blomberg BME, et al. Prospective human leukocyte antigen, endomysium immunoglobulin A antibodies, and transglutaminase antibodies testing for celiac disease in children with Down syndrome. *The Journal of pediatrics*. 2009 Feb;154(2):239–42.
 94. 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. *European journal of endocrinology*. 2009 Apr 1;160(4):675–9.
 95. Dias M do CS, Castro LCG de, Gandolfi L, Almeida RC de, Córdoba MS, Pratesi R. Screening for celiac disease among patients with Turner syndrome in Brasília, DF, midwest region of Brazil. *Arquivos de gastroenterologia*. 47(3):246–9.
 96. Giannotti A, Tiberio G, Castro M, Virgili F, Colistro F, Ferretti F, et al. Coeliac disease in Williams syndrome. *Journal of medical genetics*. 2001 Nov;38(11):767–8.
 97. Rashtak S, Marietta E V, Murray JA. Celiac sprue: a unique autoimmune disorder. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2009 Sep 10;5(5):593–604.
 98. Troncone R, Discepolo V. Celiac Disease and Autoimmunity. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2014 Jul;59:S9–11.
 99. Salardi S, Volta U, Zucchini S, Fiorini E, Maltoni G, Vaira B, et al. Prevalence of Celiac Disease in Children With Type 1 Diabetes Mellitus Increased in the Mid-1990s: An 18-year Longitudinal Study Based on Anti-endomysial Antibodies. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2008 May;46(5):612–4.
 100. Hansen D, Brock-Jacobsen B, Lund E, Bjorn C, Hansen LP, Nielsen C, et al. Clinical Benefit of a Gluten-Free Diet in Type 1 Diabetic Children With Screening-

- Detected Celiac Disease: A population-based screening study with 2 years' follow-up. *Diabetes Care*. 2006 Nov 1;29(11):2452–6.
101. Camarca M, Mozzillo E, Nugnes R, Zito E, Falco M, Fattorusso V, et al. Celiac disease in type 1 diabetes mellitus. *Italian Journal of Pediatrics*. 2012 Mar 26;38(1):10.
 102. Elfström P, Sundström J, Ludvigsson JF. Systematic review with meta-analysis: associations between coeliac disease and type 1 diabetes. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2014 Nov;40(10):1123–32.
 103. Lundin KEA, Wijmenga C. Coeliac disease and autoimmune disease-genetic overlap and screening. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2015 Sep 25;12(9):507–15.
 104. Pham-Short A, Donaghue KC, Ambler G, Phelan H, Twigg S, Craig ME. Screening for Celiac Disease in Type 1 Diabetes: A Systematic Review. *PEDIATRICS*. 2015 Jul 1;136(1):e170–6.
 105. Glastras SJ, Craig ME, Verge CF, Chan AK, Cusumano JM, Donaghue KC. The role of autoimmunity at diagnosis of type 1 diabetes in the development of thyroid and celiac disease and microvascular complications. *Diabetes care*. 2005 Sep;28(9):2170–5.
 106. Ch'ng CL, Jones MK, Kingham JGC. Celiac Disease and Autoimmune Thyroid Disease. *Clinical Medicine & Research*. 2007 Oct 1;5(3):184–92.
 107. van der Pals M, Ivarsson A, Norström F, Högberg L, Svensson J, Carlsson A. Prevalence of Thyroid Autoimmunity in Children with Celiac Disease Compared to Healthy 12-Year Olds. *Autoimmune Diseases*. 2014;2014:1–6.
 108. Valentino R, Savastano S, Tommaselli AP, Dorato M, Scarpitta MT, Gigante M, et al. Prevalence of coeliac disease in patients with thyroid autoimmunity. *Hormone research*. 1999;51(3):124–7.
 109. Biagi F, Campanella J, Soriani A, Vailati A, Corazza GR. Prevalence of coeliac disease in Italian patients affected by Addison's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2006 Jan 8;41(3):302–5.
 110. Kotze LM da S. Celiac disease in Brazilian patients: associations, complications and causes of death. Forty years of clinical experience. *Arquivos de gastroenterologia*. 46(4):261–9.
 111. Ertekin V, Tosun M, Erdem T. Screening of celiac disease in children with alopecia areata. *Indian Journal of Dermatology*. 2014 May;59(3):317.

