

Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

RITA DE CÁSSIA AZEVEDO MARTINS

**Tipagem genética em pacientes com doença celíaca e em seus
parentes de primeiro grau e rastreamento sorológico nestes
familiares, em Brasília.**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof Dr Riccardo Pratesi

**BRASÍLIA
2010**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de
Brasília. Acervo 980607.

Martins, Rita de Cássia Azevedo.
M386t Tipagem genética em pacientes com doença celíaca e
em seus parentes de primeiro grau e rastreamento sorológico
em famílias, em Brasília / Rita de Cássia Azevedo
Martins. -- 2010.
109 f. : il. ; 30 cm.
Tese (doutorado) - Universidade de Brasília, Faculdade
de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde, 2010.
Inclui bibliografia.
Orientação: Ricardo Pratesi.
1. Doença celíaca - Aspectos genéticos. I. Pratesi,
R. - (Ricardo). II. Título.

CDU 616.3-056.5

RITA DE CÁSSIA AZEVEDO MARTINS

**Tipagem genética em pacientes com doença celíaca e em seus
parentes de primeiro grau e rastreamento sorológico nestes
familiares, em Brasília.**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do Título de Doutor em Ciências da
Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr Riccardo Pratesi - Presidente
Universidade de Brasília - UnB

Prof Lenora Gandolfi
Universidade de Brasília - UnB

Prof Inês Cristina Modelli
Universidade de Brasília - UnB

Prof Ana Carolina Acevedo Poppi
Universidade de Brasília - UnB

Prof Luciana Rodrigues Silva
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Prof Mara Santos Cordoba
Universidade de Brasília - UnB

Dedico este trabalho a todos que incentivam a minha vida estudantil, em especial a minha família, o meu amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Ao professor **Riccardo Pratesi**, pela orientação, incentivo, dedicação e paciência. Agradeço pela oportunidade e pela atuação de "pai" em muitos momentos.

À professora **Lenora Gandolfi** pela paciência, amizade e orientação.

Aos meus colegas e colaboradores da Pós Graduação: **Yanna Karla, Gustavo Barra, Lilian Queiroz, Rodrigo Coutinho, Bruno Daher** pela força, amizade, companheirismo e ajuda em várias e diferentes etapas deste trabalho.

Ao jornalista e marido **Alexandro Martello** pela paciência, incentivo e apoio por todos esses anos. Também pela colaboração nos trabalhos de correção do português.

Ao colega de trabalho **Agildo Magabeira Filho** pela ajuda nos trabalhos de tabulação de dados e estatística.

Aos **nossos professores da Pós Graduação** por terem me recebido como aluna em suas disciplinas.

Aos **nossos pacientes**, que participaram da pesquisa.

Aos **meus colegas de trabalho** pelo apoio e compreensão em várias ocasiões.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para realização desta pesquisa.

O meu Muito Obrigada!

RESUMO

Introdução: Os genes do HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) são encontrados de 80% a 100% dos casos de doença celíaca (DC). Nos casos DQ2 negativos, pode-se encontrar o HLA-DQ8, que está associado ao haplótipo DR4 (DRB1*04).

Objetivos: Determinar a freqüência de DC entre parentes de celíacos e dos genes do HLA-DQ2 e DRB1*04 entre pacientes celíacos e seus parentes.

Métodos: Foram realizados testes sorológicos em 207 parentes de primeiro grau de 90 pacientes celíacos para a determinação da presença de anticorpos IgA anti-transglutaminase (IgA-tTG) e IgA anti-endomísio (IgA-EMA). Os parentes com resultados positivos foram submetidos à biópsia intestinal. Tanto nos pacientes celíacos, como em seus parentes, foi determinada a freqüência dos alelos HLA-DQA1*0501, DQB1*0201 e DRB1*04 por meio de reação em cadeia de polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction).

Resultados: Quatorze (6,7%) novos casos de DC foram identificados entre os 207 parentes investigados e todos eles apresentaram os alelos predisponentes HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e/ou DRB1*04/DQ8, seja isoladamente ou em associação. Entre os pacientes celíacos, o HLA-DQ2 estava presente seja isoladamente ou em conjunto com a DRB1*04, em 86,6% dos casos. Os demais casos apresentaram pelo menos um dos alelos pesquisados e apenas um deles não apresentou nenhum dos alelos predisponentes. Já no grupo de parentes de celíacos, pelo menos um dos alelos de risco foi encontrado em 94,6% e o HLA-DQ2 foi encontrado sozinho ou em conjunto com o alelo DRB1*04 em 57,4%. Onze (5,3%) dos parentes de celíacos não apresentaram nenhum dos alelos predisponentes para DC.

Conclusão: As freqüências encontradas no estudo da presença dos alelos HLA predisponentes para DC e do rastreamento sorológico são semelhantes às descritas em estudos já realizados entre parentes de celíacos. A determinação dos genes de susceptibilidade à DC entre parentes de celíacos é útil na exclusão de indivíduos a serem acompanhados por meio de testes sorológicos, e nos casos em que há dúvidas em relação ao diagnóstico da doença.

Palavras-chave: Doença Celíaca, parentes de celíacos, testes sorológicos, HLA, triagem genética.

ABSTRACT

Introduction: HLA-DQ2 genes (DQA1*0501 and DQB1*0201) can be found from 80% to 100% cases of celiac disease (CD). In HLA-DQ2 negative patients, it is possible to find the HLA-DQ8, which is associated with haplotype DR4 (DRB1*04).

Objectives: To determine the frequency of CD among celiac patients' relatives and, as well, DQ2 genes and HLA-DRB1*04 among celiac patients and relatives.

Methods: Serologic tests were performed in 207 first-degree relatives of 90 celiac patients in order to determine the presence of IgA anti-transglutaminase (IgA-tTG) and IgA anti-transglutaminase (IgA-EMA). Relatives with positive results underwent intestinal biopsy. It was determined the frequency of HLA-DQA1*0501, DQB1*0201 and DRB1*04 by polymerase chain reaction (PCR - Polymerase Chain Reaction) both in celiac patients and their relatives. **Results:** Fourteen (6.7%) new cases of CD were identified among 207 relatives investigated and all of them had predisposing alleles HLA-DQ2 (DQA1*0501 and DQB1*0201) and/or DRB1*04/DQ8, either alone or in combination. Among patients with celiac disease, HLA-DQ2 was present either alone or in combination with DRB1*04 in 86.6% of the studied cases. The remaining patients had, at least, one of the alleles studied. Only one of them did not present any of the predisposing alleles. Within the group of celiac patients' relatives, at least one risk allele was found in 94.6%, and HLA-DQ2 was found alone or in combination with the allele DRB1*04 in 57.4%. Eleven (5.3%) relatives have not shown any predisposing alleles to DC. **Conclusion:** Frequencies found are similar to those described in studies already carried out among relatives of celiac patients. The determination of susceptibility genes for CD among relatives of celiac patients is useful for excluding individuals to be accompanied by serological tests, and where exist doubts about the diagnosis.

Keywords: Celiac disease, relatives of celiac patients, serological tests, HLA, genetic screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama da extração e fracionamento do glúten.....	20
Figura 2 - O cromossomo 6 e as três classes de genes no MHC humano.....	22
Figura 3 - Modelo de patogênese da DC.....	25
Figura 4 - O iceberg celíaco e o espectro da sensibilidade ao glúten.....	29
Figura 5 - Exemplo de teste de imunofluorescência positivo, mostrando característico padrão verde brilhante presente no tecido conjuntivo que circunda as fibras da camada muscular do esôfago do primata <i>Cebus apella</i> (ampliação de 400x).....	33
Figura 6 - Esquema de classificação das anormalidades da mucosa proposto por Marsh.....	35
Figura 7 - Exemplo de biópsia intestinal mostrando atrofia das vilosidades total com hipertrofia das criptas e aumento do número de linfócitos intra-epiteliais.....	36
Figura 8 - Pacientes com DC que expressam HLA-DQ ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$), em cis (no mesmo cromossomo) em indivíduos DR3 DQ2 ou em trans (em cromossomos diferentes) em indivíduos heterozigotos DR5 DQ7/ DR7 DQ2.....	39
Figura 9 - Resultado da PCR para detecção dos alelos DQA1*0501, DQB1*0201 e DRB1*04.....	50
Figura 10 – Exemplos de resultados da PCR para detecção dos alelos DQA1*0501 e DQB1*0201.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de parentes de celíacos que relataram sinais e sintomas gastrointestinais e não relacionados ao trato gastrointestinal.....53

Tabela 2 - Frequência global dos genes DQA1*0501, DQB1*0201, do HLA-DQ2 e do gene DR1*04 em pacientes celíacos e seus parentes.....54

Tabela 3 - Número de celíacos e de parentes, em relação à presença dos alelos do HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e DRB1*04.....55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Prioridades de pesquisa identificadas no IX Simpósio Internacional sobre Doença Celíaca.....	15
Quadro 2 - Resumo da Técnica de PCR.....	49
Quadro 3 - Descrição dos resultados do grupo de parentes com sorologia positiva.....	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGA – Anticorpo antigliadina

CAA – Célula apresentadora de antígenos

DC – Doença Celíaca

ELISA – Ensaio Imunoenzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay)

EMA – Anticorpo antindomísio

ESPGHAN – Sociedade Européia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição
Pediátrica (European Society of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition)

FITC – Isoticianato de Fluresceína

GFD - dieta livre de glúten (gluten free diet)

HLA – Antígeno Leucocitário Humano (Human Leucocyte Antigen)

HUB – Hospital Universitário de Brasília

IgA – Imunoglobulina da classe A

IgG – Imunoglobulina da classe G

INF – Interferon

IL – Interleucina

LIE – Linfócito intraepitelial

LP – Lâmina própria

MAP - atividade mitogênica da proteína quinase

MHC – Complexo de Histocompatibilidade Maior (Major Histocompatibility Complex)

MMPs - Metaloproteinases de matriz

NK - Natural Killer

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase (Polymerase Chain Reaction)

SNP - Nucleotídeo de Polimorfismo Único (Single Nucleotide Polymorphism)

TNF – Fator de necrose tumoral (Tumor Necrosis Factor)

tTG – Anticorpo antitrasglutaminase

UnB – Universidade de Brasília

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	13
1. A DOENÇA CELÍACA.....	13
1.1 DEFINIÇÃO E HISTÓRICO.....	13
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.3 PATOGÊNESE.....	19
1.4 QUADRO CLÍNICO.....	27
1.5 DIAGNÓSTICO.....	31
2. A GENÉTICA DA DOENÇA CELÍACA.....	37
OBJETIVOS.....	44
MÉTODOS.....	45
RESULTADOS.....	52
DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
APÊNDICE 1. Artigo para publicação.....	85
APÊNDICE 2. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	105
APÊNDICE 3. Questionário Padronizado.....	107
ANEXO 1. Aprovação do Comitê de Ética.....	108
ANEXO 2. Aceitação da revista para publicação do artigo.....	109

INTRODUÇÃO

1. A DOENÇA CELÍACA

1.1 DEFINIÇÃO E HISTÓRICO

A Doença Celíaca (DC) é uma enteropatia crônica imuno-mediada, induzida pela intolerância permanente a proteínas do glúten presentes em cereais e afins, em indivíduos geneticamente predispostos, que se caracteriza por lesões histológicas jejunais típicas que mostram atrofia vilositária, hiperplasia das criptas e infiltração linfocitária, resultando em sérios problemas na função absorptiva intestinal. (Marsh, 1992; Maki e Collin, 1997; Kennedy e Feighery, 2000; Hill *et al*, 2005)

A descoberta de que a exclusão do glúten da dieta do celíaco resulta na reversão clínica e histológica das anormalidades da mucosa intestinal e que a sua reintrodução na alimentação promove recorrência das anomalias relacionadas à DC, revelou que a manutenção de uma dieta livre desta proteína, por toda a vida, é a melhor forma do celíaco prevenir a enteropatia crônica e reduzir o risco de desenvolvimento de linfomas e carcinomas intestinais. (Corrão *et al*, 2001)

Historicamente, alguns acontecimentos tornaram-se marcos importantes para a evolução dos conhecimentos relacionados à DC. O primeiro deles foi a descrição da doença pelo médico grego Aretaeus da Capadócia no séc. II dC, que utilizou o termo grego "Koiliakos" (aqueles que sofrem do intestino) para designar a desordem. Aretaeus descreveu uma doença diarréica que se prolongava por mais de dois dias, que acometia mais adultos, especialmente mulheres, causando comprometimento do estado geral com edema, palidez, fraqueza e atrofia do corpo. (Paveley, 1988)

Apenas em 1888, entretanto, o médico Samuel Gee, do Hospital Saint Bartolomew em Londres (Reino Unido), deu nova atenção à doença descrita por Aretaeus, a qual designou por "afecção celíaca". Gee observou que, tanto em adultos quanto em crianças de um a cinco anos de idade, a desordem se

apresentava como uma indigestão crônica e se manifestava por sintomatologia característica, na qual predominavam os seguintes sintomas: abdome flácido e freqüentemente distendido e diarréia não líquida, com fezes volumosas e pálidas. Samuel Gee assinalou, também, que a afecção era uma condição que persistia por toda a vida e que a dieta do paciente era importante. (Visakorpi, 1996)

O conceito de que a alimentação dos indivíduos tinha influência no desenvolvimento da DC foi reforçado pela observação da eficácia da dieta com bananas na reversão dos sintomas da doença em crianças. Essas crianças, no entanto, tiveram ainda excluídos da sua alimentação o pão, batatas e cereais (Hass, 1924 apud Marsh, 1992).

Mas foi somente durante a 2ª Guerra Mundial que os produtos do trigo e cereais foram confirmados como desencadeadores da afecção. Com o racionamento de alimentos imposto pela ocupação alemã, reduziu-se drasticamente o fornecimento de pão à população holandesa. Nesse período, o pediatra holandês, Willem Karel Dicke, observou que as crianças com "afecção celíaca" melhoraram da sua doença apesar da grave carência de alimentos. Dicke notou ainda que, quando aviões deixaram cair pães na Holanda, as crianças celíacas pioravam rapidamente. Essa observação foi marcante para a elucidação das causas da DC, sendo corroborada por Dicke, Weijers - outro pediatra holandês, e pelo bioquímico J.H. van de Kamer. Em estudos clássicos, eles descreveram um método para dosagem de gordura fecal, que viria a demonstrar que o trigo e o centeio eram responsáveis pela esteatorréia dos pacientes celíacos. Subsequentemente, estes pesquisadores, em conjunto com outros, desenvolveram experimentos que identificavam a gliadina como o componente do trigo ativador da doença. Diante desse conhecimento, foi preconizada a dieta livre de glúten como forma de tratamento para a DC (Marsh, 1992; van Berge-Henegouwen e Mulder, 1993, Troncone, 1996).

Outro marco importante na história da DC foi a observação do médico inglês J. W. Paulley de que a mucosa intestinal de biópsia de um paciente celíaco não tinha o aspecto habitual (Marsh, 1992). Nos anos 50, essa descoberta fomentou o desenvolvimento de estratégias para a análise da mucosa intestinal. Nesse período, o tenente coronel americano W. H. Crosby, e o engenheiro Heinz W. Kugler desenvolveram uma pequena cápsula que poderia ser engolida pelo paciente, permitindo efetuar biópsias do intestino sem necessidade de cirurgia. Essa cápsula foi denominada cápsula de Crosby (Paveley, 1988). Esse aparelho e a sua variante,

a cápsula de Watson, são ainda hoje utilizados no diagnóstico da doença celíaca. A biópsia, por meio dessas cápsulas, pode ser obtida com mecanismo de sucção-guilhotina (Walker-Smith, 1990). Nos dias atuais, porém, as amostras para a biópsia são mais freqüentemente obtidas por meio de endoscopia gastrointestinal, com instrumentos usuais de fibra ótica.