112. Panetta F, Nobili V, Sartorelli MR, Papa RE, Ferretti F, Alterio A, et al. Celiac disease in pediatric patients with autoimmune hepatitis: etiology, diagnosis, and management. *Paediatric drugs*. 2012 Feb 1;14(1):35–41.
113. Lauret E, Rodrigo L. Celiac disease and autoimmune-associated conditions. Vol. 2013, *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation; 2013. p. 127589.
114. Luft LM, Barr SG, Martin LO, Chan EKL, Fritzler MJ. Autoantibodies to tissue transglutaminase in Sjögren's syndrome and related rheumatic diseases. *The Journal of rheumatology*. 2003 Dec;30(12):2613–9.
115. Shamir R, Shoenfeld Y, Blank M, Eliakim R, Lahat N, Sobel E, et al. The prevalence of coeliac disease antibodies in patients with the antiphospholipid syndrome. *Lupus*. 2003 May;12(5):394–9.
116. Greco A, De Virgilio A, Rizzo MI, Tombolini M, Gallo A, Fusconi M, et al. Kawasaki disease: an evolving paradigm. *Autoimmunity reviews*. 2015 Aug;14(8):703–9.
117. Zhu FH, Ang JY. The Clinical Diagnosis and Management of Kawasaki Disease: a Review and Update. *Current Infectious Disease Reports*. 2016 Oct 28;18(10):32.
118. Kawasaki T. Infantile acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome with specific desquamation of the fingers and toes. Clinical observation of 50 cases. *Jpn J Allerg*. 1967;16:178–222.
119. Burns JC. Commentary: translation of Dr. Tomisaku Kawasaki's original report of fifty patients in 1967. *The Pediatric infectious disease journal*. 2002 Nov;21(11):993–5.
120. Kawasaki T, Naoe S. History of Kawasaki disease. Vol. 18, *Clinical and Experimental Nephrology*. Springer Japan; 2014. p. 301–4.
121. Kato H, Koike S, Yamamoto M, Ito Y, Yano E. Coronary aneurysms in infants and young children with acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome. *The Journal of Pediatrics*. 1975 Jun;86(6):892–8.
122. Kawasaki T, Kosaki F, Okawa S, Shigematsu I, Yanagawa H. A new infantile acute febrile mucocutaneous lymph node syndrome (MLNS) prevailing in Japan. *Pediatrics*. 1974 Sep;54(3):271–6.
123. Burns JC, Kushner HI, Bastian JF, Shike H, Shimizu C, Matsubara T, et al. Kawasaki disease: A brief history. *Pediatrics*. 2000 Aug;106(2):E27.

124. Furusho K, Kamiya T, Nakano H, Kiyosawa N, Shinomiya K, Hayashidera T, et al. High-dose intravenous gammaglobulin for Kawasaki disease. *Lancet* (London, England). 1984 Nov 10;2(8411):1055–8.
125. Singh S, Vignesh P, Burgner D. The epidemiology of Kawasaki disease: a global update. *Archives of Disease in Childhood*. 2015 Nov;100(11):1084–8.
126. Newburger JW, Takahashi M, Burns JC. Kawasaki Disease. *Journal of the American College of Cardiology*. 2016 Apr 12;67(14):1738–49.
127. Singh S, Kawasaki T. Kawasaki disease - an Indian perspective. *Indian pediatrics*. 2009 Jul;46(7):563–71.
128. Makino N, Nakamura Y, Yashiro M, Ae R, Tsuboi S, Aoyama Y, et al. Descriptive epidemiology of Kawasaki disease in Japan, 2011-2012: from the results of the 22nd nationwide survey. *Journal of epidemiology*. 2015;25(3):239–45.
129. Kim GB, Han JW, Park YW, Song MS, Hong YM, Cha SH, et al. Epidemiologic features of Kawasaki disease in South Korea: data from nationwide survey, 2009-2011. *The Pediatric infectious disease journal*. 2014 Jan;33(1):24–7.
130. Uehara R, Belay ED. Epidemiology of Kawasaki disease in Asia, Europe, and the United States. *Journal of epidemiology*. 2012;22(2):79–85.
131. Callinan LS, Holman RC, Vugia DJ, Schonberger LB, Belay ED. Kawasaki disease hospitalization rate among children younger than 5 years in California, 2003-2010. *The Pediatric infectious disease journal*. 2014 Jul;33(7):781–3.
132. Rodó X, Ballester J, Cayan D, Melish ME, Nakamura Y, Uehara R, et al. Association of Kawasaki disease with tropospheric wind patterns. *Scientific Reports*. 2011 Dec 10;1(1):152.
133. Rodó X, Curcoll R, Robinson M, Ballester J, Burns JC, Cayan DR, et al. Tropospheric winds from northeastern China carry the etiologic agent of Kawasaki disease from its source to Japan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014 Jun 3;111(22):7952–7.
134. Jorquera H, Borzutzky A, Hoyos-Bachilloglu R, García A. Association of Kawasaki disease with tropospheric winds in Central Chile: is wind-borne desert dust a risk factor? *Environment international*. 2015 May;78:32–8.
135. Kao AS, Getis A, Brodine S, Burns JC. Spatial and Temporal Clustering of Kawasaki Syndrome Cases. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2008 Nov;27(11):981–5.