Mais recentemente, a descoberta da transglutaminase tecidual como auto-antígeno da DC (Dieterich *et al*, 1997); o envolvimento da zonulina no aumento da permeabilidade intestinal na fase inicial da doença (Fasano *et al*, 2000); a disponibilidade e a crescente confiabilidade dos testes sorológicos; a constatação das diferentes formas de apresentação da doença com a caracterização dos casos atípicos e silenciosos antes subdiagnosticados e; a identificação de marcadores genéticos, proporcionaram um progresso não só no diagnóstico da DC, como também na sua epidemiologia e na compreensão de sua fisiopatologia.

Atualmente, um esforço multidisciplinar internacional está gerando dados significativos para responder desafiadoras metas de investigação ligadas à DC, como aquelas identificadas e discutidas em 2000 no IX Simpósio Internacional sobre Doença Celíaca (Quadro 1).

Quadro 1 - Prioridades de pesquisa identificadas no IX Simpósio Internacional sobre Doença Celíaca

Áreas de Pesquisa
1. Busca dos genes de suscetibilidade para a DC.
2. Desenvolvimento de vacina contra a DC.
3. Quem, quando e como fazer screening para DC.
4. Engenharia de grãos sem glúten.
5. Prevenção do aumento da permeabilidade intestinal zonulina-dependente.
6. Desenvolvimento de testes não invasivos, rápidos e confiáveis para o diagnóstico e acompanhamento da DC.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Inicialmente, a DC era considerada uma síndrome de má absorção rara que ocorria na infância e que afetava predominantemente europeus ou indivíduos de ascendência européia. Os estudos epidemiológicos iniciais eram direcionados à população pediátrica e concentravam-se, essencialmente, na apresentação clínica típica da doença.

Entretanto, o advento de testes sorológicos mais confiáveis e a realização de estudos de rastreamento em grupos de risco e na população geral de várias etnias, permitiram a divulgação de muitos casos atípicos e assintomáticos, levando a uma maior conscientização a respeito da variável apresentação da DC e demonstrando que a doença é muito mais presente do que se imaginava (Catassi *et al*, 1995, Guandalini e Gupta, 2002).

Hoje, a DC é reconhecida como um distúrbio comum, sendo encontrada em diferentes países e apresentado uma crescente prevalência na população geral, com grande proporção dos novos casos diagnosticados entre pacientes com manifestações extra-intestinais (Catassi & Cobellis, 2007).

Embora, a DC seja uma das mais comuns doenças auto-imunes, ainda hoje, a grande maioria dos indivíduos afetados permanece sem diagnóstico (van Heel e West, 2006; Catassi *et al*, 2007), provavelmente devido às apresentações atípicas ou assintomáticas da doença.

Um dos mais antigos estudos epidemiológicos, realizado em 1950 na Inglaterra e País de Gales, estabeleceu uma incidência de DC de 1:8000, enquanto que uma incidência de 1:4000 foi detectada na Escócia (Davidson *et al*, 1950). Nos estudos mais recentes, entretanto, observa-se que a prevalência de DC chega, em determinadas populações, a um caso em cada 100 a 300 indivíduos (Ascher *et al*, 1991; Catassi *et al*, 1996; Not *et al*, 1998; Mustalahti *et al*, 2004).

Na Europa Ocidental, onde é observada a prevalência mais alta, a DC afeta cerca de 1% da população geral (Catassi *et al*, 1994; Collin *et al*, 1997; Maki *et al*, 2003; Dube *et al*, 2005). Como exemplos, destacam-se a prevalência encontrada de 1:500 casos de DC entre doadores de sangue dinamarqueses (Weile *et al*, 1996); de

1:250 casos entre suecos (Grodzinsky *et al*, 1992) e de 1:200 entre crianças italianas (Catassi *et al*, 1996).

Nos lugares com alta proporção de populações de origem europeia, como América do Norte e Austrália, a estimativa da prevalência da DC também é de 1 caso para cada 85 a 300 pessoas (Not *et al*, 1998, Hovell *et al*, 2001, Lebenthal e Branski, 2002).

Nos Estados Unidos, a DC foi inicialmente considerada rara (Rossi *et al*, 1993). No entanto, estudos recentes mostraram que a ocorrência da doença está de acordo com a maioria dos estudos europeus, o que sugere que a DC tenha sido subdiagnosticada. Em estudo realizado com 13.145 indivíduos da população geral norte-americana, subdivididos em grupos de risco e não risco para a DC, foram encontradas prevalências da doença de: 1:22 entre parentes de primeiro grau, 1:39 entre parentes de segundo grau e de 1:56 entre pacientes sintomáticos. No grupo de indivíduos considerados fora de risco para a DC, a prevalência encontrada da doença foi de 1:133 (Fasano *et al*, 2003)

A DC é encontrada também na Índia e a Ásia (Lebenthal e Branski, 2002), e é provavelmente subdiagnosticada América do Sul (Gandolfi *et al*, 2000) e na África do Norte (Catassi *et al*, 2001). Ela aparece de forma rara entre os povos de origem puramente africana, chinesa ou japonesa (Farrel e Kelly, 2002). Os estudos com o objetivo de determinar a prevalência da doença celíaca nessas regiões são, no entanto, insuficientes, sendo conseqüentemente necessários para esclarecer a real prevalência da doença em outras etnias. Um exemplo é o estudo de Catassi *et al* (1999), que demonstrou, no Saara Ocidental, uma das mais altas prevalências de DC no mundo: 5,6% entre 989 crianças, evidenciando que essa região pode apresentar uma prevalência da doença igual ou superior a prevalência da doença nos países europeus.

Na América Latina, apesar das características epidemiológicas da DC serem ainda obscuras, estudos como o de Gomez *et al* (2001) relataram uma prevalência da doença de 1:167, entre 2.000 indivíduos adultos na região de La Plata, Argentina.

No Brasil, a prevalência de DC é aparentemente semelhante à encontrada em países europeus. Estudos de rastreamento realizados no decorrer da última década mostraram uma prevalência que varia de 1:214 a 1:681 em doadores de sangue presumivelmente saudáveis (Gandolfi *et al*, 2000; Melo *et al*, 2006; Pereira *et al*,

2006; Oliveira *et al*, 2007) e de 1:52 a 1:275 na população geral em diferentes regiões do Brasil (Pratesi *et al*, 2003; Trevisol *et al*, 2004; Crovella *et al*, 2007).

1.3 PATOGÊNESE

A identificação dos mecanismos pelos quais se processa a patogênese da doença celíaca teve início com a descoberta do papel do glúten e com o desenvolvimento da biópsia da mucosa intestinal. Após inúmeros estudos, hoje se sabe que a DC tem uma etiopatogênese multifatorial que envolve fatores ambientais, imunológicos e genéticos, cuja interação pode explicar a heterogeneidade de manifestações clínicas presentes nos pacientes.

Considera-se que o processamento anormal de antígenos pelas células epiteliais intestinais, em conjunto com as propriedades intrínsecas das gliadinas, assim como a presença de genes do HLA-DQ, são fatores preponderantes para a patogênese da DC (Robins *et al*, 2005).

O principal fator ambiental envolvido na DC é a presença do glúten na dieta. O glúten é uma glicoproteína insolúvel em água, presente nos cereais como trigo, centeio e cevada, constituindo 90% das proteínas destes cereais.

As proteínas do glúten responsáveis pela ação deletéria tissular em pacientes celíacos são coletivamente chamadas de prolaminas. A prolamina é específica para cada cereal e apresenta concentrações diferentes, recebendo diferentes denominações: gliadina (trigo), secalina (centeio), hordeína (cevada) e avenina (aveia). O alto conteúdo dos aminoácidos glutamina (>30%) e prolina (>15%) nestes cereais, que lhes confere a capacidade de desencadeamento da DC, não é observado nas prolaminas do arroz e milho, nas quais predominam os aminoácidos alanina e leucina.

A ação da aveia no desenvolvimento da DC ainda é controversa (Janatuinen *et al*, 2002). Apesar da aveia apresentar a mesma seqüência de aminoácidos das prolaminas dos outros cereais, ela é mais tolerada pelos celíacos. Isso provavelmente se deve ao fato de que a aveia contém uma concentração relativamente menor das proteínas ativas na indução da DC (Schuppan, 2000).

A gliadina - prolamina presente no trigo - é a considerada mais ativa no desenvolvimento da DC (Barbieri, 1996; Holmes e Catassi, 2000). A gliadina pode ser obtida do glúten por meio da extração com álcool e por eletroforese se dividir em quatro frações: a alfa, a beta, a gama e a ômega. Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a alfa-gliadina é mais ativa no desenvolvimento dos efeitos

prejudiciais da DC. As seqüências de aminoácidos da alfa-gliadina (prolina-serina-glutamina-glutamina – PSQQ e glutamina-glutamina-glutamina-prolina - QQQP) são peptídeos comuns na gliadina e são sugeridos como os seus fragmentos imunogênicos (Wieser, 1996). As frações beta e gama podem também ser responsáveis pela lesão celíaca, enquanto a ação da fração ômega no desenvolvimento da DC ainda é discutível.

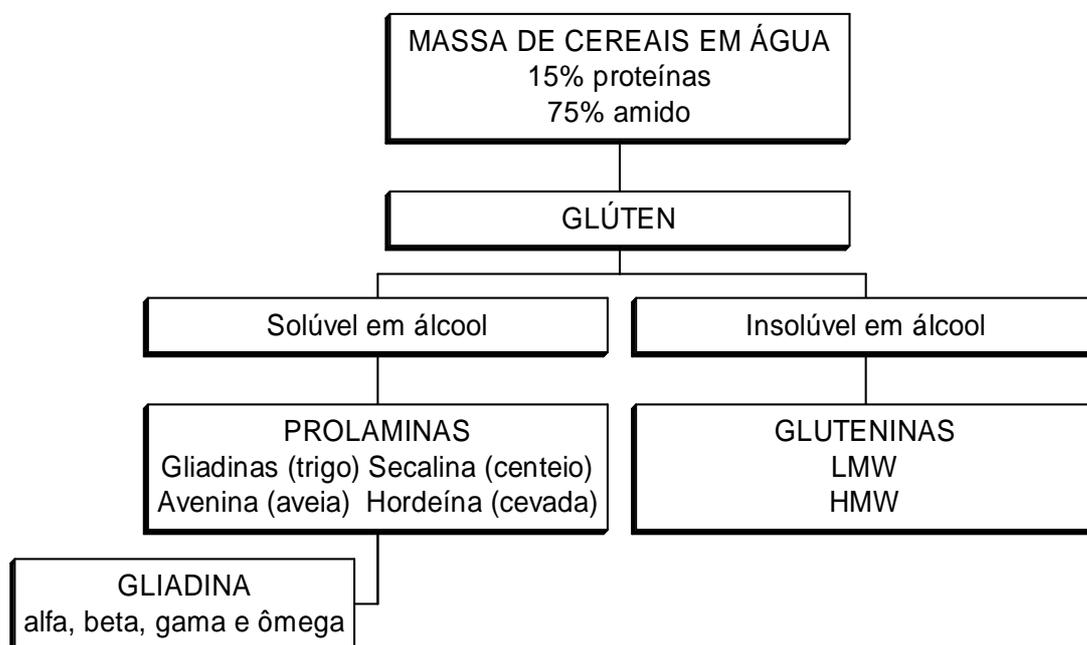


Figura 1 - Diagrama da extração e fracionamento do glúten

Recentemente, o peptídeo 56-75 da alfa-gliadina, contido no peptídeo 33-mer, foi isolado e identificado como o principal iniciador da resposta inflamatória ao glúten em pacientes celíacos, pois é rico em glutamina e prolina, apresenta resistência à digestão, penetra a barreira epitelial e produz elevada estimulação antigênica às células CD4 (Shan *et al*, 2002). Além disso, o peptídeo reage a transglutaminase tecidual com seletividade substancialmente maior do que o substrato natural desta enzima e, ainda, homólogos desse peptídeo foram

encontrados em todos os grãos de alimentos que desencadeiam a DC e estavam ausentes em todos os grãos de alimento não desencadeadores da doença.

Ainda em relação aos aspectos ambientais da DC, destaca-se que enteroinfecções causadas pelo adenovírus humano tipo 12 (AD12) podem ter um papel importante na patogênese da doença celíaca. Essa hipótese se deve ao fato de que anticorpos contra determinantes antigênicos produzidos durante a infecção intestinal viral causada pelo adenovírus, podem ter reação cruzada com a gliadina, uma vez que foi observada homologia de partes da sequência de aminoácidos da proteína E1b do adenovírus com a alfa-gliadina. (Kagnoff *et al*, 1984)

Além do fator ambiental, o envolvimento dos fatores imunológicos e genéticos na DC fica evidente na reação inflamatória intestinal com a observação de uma série de alterações imunológicas e com o aumento da expressão de antígenos da classe II do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC).

Entre as principais alterações imunológicas dos pacientes celíacos, destacam-se a presença de taxa elevada de linfócitos intraepiteliais (LIE), expressando os receptores $\gamma\delta$, com a ativação de linfócitos predominantemente CD8+ e CD4+, respectivamente no epitélio e na lâmina própria (LP), a ativação de citocinas pró-inflamatórias, o aumento do número de plasmócitos e a intensa produção de imunoglobulinas de classe A, M e G contra a gliadina, tecidos conjuntivos e transglutaminase tecidual. (Trejdosiewicz *et al*, 1991; O'Mahony *et al*, 1991; Briani *et al*, 2008)

A descoberta da enzima transglutaminase (tTG) como autoantígeno endomisial (Dieterich, 1998) permitiu avanços no esclarecimento da patogênese da DC. A tTG é uma enzima intracelular, dependente de cálcio, que cataliza a ligação covalente entre proteínas. De acordo com os modelos explicativos da patogênese da doença celíaca, a tTG seria liberada pelas células na lâmina própria, também em consequência da destruição da mucosa intestinal causada pelos peptídeos do glúten. A partir daí, a enzima poderia promover a deaminação da gliadina, gerando resíduos ácidos e com cargas negativas, de ácido glutâmico; ou formar complexos tTG-gliadina. Esses neo-epítomos provocariam, então, o início e uma potencialização da resposta imune. O que dá suporte a teoria é o fato de que a gliadina é um excelente substrato para a tTG devido ao seu alto teor de glutamina (Sollid *et al*, 1997; Farrell e Kelly, 2002). No entanto, não está ainda esclarecido se a tTG tem alguma outra função que não seja modificar a gliadina.

Em relação à participação de fatores genéticos na patogênese da DC, estudos apontam que a suscetibilidade da doença é fortemente influenciada pelo MHC e seus produtos gênicos, os antígenos leucocitários humanos (HLA), em especial os genes do HLA de classe II dos *locus* DQ que compõe o HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e o HLA-DQ8 (DQA1*0301 e B1*0302). (Sollid *et al*, 1989; Spurkland *et al*, 1992; Sollid & Thorsby, 1993; Sollid, 2000; Karell *et al*, 2003; Bonamico *et al*, 2006)

O MHC está localizado no braço curto do cromossomo 6 e é dividido em regiões que contém grupos de genes codificadores de moléculas de classe I, que abrangem os genes A, B, C, E, F e G; de classe II, representados pelos genes da região HLA-D que é dividida em três *loci*: DR, DQ e DP; e de classe III, que contém um grupo diverso de genes que codificam as moléculas do sistema complemento e outras proteínas (Mazzilli, 1997). Hoje se sabe que o MHC compreende mais de 200 *locus* genéticos e é a região mais polimórfica do genoma humano (Louka & Sollid, 2003). (Figura 2)