136. Mauro A, Fabi M, Da Frè M, Guastaroba P, Corinaldesi E, Calabri GB, et al. Kawasaki disease: an epidemiological study in central Italy. *Pediatric rheumatology online journal*. 2016 Apr 12;14(1):22.
137. Magalhães CMR, Vasconcelos PAC, Pereira MR, Alves NRM, Gandolfi L, Pratesi R. Kawasaki disease: a clinical and epidemiological study of 70 children in Brazil. *Tropical doctor*. 2009 Apr;39(2):99–101.
138. Borzutzky A, Hoyos-Bachiloglu R, Cerda J, Talesnik E. Rising hospitalization rates of Kawasaki Disease in Chile between 2001 and 2007. *Rheumatology international*. 2012 Aug 23;32(8):2491–5.
139. Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y. Update on etio and immunopathogenesis of Kawasaki disease. *Current opinion in rheumatology*. 2014 Jan;26(1):31–6.
140. Del Principe D, Pietraforte D, Gambardella L, Marchesi A, Tarissi de Jacobis I, Villani A, et al. Pathogenetic determinants in Kawasaki disease: the haematological point of view. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2017 Apr;21(4):632–9.
141. Lee K-Y, Han J-W, Lee J-S. Kawasaki disease may be a hyperimmune reaction of genetically susceptible children to variants of normal environmental flora. *Medical hypotheses*. 2007 Jan;69(3):642–51.
142. Newburger JW, Takahashi M, Gerber MA, Gewitz MH, Tani LY, Burns JC, et al. Diagnosis, Treatment, and Long-Term Management of Kawasaki Disease: A Statement for Health Professionals From the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association. *Circulation*. 2004 Oct 26;110(17):2747–71.
143. Dimitriades VR, Brown AG, Gedalia A. Kawasaki Disease: Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. *Current Rheumatology Reports*. 2014 Jun 18;16(6):423.
144. Matsubara K, Fukaya T. The role of superantigens of group A Streptococcus and Staphylococcus aureus in Kawasaki disease. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2007 Jun;20(3):298–303.
145. Wang C-L, Wu Y-T, Liu C-A, Kuo H-C, Yang KD. Kawasaki disease: infection, immunity and genetics. *The Pediatric infectious disease journal*. 2005 Nov;24(11):998–1004.
146. Rowley AH. Kawasaki disease: novel insights into etiology and genetic

- susceptibility. Annual review of medicine. 2011 Feb 18;62(1):69–77.
147. Rowley AH, Baker SC, Shulman ST, Garcia FL, Guzman-Cottrill JA, Chou P, et al. Detection of antigen in bronchial epithelium and macrophages in acute Kawasaki disease by use of synthetic antibody. The Journal of infectious diseases. 2004 Aug 15;190(4):856–65.
 148. Rowley AH, Eckerley CA, Jäck HM, Shulman ST, Baker SC. IgA plasma cells in vascular tissue of patients with Kawasaki syndrome. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 1997 Dec 15;159(12):5946–55.
 149. Meissner HC, Leung DY. Superantigens, conventional antigens and the etiology of Kawasaki syndrome. The Pediatric infectious disease journal. 2000 Feb;19(2):91–4.
 150. Fujita Y, Nakamura Y, Sakata K, Hara N, Kobayashi M, Nagai M, et al. Kawasaki disease in families. Pediatrics. 1989 Oct;84(4):666–9.
 151. Uehara R, Yashiro M, Nakamura Y, Yanagawa H. Kawasaki disease in parents and children. Acta Paediatr. 2003 Jan 2;92(6):694–7.
 152. Uehara R, Yashiro M, Nakamura Y, Yanagawa H. Clinical Features of Patients With Kawasaki Disease Whose Parents Had the Same Disease. Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine. 2004 Dec 1;158(12):1166.
 153. Kim KY, Kim DS. Recent Advances in Kawasaki Disease. Yonsei Medical Journal. 2016 Jan;57(1):15.
 154. Onouchi Y. Molecular Genetics of Kawasaki Disease. Pediatric Research. 2009 May;65(5 Part 2):46R–54R.
 155. Khor CC, Davila S, Breunis WB, Lee Y-C, Shimizu C, Wright VJ, et al. Genome-wide association study identifies FCGR2A as a susceptibility locus for Kawasaki disease. Nature genetics. 2011 Nov 13;43(12):1241–6.
 156. Yoon KL. Update of genetic susceptibility in patients with Kawasaki disease. Korean journal of pediatrics. 2015 Mar;58(3):84–8.
 157. Rasouli M, Heidari B, Kalani M. Downregulation of Th17 cells and the related cytokines with treatment in Kawasaki disease. Immunology Letters. 2014 Nov;162(1):269–75.
 158. Jia S, Li C, Wang G, Yang J, Zu Y. The T helper type 17/regulatory T cell imbalance in patients with acute Kawasaki disease. Clinical and experimental immunology. 2010 Oct;162(1):131–7.
 159. Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DAA. The