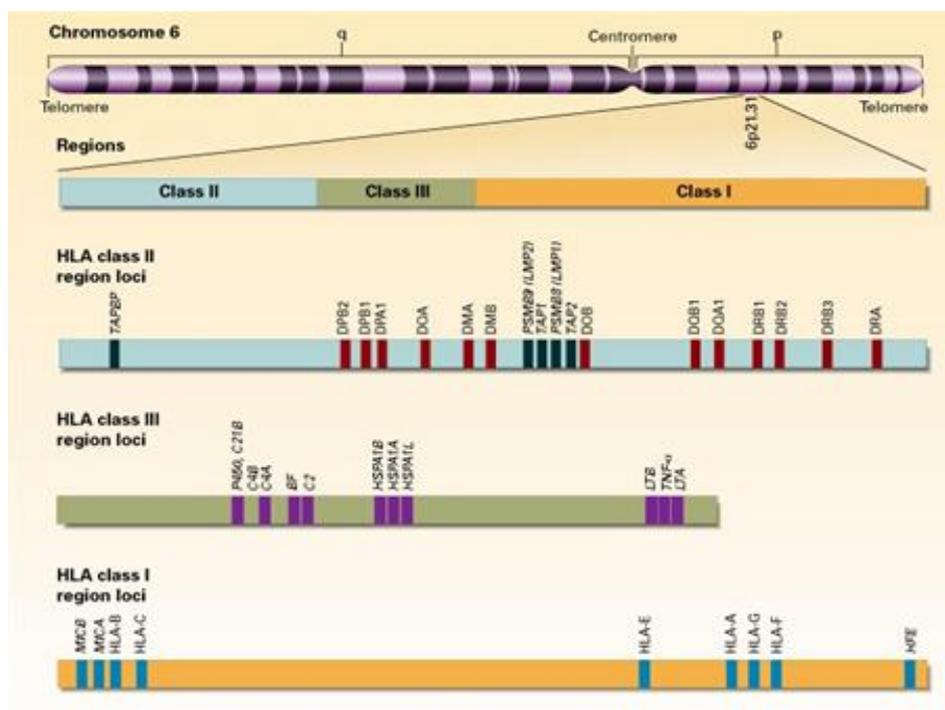


Figura 2 - O cromossomo 6 e as três classes de genes no MHC humano

Fonte: http://www.e-gastroped.com.br/jun05/celiaca_antigen.htm

A suscetibilidade para, ao menos 50 doenças, incluindo a DC, tem sido associada com alelos do HLA de classe I ou classe II. Essas moléculas têm a função biológica de ligar peptídeos diversos e formar complexos que são reconhecidos pelo linfócito T específico para este determinado antígeno. Diferentes tipos celulares podem expressar as moléculas do MHC de classe II e assim servir de célula apresentadora de antígenos (CAA) para os linfócitos T, que só reconhecem os antígenos protéicos se estes forem apresentados por estas moléculas HLA. Em geral, as moléculas de classe I são expressas por praticamente todas as células nucleadas, enquanto as moléculas de classe II são expressas nos linfócitos B, macrófagos, células dendríticas e células endoteliais. Os antígenos associados com as moléculas de classe I são reconhecidos pelos linfócitos T-citotóxicos CD8+ e os de classe II são reconhecidos pelos linfócitos T-auxiliares CD4+.

O HLA-DQ2 tem um papel fundamental na DC, por apresentar peptídeos de glúten de células CD4 + na lâmina própria do intestino (Arentz-Hansen *et al*, 2000). A associação do HLA na doença celíaca pode ser explicada por uma capacidade superior do HLA-DQ2 se ligar à seqüência de aminoácidos do glúten ricos em prolina que sobreviveram a digestão gastrointestinal e que foram deaminados pela transglutaminase tecidual (Kim *et al*, 2004).

Como conclusão do conhecimento acumulado sobre a atuação dos fatores relacionados na etiopatogênese da DC, propõe-se que uma série de eventos seqüenciais desencadeariam a doença, desde a chegada do glúten a lâmina própria do intestino até o desenvolvimento das anormalidades na mucosa intestinal observadas na DC.

Em circunstâncias fisiológicas normais, o epitélio intestinal, com suas junções intercelulares firmes intactas, serve como a principal barreira para a passagem de macromoléculas, como o glúten. No entanto, um número pequeno, mas imunologicamente significativo de frações de antígenos pode atravessar a barreira de defesa. A grande maioria das proteínas absorvidas (até 90%) atravessa a barreira intestinal via transcelular, seguida por degradação lisossomal que converte as pequenas proteínas em peptídeos não imunogênicos. O restante dos peptídeos é transportado como proteínas intactas, resultando em respostas imunes antígeno-específicas. Este último fenômeno utiliza a via paracelular, que envolve uma regulação das junções intercelulares firmes levando à antígeno tolerância. Quando a

integridade do sistema das junções intercelulares firmes é comprometida, como na DC, uma resposta imunitária a antígenos, no caso o glúten, pode se desenvolver.

A chegada da gliadina à mucosa intestinal pode ser consequente à presença da zonulina, um peptídeo intestinal recentemente reconhecido análogo à toxina “ocludente” da zonula do *Vibrio cholerae*, que está envolvida na regulação fisiológica intercelular do epitélio intestinal e parece ser responsável, pelo menos em parte, pelo aumento da permeabilidade característica da fase inicial da DC (Wang *et al*, 2000; Fasano *et al*, 2000; Fasano, 2001).

Além da ação da zonulina, infecções gastrointestinais (Sollid, 2002) e deficiências nutricionais poderiam ser ainda, fatores facilitadores do ingresso da gliadina na lâmina própria.

Após a entrada dos pequenos peptídios provenientes da digestão da gliadina, estes seriam capturados e deaminados pela transglutaminase tecidual, formando complexos gliadina-tTG que seriam reconhecidos pelas células apresentadoras de antígenos, processados e apresentados por meio dos produtos de genes HLA às células T CD4+ (Marsh *et al*, 1992; Holmes e Catassi, 2000). Essa modificação da gliadina aumenta a afinidade do peptídeo ao receptor de ligação de antígenos do HLA-DQ2 (Schuppan, 2000; Farrell e Kelly, 2002). As células T CD4+, então, reconheceriam estes peptídeos por meio de seus receptores (TCR) e emitiriam resposta do tipo Th1 e do tipo Th2 com secreção de citocinas pró-inflamatórias, ao mesmo tempo em que ativariam as células B a sofrer diferenciação celular para a produção de anticorpos. A resposta do tipo Th1 produziria interferon- γ (IFN), linfotoxinas e fator de necrose tumoral (TNF), os quais provocariam a proliferação celular nas criptas intestinais e induziriam a secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs) pelos fibroblastos intestinais, causando a destruição da mucosa característica da DC (Pender *et al*, 1997; Kagnoff, 2005). Um infiltrado inflamatório, com células mononucleares e fibroblastos, ativaria ainda mais a produção de transglutaminase e a deaminação da gliadina, potencializando a apresentação dos antígenos e a resposta imune das células T. A resposta do tipo Th2 produziria interleucinas (IL), que promoveriam a maturação dos plasmócitos e consequente produção de anticorpos contra a gliadina, tecidos conjuntivos, transglutaminase tecidual e complexos gliadina-tTG. Todos esses processos acontecem como um ciclo vicioso que levam à perda das vilosidades e à hiperplasia das criptas típicas da DC.

Na patogênese da DC, ainda é observado um aumento na expressão de LIE- $\gamma\delta$. A ingestão da gliadina desencadeia a produção pelos macrófagos intestinais da interleucina-15 (IL-15), que, por sua vez, estimula as propriedades citotóxicas dos LIE, tendo um papel fundamental na modulação e condução da infiltração por estas células - que provocarão a lesão dos enterócitos e conseqüente atrofia vilositária. Para o futuro, a inibição da IL-15 pode ter o potencial para o controle da doença celíaca (Maiuri *et al*, 2001).

Além dos elevados níveis de IL-15, ainda foram observados, em pacientes celíacos, altos níveis das proteínas NKG2D, MIC (MICA) e DAP10 e atividade significativa de células natural Killer (NK) acompanhada de ativação da atividade mitogênica pela proteína quinase (MAP) (Meresse *et al*, 2004). Há hipótese de que a atrofia das vilosidades na DC possa ser atribuída à destruição dos enterócitos mediada pelos LIE, envolvendo interação NKG2D-MICA, após expressão gliadina induzida de MICA no epitélio intestinal (Hue *et al*, 2004).

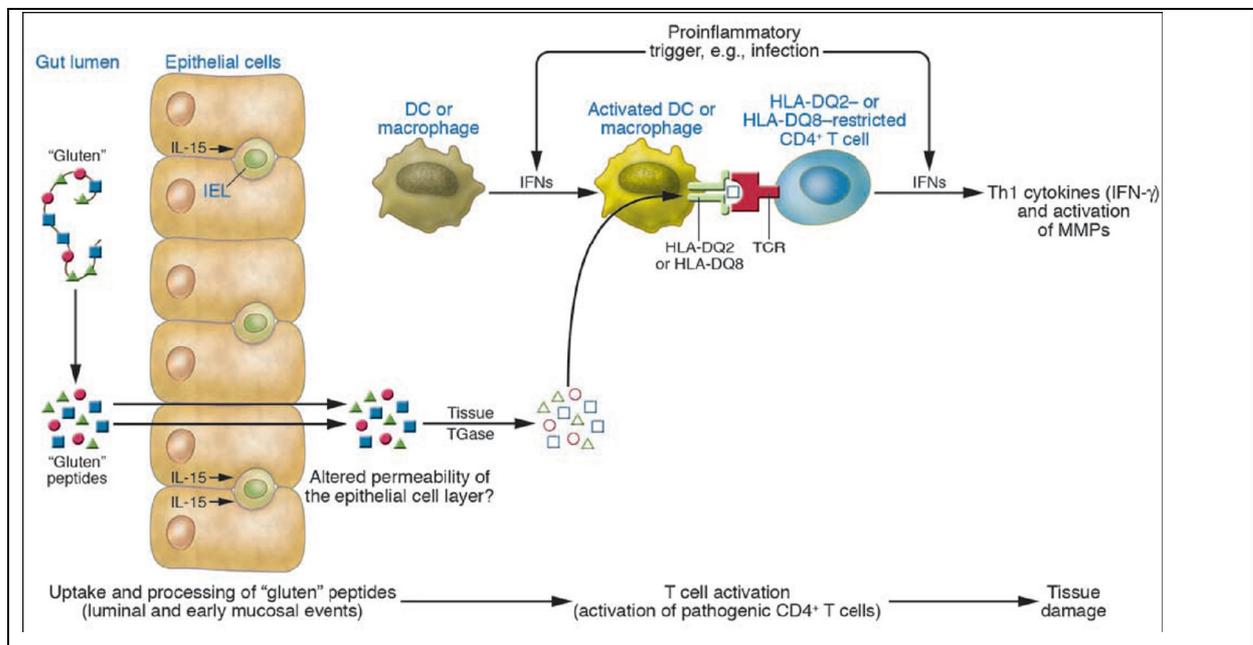


Figura 3 - Modelo de patogênese da DC

Fonte: Kagnoff M.F. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):41-9. Review.

O número de LIE não está condicionado à dieta sem glúten, pois o seu nível continua alterado mesmo em pacientes em dieta, sendo, portanto, uma característica permanente dos pacientes com DC (Savilahti *et al*, 1997).

1.4 QUADRO CLÍNICO

Desde a sua descrição, a DC foi entendida como uma doença com apresentação clínica bastante uniforme, cuja identificação baseava-se na busca de sintomas como diarreia crônica, distensão abdominal e perda de peso, ocorrendo em crianças pequenas, semanas ou meses após a introdução de dieta alimentar sólida. No decorrer das últimas décadas, todavia, ficou evidente que a DC pode se apresentar de forma atípica, com uma sintomatologia clínica bastante heterogênea, ou mesmo assintomática. (Arranz & Ferguson, 1993; Cerf-Bensussan *et al*, 2003).

Hoje, se entende que a larga escala de manifestações conseqüentes da DC pode ser estudada por diferentes especialidades clínicas, tais como: endocrinologia, reumatologia, hematologia, cardiologia, neurologia, pediatria, dermatologia e odontologia (Green, 2005).

Os pacientes celíacos que expressam uma sintomatologia típica da DC como perda de peso, diarreia crônica, fezes volumosas, anorexia, distensão abdominal, perda de massa muscular, fraqueza, irritabilidade e má absorção intestinal, são classificados como casos clássicos ou típicos da doença. A forma clássica da DC é a mais comumente encontrada no grupo pediátrico (Fasano e Catassi, 2005).

Entretanto, a forma atípica da doença é cada vez mais diagnosticada, principalmente em crianças maiores, adolescentes e adultos, onde se observa que os sintomas gastrointestinais são ausentes ou menos acentuados (Fasano e Catassi, 2005). Porém, há manifestações mais evidentes em outros órgãos e sistemas.

O espectro de alterações clínicas na DC atípica pode manifestar-se, ainda, por meio de quadros de anemia crônica e inexplicada (Corazza *et al*, 1995), dermatite herpetiforme - DH (Reunala *et al*, 1984; Maki e Collin 1997), defeitos do esmalte dentário (Aine *et al*, 1990), miopatia (Gobbi *et al*, 1992), retardo no crescimento (Tumer *et al*, 2001), hepatite auto-imune (Volta *et al*, 1998), artrite (Lubrano *et al*, 1996), atraso na puberdade, infertilidade ou abortos de repetição (Sher *et al*, 1996). Em longo prazo, também tem sido observada incidência aumentada de neoplasias, principalmente de linfomas e carcinomas do trato gastroentérico (Holmes *et al*, 1989).

Existe ainda um grupo de indivíduos que desenvolve a DC de forma silenciosa ou sub-clínica. Nesse caso, os pacientes não apresentam sintomas e a doença é encontrada ocasionalmente. A observação do aumento do número de diagnósticos positivos para DC em indivíduos assintomáticos ocorreu, principalmente, por meio de vários estudos que promoveram rastreamentos sorológicos em grupos de risco para a doença. Esse grupo de risco é composto, principalmente, de indivíduos que apresentam condições clínicas que recorrem em associação com a DC, ou ainda por parentes de pacientes celíacos. O estudo de Bonamico *et al* (2006), por exemplo, encontrou entre parentes de celíacos 11,9% de casos de DC atípica e 45,2% de casos que apresentaram a forma silenciosa da doença.

Entre as principais doenças e condições associadas à DC, destacam-se: o Diabetes mellitus do tipo I (Savitahti *et al*, 1986), a Síndrome de Down (Walker-Smith, 1990), a Síndrome de Turner (Ivarsson *et al*, 1999, Sagodi *et al*, 2006), a deficiência seletiva de IgA (Cataldo *et al*, 1998), a Doença de Crohn (Holmes e Catassi, 2000), a jejunoileíte ulcerativa (Holmes *et al*, 1989), a Síndrome de Sjögren (Iltanen *et al*, 1999), doença inflamatória intestinal e outras desordens auto imunes (pulmonares, do fígado e tireóide) (Holmes e Catassi, 2000), osteopenia e conseqüente osteoporose (Corazza *et al*, 1995), epilepsia e epilepsia associada à calcificações cerebrais (Gobbi *et al*, 1992), depressão, ansiedade (Hallert *et al*, 1982).

Estudos evidenciam que as desordens ligadas à DC parecem ter uma base auto-imune, uma vez que as perturbações imunológicas podem predispor indivíduos afetados a outras desordens que têm também uma etiologia imunológica (Ventura *et al*, 1999). A associação entre DC e doenças auto-imunes explica-se pela presença de um fator genético comum, no caso os haplótipos do HLA. Como exemplo, o alelo DQA1*05 confere susceptibilidade à DC, Diabetes Mellitus tipo 1, Doença de Graves e Doença de Addison (King *et al*, 2000).

Por fim, encontramos outro grupo que caracteriza uma forma de DC classificada como potencial ou latente. Estes indivíduos não possuem uma biópsia consistente com DC, apesar de apresentarem anormalidades imunológicas, como número elevado de LIE. Apresentam, ainda, testes de anticorpos antiendomísio e anti-transglutaminase positivos e perfil de HLA predisponente (HLA-DQ2 ou DQ8).