- development and function of regulatory T cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009 Aug 24;66(16):2603–22.
160. Gupta A, Singh S. Kawasaki disease for dermatologists. *Indian Dermatology Online Journal*. 2016;7(6):461.
 161. Kole A, Chandakole D. Strawberry Tongue. *New England Journal of Medicine*. 2015 Jul 30;373(5):467–467.
 162. Singh S, Sharma D, Bhattad S, Phillip S. Recent Advances in Kawasaki Disease ??? Proceedings of the 3rd Kawasaki Disease Summit, Chandigarh, 2014. Vol. 83, *Indian Journal of Pediatrics*. 2016. p. 47–52.
 163. Masoumi K, Forouzan A, Saidi H, Javaherizadeh H, Khavanin A, Bahadoram M. Spontaneous duodenal perforation as a complication of kawasaki disease. *Case reports in pediatrics*. 2015;2015:689864.
 164. Alves NR de M, Magalhães CMR de, Almeida R de FR, Santos RCR Dos, Gandolfi L, Pratesi R. Prospective study of Kawasaki disease complications: review of 115 cases. *Revista da Associacao Medica Brasileira* (1992). 57(3):295–300.
 165. Yaniv L, Jaffe M, Shaoul R. The surgical manifestations of the intestinal tract in Kawasaki disease. *Journal of Pediatric Surgery*. 2005 Sep;40(9):e1–4.
 166. Zulian F, Falcini F, Zancan L, Martini G, Secchieri S, Luzzatto C, et al. Acute surgical abdomen as presenting manifestation of Kawasaki disease. *The Journal of Pediatrics*. 2003 Jun;142(6):731–5.
 167. Suddleson EA, Reid B, Woolley MM, Takahashi M. Hydrops of the gallbladder associated with Kawasaki syndrome. *Journal of pediatric surgery*. 1987 Oct;22(10):956–9.
 168. Keeling IM, Beran E, Dapunt OE. Kawasaki disease and hepatobiliary involvement: report of two cases. *Italian journal of pediatrics*. 2016 Mar 8;42(1):27.
 169. Knott PD, Orloff LA, Harris JP, Novak RE, Burns JC. Sensorineural hearing loss and Kawasaki disease: a prospective study. *American journal of otolaryngology*. 2001;22(5):343–8.
 170. Magalhães CMR, Magalhães Alves NR, Oliveira KMA, Silva IMC, Gandolfi L, Pratesi R. Sensorineural hearing loss: an underdiagnosed complication of Kawasaki disease. *Journal of clinical rheumatology: practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases*. 2010 Oct;16(7):322–5.

171. JCS Joint Working Group. Guidelines for Diagnosis and Management of Cardiovascular Sequelae in Kawasaki Disease (JCS 2008). *Circulation Journal*. 2010 Sep;74(9):1989–2020.
172. Saguil A, Fargo M, Grogan S. Diagnosis and management of kawasaki disease. *American family physician*. 2015 Mar 15;91(6):365–71.
173. Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue antigens*. 1993 Mar;41(3):119–34.
174. Profaizer T, Eckels D, Delgado JC. Celiac disease and HLA typing using real-time PCR with melting curve analysis. *Tissue antigens*. 2011 Jul;78(1):31–7.
175. Selleski N, Almeida LM, Almeida FC de, Gandolfi L, Pratesi R, Nóbrega YK de M. Simplifying celiac disease predisposing HLA-DQ alleles determination by the real time PCR method. *Arquivos de gastroenterologia*. 2015 Jun;52(2):143–6.
176. Catassi C, Gatti S, Fasano A. The New Epidemiology of Celiac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2014 Jul;59:S7–9.
177. Diamanti A, Capriati T, Bizzarri C, Ferretti F, Ancinelli M, Romano F, et al. Autoimmune diseases and celiac disease which came first: genotype or gluten? *Expert review of clinical immunology*. 2016 Jan 2;12(1):67–77.
178. Kim MY, Noh JH. A case of Kawasaki disease with colonic edema. *Journal of Korean medical science*. 2008 Aug;23(4):723–6.
179. Kinumaki A, Sekizuka T, Hamada H, Kato K, Yamashita A, Kuroda M. Characterization of the gut microbiota of Kawasaki disease patients by metagenomic analysis. *Frontiers in microbiology*. 2015 Aug 11;6:824.
180. Conceição-Machado MEP da, Santana MLP, Silva R de CR, Silva LR, Pinto EJ, Couto RD, et al. Triagem sorológica para doença celíaca em adolescentes. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 2015;18(1):149–56.
181. Onouchi Y. Genetics of Kawasaki disease: what we know and don't know. *Circ J*. 2012;76(7):1581–6.
182. Selleski N, Gandolfi L, Pratesi R. Prevalência de Alelos HLA Predisponentes para a Doença Celíaca (HLA-DQ2 e HLA-DQ8) em Crianças Celíacas e não Celíacas. Universidade de Brasília; 2015.

APÊNDICE A – ARTIGO CIENTÍFICO

Genetic and serological linkage between Kawasaki and Celiac Diseases in children

Alessandra dos Santos Domingues^{2,4}, Cristina Medeiros Ribeiro de Magalhães^{5,6}, Rosa Harumi Uenishi^{1,2}, Fernanda Coutinho de Almeida¹, Isabella Márcia Soares Nogueira Teotônio¹, Lenora Gandolfi^{1,2,3,4}, Yanna Karla de Medeiros Nóbrega^{1,7}, Riccardo Pratesi^{1,2}, Nicole Selleski^{1,2}.

¹ Interdisciplinary Laboratory of Biosciences, Research Laboratory in Celiac Disease, School of Medicine, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil.

² Post-graduate Program in Health Sciences, School of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

³ Celiac disease Ambulatory, Brasilia University Hospital, Brasilia, DF, Brazil

⁴ Pediatric Gastroenterology, Brasilia University Hospital, Brasilia, DF, Brazil.

⁵ Pediatric Rheumatology Unit, Children's Hospital José Alencar, Brasilia, DF, Brazil.