Este grupo de pacientes pode vir a desenvolver posteriormente a forma clássica da doença (Fasano e Catassi, 2005). O desenvolvimento da mucosa atrófica pode ocorrer devido a alguns fatores que incluem: o aumento temporário da permeabilidade intestinal, e o aumento na absorção do glúten ou um efeito adjuvante de uma infecção intestinal. (Weinstein, 1974; Ferguson *et al*, 1993; Corazza *et al*, 1993; Troncone *et al*, 1996)

Diante da nova percepção das características clínicas do paciente, da mudança na epidemiologia da doença, da evolução no conhecimento sobre a interação entre a susceptibilidade genética e dos dados sorológicos e histológicos, a prevalência da DC foi comparada a um iceberg (Figura 4).

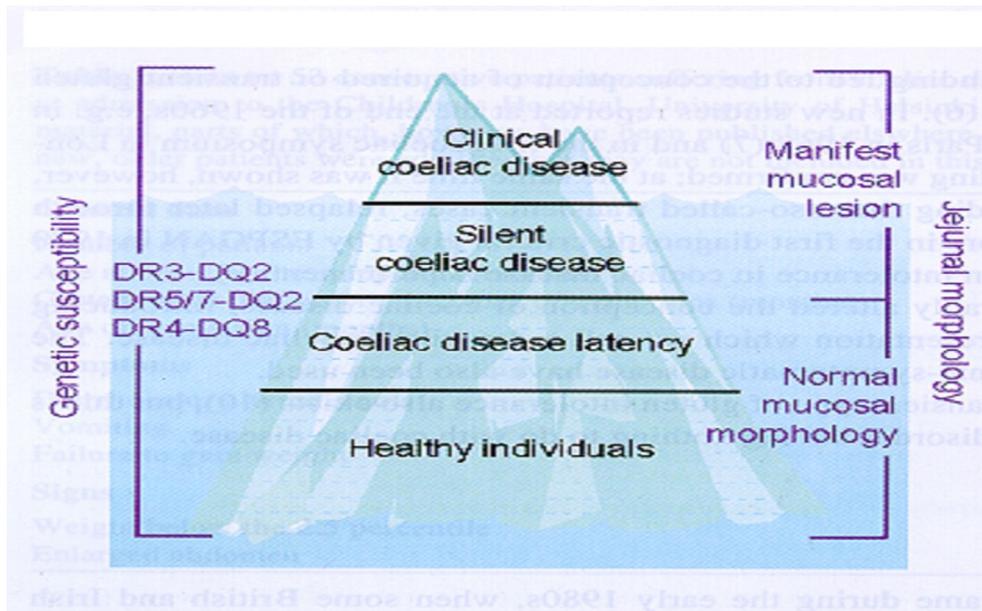


Figura 4 - O iceberg celíaco e o espectro da sensibilidade ao glúten

Fonte: Mäki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet* 1997; 349: 1755-1759.

De acordo com essa analogia, a parte "submersa" do iceberg representa a porção da população geneticamente predisposta, assintomática ou saudável, mas com potencial condição de desenvolvimento da doença. Já a parte "emersa", ou seja, a ponta do iceberg, representa os casos de sintomatologia clássica da DC. O grupo de pacientes com DC clássica e silenciosa (e também atípica não demonstrada no iceberg) demonstra alterações na mucosa intestinal, enquanto que

o grupo de pacientes com DC latente, assim como os sadios, não. Entretanto, deve-se levar em conta as evidências que sugerem que todos os pacientes celíacos estão expostos à complicações a longo prazo, o que faz com que o iceberg tenha um caráter dinâmico.

As complicações relacionadas com a DC podem atingir, principalmente, o espectro de pacientes subdiagnosticados por não realizarem uma dieta livre de glúten. Elas podem, ou não, apresentar malignidade, sendo, entretanto, ambas importantes, uma vez que aumentam a morbidade e mortalidade da doença.

Uma maior conscientização sobre a doença celíaca, por parte dos profissionais de saúde, principalmente dos médicos de cuidados primários, é fundamental para diminuir a demora no diagnóstico e, conseqüentemente, a alta taxa de morbidade relacionada à doença celíaca não tratada. Também é importante para contribuir para o alívio dos custos sociais e pessoais da doença, assim como para aumentar a qualidade de vida das pessoas afetadas (Fasano, 2003).

1.5 DIAGNÓSTICO

Inicialmente, o diagnóstico da DC baseava-se nos sintomas clínicos e na execução de provas que avaliavam a capacidade de absorção do intestino para diversas substâncias, como a pesquisa de gordura nas fezes, o nível de caroteno no soro e a prova de absorção da xilose e D-xilose, além da execução de biópsia da mucosa intestinal. No entanto, com o passar dos anos, o desenvolvimento de novas ferramentas e o maior conhecimento sobre a patologia, provocaram uma revisão nos critérios para o diagnóstico da DC.

Hoje se sabe que, de maneira geral, o diagnóstico e o prognóstico da doença celíaca são direcionados, principalmente, por um conjunto de fatores que podem envolver alterações hematológicas e bioquímicas, a presença dos marcadores sorológicos e genéticos, a clínica do paciente, os dados histológicos da mucosa intestinal, a história familiar e a presença de DC ou outras doenças autoimunes na família.

Exames de rotina podem ser úteis na verificação de alterações hematológicas e bioquímicas consequentes da má absorção característica da DC. Na fase ativa da doença, são freqüentes a anemia e a diminuição da concentração de alguns componentes habituais do sangue como o colesterol, o ferro e as proteínas, assim como pode ocorrer a elevação de outros componentes como a fosfatase alcalina e as transaminases. Pode ocorrer também baixa nos níveis circulantes de ácido fólico, vitamina K - que provoca alongamento do chamado tempo de protrombina e, de vitamina D, promovendo alterações dos níveis de cálcio e do fósforo.

Desde 1969, são propostos critérios para um diagnóstico e tratamento corretos da DC. Em 1970, a Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição (European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition - ESPGHAN) formulou os critérios de Interlaken (Meeuwisse *et al*, 1970). Esses critérios enunciavam que a mucosa do intestino delgado de um indivíduo celíaco deveria apresentar-se anormal durante uma dieta contendo glúten, a arquitetura das vilosidades deveria mostrar melhora nos indivíduos submetidos à uma dieta livre de glúten (GFD) e deveria haver deterioração da mucosa com a reintrodução do glúten à dieta do indivíduo.

Com base nesses critérios, foi instituída uma seqüência de três biópsias para firmar definitivamente o diagnóstico de DC. A primeira para comprovar as alterações típicas da doença. A segunda, após um ano de GFD, para evidenciar a normalização da mucosa jejunal e, finalmente, a terceira demonstrando nova deterioração de mucosa em conseqüência do desafio com a dieta contendo glúten (Meeuwisse, 1970).

Com o passar do tempo, porém, a evolução dos testes sorológicos, a evidência de que a DC é mais variável na sua evolução do que previamente se achava e a constatação de que o desafio com glúten não precisaria ser obrigatório para o diagnóstico da doença, permitiram que, em 1989, os critérios de diagnóstico fossem revisados e simplificados. De acordo com as novas diretrizes da ESPGHAN, passou a ser aceito diagnóstico de certeza da DC com base em testes sorológicos positivos, uma única biópsia intestinal evidenciando as alterações de mucosa típicas da doença e a melhora clínica após a instalação de dieta sem glúten (Walker-Smith *et al*, 1990).

Os testes sorológicos, cada vez mais confiáveis, facilitaram o diagnóstico da DC e possibilitaram a realização de vários estudos epidemiológicos, revelando prevalências superiores ao que anteriormente se imaginava. Os testes mais utilizados para a determinação da DC são baseados na detecção de anticorpos antigliadina (IgA e IgG-AGA), anticorpos anti-endomísio (IgA-EMA) (Chorzelski *et al*, 1983) e anti-transglutaminase (IgA-tTG) (Troncone *et al*, 1999).