⁶ School of Medicine, Brasilia University Center – UNICEUB, Brasilia, DF, Brazil

⁷ Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, DF, Brazil

Corresponding author

Alessandra dos Santos Domingues

Post-graduate Program in Health Sciences,

Pediatric Gastroenterology, Brasilia University Hospital, Brasilia, DF, Brazil,

Research Laboratory in Celiac Disease,

School of Medicine, University of Brasilia

Campus Universitário Darcy Ribeiro

Asa Norte – CEP 70910900

Brasilia, DF, Brazil

Email: alessandra_gastro@hotmail.com

Office +556135547571, Cell phone +5561981871244

Abstract

Objectives. Kawasaki disease (KD) is an acute, self-limited, systemic vasculitis of unknown etiology that occurs predominantly in infants and young children. An increased prevalence of celiac disease (CD), the highest prevalence ever reported (5,5%), has previously been described among KD patients. The present study's aim was to describe the prevalence of CD in a group of children previously diagnosed with KD from Brasilia, Brazil.

Methods. Samples from 101 KD patients (60 male and 41 female, mean age at diagnosis 3.7 years, age range 1-9 yr.) were tested to determine IgA-tTG levels by enzyme-linked immunosorbent assay, IgA-EMA by indirect immunofluorescence assay and CD predisposing genotypes (HLA-DQ2 and -DQ8) by Real Time PCR. Duodenal biopsies were performed in patients Who tested positive for both serologic exams.

Results and Conclusions. Only one KD patient (1 %, male; diagnosed at age 5) showed significantly elevated titers of anti-transglutaminase antibodies (114.1 U; cut off value: 20 U). This prevalence does not differ from the prevalence reported for general population which is estimated in 1% nor significantly with previous studies performed in Brazilian general population. Genetic analyses of CD predisposing variants showed a total frequency of 29.7% which is also inside the expected prevalence range found in general population (25-50%). This suggests that patients with KD may not have an increased risk of developing CD.

Keywords

Kawasaki disease, Celiac disease, prevalence, IgA-tTG, IgA-EMA, HLA-DQ2, HLA-DQ8.

Introduction

Celiac Disease (CD) is a systemic autoimmune disease characterized by permanent intolerance to gluten (presente in wheat, barley, rye and probably oat) in genetically susceptible individuals [1]. CD is strongly associated with the presence of HLA-DQ2, encoded by the alleles *HLA-DQA1*05:01* and *DQB1*02:01*, which is found in 90-95% of patients with CD. The remaining CD subjects carry either HLA-DQ8

(encoded by alleles *HLA-DQA1*03:01* and *DQB1*03:02*) or low risk variants [1]. These genetic factors are necessary but not sufficient for the individual developing the disease since as many as 25-50% of healthy subjects in the general population also carry them [2]. Therefore, we know that CD has a multifactorial, and not completely elucidated etiology with a strong interplay between genetic and environmental factors. It also has a wide spectrum of clinical manifestations ranging from classic cases of malabsorption syndrome, characterized by chronic diarrhea and weight loss, to atypical cases disclosing extra intestinal features such as dermatitis herpetiformis, anemia, osteoporosis, joint pain, and neurological disturbances, or even without evident symptoms making it difficult to diagnose [3,4]. However, serological specific tests has been well described for the correct diagnoses of CD which include high levels of immunoglobulin A anti-transglutaminase antibodies (IgA-tTG) and anti-endomysium antibodies (IgA-EMA).

Due to its autoimmune nature, CD has already been associated with other autoimmune diseases like type I diabetes, Hashimoto`s thyroiditis, Rheumatoid arthritis, Sjögren syndrome, among others. An increased prevalence of CD has also been reported among Kawasaki disease (KD) patients. KD is an acute, self-limited, systemic vasculitis of unknown etiology that occurs predominantly in infants and young children [5]. The most accepted hypothesis cites superantigens and/or infectious agents as possible causes of the immunological disorder which mainly affects the skin, mucosa and lymph nodes [6,7]. However, some researchers had already described KD as a disease of autoimmune background [8].

In the absence of a specific diagnostic test, clinical criteria have been established to diagnose Kawasaki disease; the presence of fever lasting five or more days plus at least four of these primary clinical features are necessary: edema and erythema in extremities, polymorphous exanthema, bilateral bulbar conjunctival injection without exudates, changes in lips and oral cavity (erythema, lips cracking, strawberry tongue, diffuse injection of oral and pharyngeal mucosa), cervical lymphadenopathy (1.5 cm diameter), usually unilateral [5].

As an attempt to test a probable link between celiac and Kawasaki diseases, we performed a study which`s aim was to describe the prevalence of Celiac disease in a group of previously diagnosed Kawasaki patients from Brasilia, Brazil.

Patients and methods

This retrospective study included children diagnosed with Kawasaki disease and followed during the period of 2014 to 2015 at the Rheumatology Department of the Children's Hospital of Brasilia (Brazil). The diagnosis of KD was established according to the American Academy of Pediatrics and American Heart Association's criteria (Newburguer et al 2004). The diagnosis of CD was achieved according to the revised guidelines of the European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) [9]. The study complied with the principles of the latest Declaration of Helsinki (2013) and was approved by the Ethics Committee of the Children's Hospital of Brasilia. A signed informed consent was obtained from all participants when applicable or from their parents or caregivers, who previously received an extensive explanation on purpose and procedures involved in the research.

During this period, 109 patients were diagnosed with Kawasaki Disease. The studied population consisted in 101 Kawasaki patients (60 male and 41 female, mean age at diagnosis 3.7 years, age range 1-9 yr.). To avoid bias eight patients were excluded from the study for being under the estimated minimum age for developing celiac disease (less than 1 year old, because of variations in age of dietary gluten introduction).

Serum samples were tested to determine IgA-tTG levels by enzyme-linked immunosorbent assay (INOVA QUANTA Lite™ Diagnostics, San Diego, CA, USA) and IgA-EMA by indirect immunofluorescence assay (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA) following manufacturer's instructions. Duodenal biopsies were performed in patients that tested positive for both serologic exams.

Genomic DNA was extracted from each whole blood sample using Illustra™ Blood Genomic Prep Mini Spin kit (Healthcare, Buckinghamshire, UK) according to manufacturer's instructions. The presence or absence of HLA-DQ predisposing alleles (*DQA1*05 - DQB1*02* and *DQA1*03 - DQB1*03:02*, which code for class II MHC DQ2 and DQ8 molecules, respectively) was tested in all samples using real time PCR (qPCR). The chosen primers and protocols were based on a previous study performed in our lab for *DQA1*05*, *DQB1*02* and *DQA1*03* [10]. Typing of the *DQB1*03:02* allele was performed as described by Profaizer et al. [11].

Results

Only one KD patient (1 %, male; diagnosed at age 5) showed significantly elevated titers of anti-transglutaminase antibodies (114.1 U; cut off value: 20 U). When tested for anti-endomysial antibodies, this patient showed positive result. Duodenal biopsy was performed in this patient after being referred to the “Celiac disease Ambulatory, Brasilia University Hospital (HUB)”. The biopsy revealed intestinal mucosal damage with villous atrophy (Marsh 3A).

The prevalence of CD predisposing genotypes found among KD patients was as follows: DQ2 and DQ8: 2.97 % (n=3), DQ2: 13.86 % (n=14), DQ8: 12.87 % (n=13); total of predisposing variants: 29.70%.

Discussion

Considering its unknown etiology, the diagnoses of Kawasaki disease is still a challenge. It depends on clinical manifestations that disappear after approximately 2 weeks, regardless of treatment. However, 15-25% of non-treated patients can develop aneurysms or ectasia which can lead to ischemic heart disease or sudden death in their early adulthood [5]. Although the most accepted hypothesis cites superantigens and/or infectious agents as possible causes of the immunological disorder, some researchers had already described KD as a disease of autoimmune background [8].

Combining the fact of a possible autoimmune etiology and the incredibly high proportion of celiac disease among KD patients (5.5%), found in a study made in Italy [12], an association of both diseases was hypothesized. However, in our studied population, we found only 1 sample that tested positive for celiac disease diagnostic exams, among 101 KD patients (1%). This prevalence does not differ from the prevalence reported for general population which is estimated in 1% [13] nor significantly with previous studies performed in Brazilian general population [14].

As celiac disease can develop at any age [15] and, to avoid underestimation of celiac disease prevalence due to limited age-range (our population consisted in children from 1-15 years old), we performed genetic analysis to search for celiac disease predisposing variants. Our results showed a total frequency of celiac disease predisposing variants of 29.7% which is also inside the expected prevalence range found in general population (25-50%) [2]. This suggests that KD patients may not have

an increased risk of developing celiac disease. Further studies will be necessary to evaluate this possible association and the relevance of screening for celiac disease in these patients.

Conclusion

Considering that the prevalence of CD found between KD patients (1%) was similar to the worldwide prevalence found in the general population (1%), we cannot affirm that there is an association between both conditions. Moreover, when comparing the distributions of CD predisposing genotypes among KD patients and among the general population, they did not show significant differences.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Claudia B. Pratesi for language editing.

Funding: No specific funding was received from any bodies in the public, commercial or not-for-profit sectors to carry out the work described in this manuscript.

Conflict-of-interest statement: The authors declare no conflict of interest.

Key messages:

Prevalence of serologic markers for celiac disease in Kawasaki patients was similar to general population.

Prevalence of predisposing genotypes for celiac disease in Kawasaki patients was similar to general population.

In the studied population, Kawasaki disease was not associated to a celiac disease increased prevalence.

References

1. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annual Review of Immunology*. 2011 Apr 23;29(1):493–525.
2. Sollid LM, Lie B a. Celiac disease genetics: Current concepts and practical applications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2005;3(Figure 1):843–51.
3. Admou B, Essaadouni L, Krati K, Zaher K, Sbihi M, Chabaa L, et al. Atypical Celiac Disease: From Recognizing to Managing. *Gastroenterology Research and Practice*. 2012;2012:1–9.
4. Lionetti E, Catassi C. New Clues in Celiac Disease Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. *International Reviews of Immunology*. 2011 Jul 29;30(4):219–31.
5. Newburger JW, Takahashi M, Gerber MA, Gewitz MH, Tani LY, Burns JC, et al. Diagnosis, treatment, and long-term management of Kawasaki disease: A statement for health professionals from the Committee on Rheumatic Fever, Endocarditis and Kawasaki Disease, Council on Cardiovascular Disease in the Young, American Heart Association. *Circulation*. 2004;110(17):2747–71.
6. Wucherpfennig KW. Mechanisms for the induction of autoimmunity by infectious agents. *Journal of Clinical Investigation*. 2001 Oct 15;108(8):1097–104.
7. Pleister A, Eckels DD. Cryptic infection and autoimmunity. *Autoimmunity reviews*. 2003;2(3):126–32.
8. Takahashi K, Oharaseki T, Yokouchi Y. Update on etio and immunopathogenesis of Kawasaki disease. *Current Opinion in Rheumatology*. 2014 Jan;26(1):31–6.
9. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips a., Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2012;54(1):136–60.
10. Selleski N, Almeida LM, Almeida FC de, Gandolfi L, Pratesi R, Nóbrega YK de M. Simplifying celiac disease predisposing HLA-DQ alleles determination by the real time PCR method. *Arquivos de gastroenterologia*. 2015 Jun;52(2):143–6.
11. Profaizer T, Eckels D, Delgado JC. Celiac disease and HLA typing using real-time PCR with melting curve analysis. *Tissue antigens*. 2011;78(1):31–7.
12. Stagi S. Coeliac disease in patients with Kawasaki disease. Is there a link? *Rheumatology*. 2006;45(7):847–50.
13. Fasano A, Catassi C. Celiac Disease. 2012;2419–26.
14. Pratesi R, Gandolfi L, Garcia SG, Modelli IC, Lopes de Almeida P, Bocca AL, et al. Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population. *Scandinavian journal of gastroenterology*. 2003;38(7):747–50.
15. Gujral N, Freeman HJ, Thomson ABR. Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World journal of gastroenterology*. 2012 Nov 14;18(42):6036–59.

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA

PESQUISA: Prevalência de doença celíaca em pacientes pediátricos com doença de Kawasaki de Brasília.

PESQUISADORA: Alessandra dos Santos Domingues

ORIENTADORA: Profa. Dra. Lenora Gandolfi

Venho por meio deste termo de consentimento livre e esclarecido convidá-lo a autorizar a participação do seu (sua) filho (a) no projeto de pesquisa intitulado: Prevalência de doença celíaca em pacientes pediátricos com doença de Kawasaki de Brasília. Esse projeto é um estudo sobre a doença celíaca, que é uma doença provocada por uma sensibilidade ao glúten.

Entendi que o glúten é encontrado nos alimentos que contem trigo, cevada e centeio, como por exemplo pão, biscoito, bolo, massas entre outros.

Fui informado que a pessoa pode ter a doença celíaca mesmo sem nenhum sintoma e que quando os sintomas ocorrem são comuns diarreia, constipação, vômitos, barriga distendida, perda de peso, fraqueza entre outros.

Fui informado que para o sujeito sob minha responsabilidade participar da pesquisa, excedentes de amostras de sangue colhidos de uma das veias do braço durante o acompanhamento clínico regular da doença de Kawasaki no Hospital da Criança de Brasília (HCB) serão utilizados para realização de testes sorológicos e genéticos para pesquisa da doença celíaca no Laboratório de Pesquisa em Doença Celíaca da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (LabDC / FMUnB).

Foi garantido para mim pelos pesquisadores, que os testes realizados são confiáveis e realizados por profissionais com ampla experiência e que não pagarei nada pelo exame. O resultado do teste será mantido em privacidade e os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador.

No caso do resultado positivo dos testes do sujeito sob minha responsabilidade, será garantido a assistência continuada, no Serviço de Gastroenterologia Pediátrica 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 o sujeito sob minha responsabilidade, pela equipe de Gastroenterologia Pediátrica do HUB. Mesmo após assinatura desse termo de consentimento, ficarei livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento, sem qualquer prejuízo na prestação da assistência para o sujeito sob minha responsabilidade.

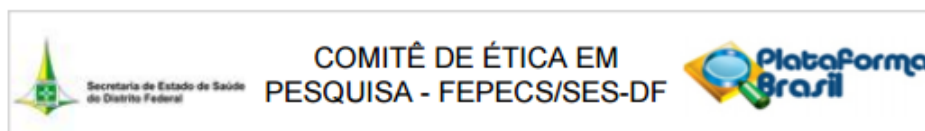
Desta maneira, depois de ter sido devidamente informado, declaro que permito que o sujeito sob minha responsabilidade, participe do projeto e se tiver qualquer dúvida poderei entrar em contato com o responsável pela pesquisa, que é a Profa. Dra. Lenora Gandolfi pelo telefone (61) 31071988 no LabDC/FMUnB ou com Dra. Alessandra dos Santos Domingues pelos telefones: 20285554, (ramais: 5372, 5419, 5255) no HUB ou pelo e-mail: alessandra_gastro@hotmail.com. O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde (FEPECS), que integra a Secretaria do Estado de Saúde do Distrito Federal (SES-DF), também estará disponível pelo telefone (61) 3325-4955 para esclarecimentos.

Brasília, ____ de _____ de _____.

Assinatura do responsável pelo paciente:

Assinatura da pesquisadora responsável:

ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Alterações Laboratoriais na Doença de Kawasaki

Pesquisador: Cristina Medeiros Ribeiro de Magalhães

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 43307114.2.0000.5553

Instituição Proponente: INSTITUTO DO CANCER INFANTIL E PEDIATRIA ESPECIALIZADA - ICIPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.037.234

Data da Relatoria: 27/04/2015

Apresentação do Projeto:

A doença de Kawasaki (DK) é uma vasculite primária aguda de etiologia desconhecida que ocorre frequentemente em crianças mais jovens, caracterizada por febre; conjuntivite; eritema dos lábios, língua e mucosa oral; alterações nas extremidades (eritema e edema); exantema e linfadenopatia cervical. O envolvimento da artéria coronária na DK pode levar a formação de aneurisma ou ectasia dos vasos. No entanto na fase crônica desta doença pode ocorrer estenose progressiva na artéria coronária com desenvolvimento de neoformação vascular intraparietal levando a recanalização das coronárias e eventualmente ao infarto do miocárdio.

Objetivo da Pesquisa:

Geral:

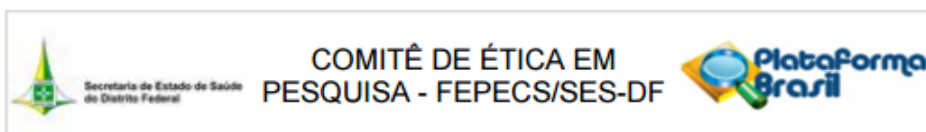
- Avaliar através de um método mais sensível e específico, o aumento da CKMB (creatina quinase) nas fases de coalescência e crônica da DK podendo assim, ser considerado um biomarcador da atividade da remodelação da parede vascular na DK nestas fases.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os sujeitos foram adequadamente identificados. Com os benefícios, espera-se auxiliar no acompanhamento da fase crônica da DK e na avaliação de risco de infarto do miocárdio nessa doença. Os antecedentes científicos que justificam a pesquisa foram apresentados.

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
Bairro: ASA NORTE **CEP:** 70.710-904
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3325-4955 **Fax:** (33)3325-4955 **E-mail:** comitedeetica.secretaria@gmail.com

ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.037.234

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo prospectivo com pacientes com Doença de Kawasaki encaminhados ao Serviço de Reumatologia Pediátrica do Hospital da Criança de Brasília/HCB/SES/DF, no período de julho de 2014 a agosto de 2016. A amostra do estudo será constituída por uma média de 60 pacientes.

Será colhido 3 ml de sangue de cada paciente com diagnóstico de Doença de Kawasaki, nas fases de coalescência e crônica juntamente com os demais exames de rotina para a DK no Laboratório do Hospital, como também dos pacientes de um grupo controle composto de crianças na mesma faixa etária e na fase de coalescência e crônica de outras doenças inflamatórias em remissão (lupus eritematoso sistêmico, artrite idiopática juvenil e em crianças saudáveis). As amostras serão encaminhadas ao laboratório da Universidade de Brasília onde serão realizados a dosagem sérica de CKMB por quimioluminescência. Os dados estudo estatístico serão realizados utilizando o software GraphPad Prism, versão 5.0. Diferenças nos dados entre os grupos serão analisados por meio de análise ANOVA, teste post-hoc de Dunn e teste t de Student, quando necessário. Todos os valores serão expressos como a média \pm DP. As diferenças entre os grupos serão consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: Apresentada. Documento assinado pelo Superintendente do Hospital da Criança de Brasília José Alencar /SES/DF.

Termo de Concordância: Apresentado. Documento assinado pelo Superintendente e pela Chefia da Unidade Clínica do Hospital da Criança de Brasília José Alencar /SES/DF.

Termo de Concordância UnB: Apresentado. Documento assinado pela Coordenadora do Laboratório de Pesquisas em Doenças Imunogenéticas e Crônicas/UnB.

Curriculum Vitae do(s) pesquisador(es): Apresentados.

Cronograma da Pesquisa: Apresentado.

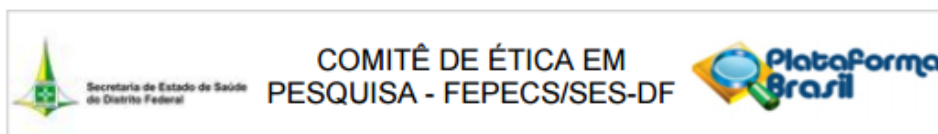
Planilha de orçamento: Apresentada.

TCLE: Apresentado.

Crterios de Inclusão e Exclusão: Definidos.

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
 Bairro: ASA NORTE CEP: 70.710-904
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3325-4955 Fax: (33)3325-4955 E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com

ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.037.234

Recomendações:

O pesquisador assume o compromisso de garantir o sigilo que assegure o anonimato e a privacidade dos sujeitos da pesquisa e a confidencialidade dos dados coletados. Os dados obtidos na pesquisa deverão ser utilizados exclusivamente para a finalidade prevista no seu protocolo, que só poderá iniciar após aprovação pelo CEP/FEPECS/SES/DF.

O pesquisador deverá encaminhar relatório parcial e final de acordo com o desenvolvimento do projeto da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Projeto Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BRASILIA, 27 de Abril de 2015

Assinado por:
Hello Bergo
(Coordenador)

Endereço: SMHN 2 Qd 501 BLOCO A - FEPECS
 Bairro: ASA NORTE CEP: 70.710-904
 UF: DF Município: BRASILIA
 Telefone: (61)3325-4955 Fax: (33)3325-4955 E-mail: comitedeetica.secretaria@gmail.com