Os testes para detecção de anticorpos antigliadina foram os primeiros marcadores sorológicos a serem usados na prática clínica para o rastreamento da DC. Apesar de apresentarem baixa sensibilidade e especificidade, o teste de IgG-AGA apresenta importância diagnóstica, uma vez que a presença desses anticorpos pode ser detectada mesmo na coexistência de deficiência de IgA (Collin *et al*, 1994), o que ocorre entre 3 a 10% dos pacientes com DC. Já o IgA-AGA, é o teste mais útil em crianças sintomáticas com menos de dois anos de idade, pois este grupo apresenta baixa positividade para os testes de IgA-EMA e IgA-tTG (Bürgin-Wolff *et al*, 1991). Porém, muitas pessoas com problemas gastrointestinais de outra ordem, isto é, não relacionados à DC, também podem apresentar níveis elevados de anticorpos antigliadina, o que pode levar a resultados falso-positivos (Hill *et al*, 2005).

No caso do teste para a detecção dos anticorpos antiendomísio um resultado positivo é um forte indicativo da presença de doença celíaca, uma vez que a especificidade e a sensibilidade deste teste são muito próximas de 100% (Bürgin-Wolff *et al*, 1991; Hill *et al*, 2005). O teste EMA é realizado por meio da técnica de imunofluorescência indireta sobre secções de esôfago de macaco Rhesus (Chorzelski *et al*, 1983) ou, menos usado atualmente, por meio do cordão umbilical humano. Um dos problemas relacionados à técnica do teste EMA é o alto custo. Além disso, sendo um teste qualitativo, a técnica está sujeita à variação na leitura das lâminas, dependendo do treinamento dos profissionais que a executam. O teste EMA também pode demonstrar resultados falso-negativos em crianças com menos de dois anos de idade (Bürgin-Wolff *et al*, 1991).

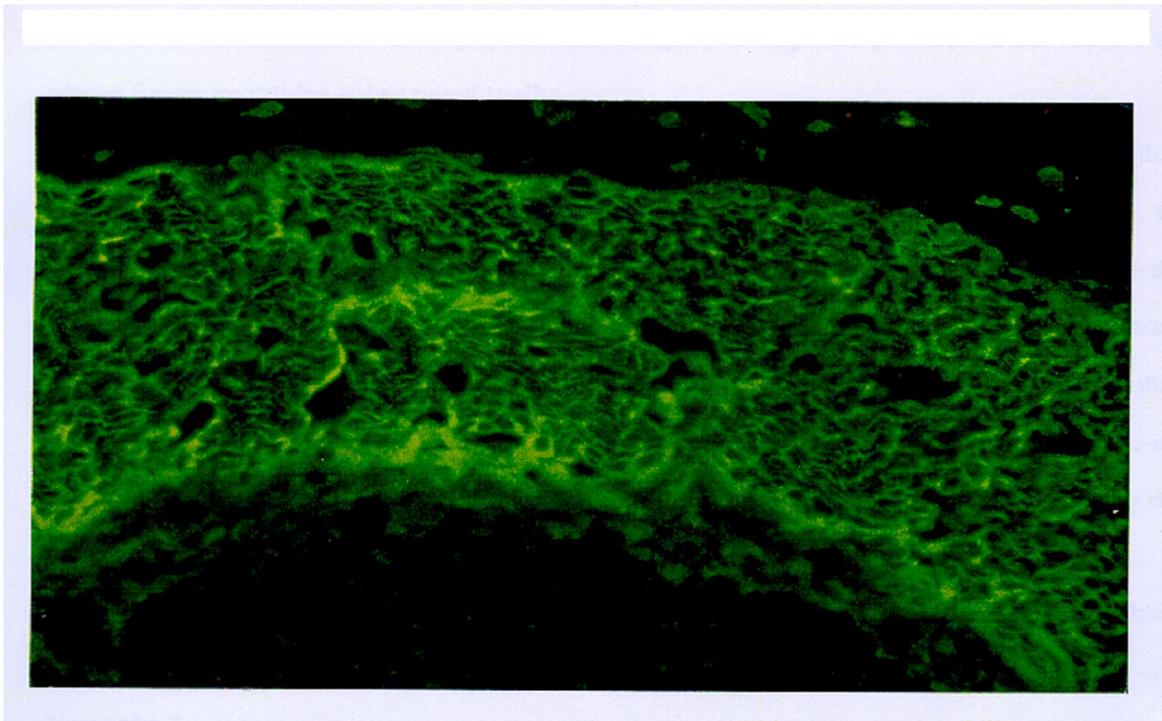


Figura 5 - Exemplo de teste de imunofluorescência positivo, mostrando característico padrão verde brilhante presente no tecido conjuntivo que circunda as fibras da camada muscular do esôfago do primata *Cebus apella* (ampliação de 400x)

Também o teste para a detecção dos anticorpos anti-transglutaminase apresenta sensibilidade e especificidade próximas a 100% (Hill *et al*, 2005). A utilização de formas recombinantes de tTG humano como substrato em substituição ao antígeno tTG impuro de porco, contribuiu para a melhoria desses parâmetros. Dessa forma, o teste tTG é considerado um avanço no diagnóstico da DC, pois além de apresentar uma alta sensibilidade e especificidade, é um teste rápido, simples e efetivo na triagem para DC.

Apesar do grande avanço proporcionado pelos testes sorológicos, o diagnóstico da DC continua, ainda hoje, também sendo baseado na observação da presença de mucosa achatada e perda na arquitetura das vilosidades por meio de biópsia intestinal. Entretanto, nem sempre essas mudanças estão presentes.

Marsh *et al* (1992) propuseram uma classificação dos tipos de anormalidades da mucosa jejunal:

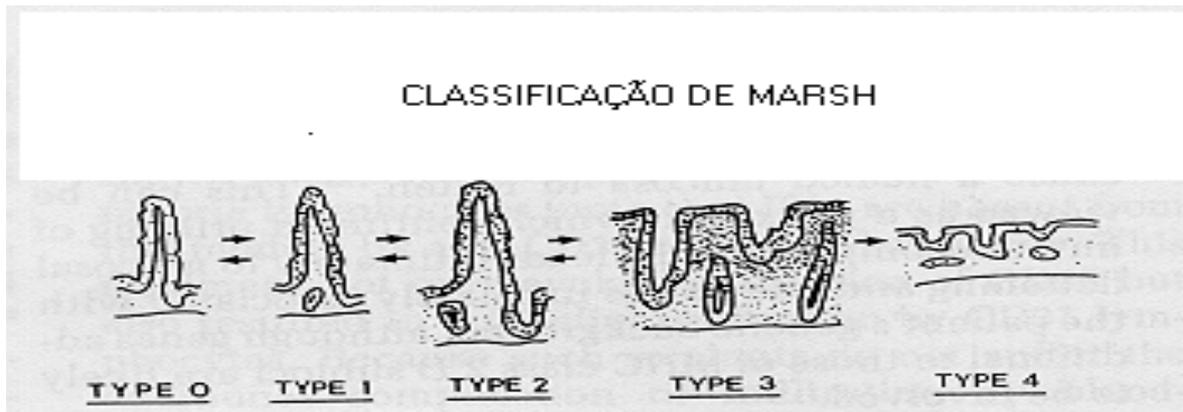
Tipo 0: Pré infiltrativo: corresponde ao aspecto normal da mucosa.

Tipo I: Infiltrativo: a arquitetura da mucosa permanece normal, apresentando, entretanto, infiltrado marcante das vilosidades por uma população de linfócitos pequenos ou LIE.

Tipo II: Hiperplástico: é similar ao tipo I, mas o infiltrado linfocítico é maior e há alargamento e hiperplasia das criptas, sendo preservadas às vilosidades.

Tipo III: Destrutivo: são encontradas todas as alterações descritas nos outros tipos, ocorrendo ainda a perda das vilosidades.

Tipo IV: Hipoplástico: Encontra-se não só a destruição das vilosidades, mas também uma perda importante das criptas. Essas alterações na mucosa jejunal são consideradas clássicas, presentes em todos os pacientes com DC sintomática.



Tipo 0: Pré infiltrativo: mucosa normal.

Tipo I: Infiltrativo: mucosa normal, com infiltrado das vilosidades por LIE's.

Tipo II: Hiperplástico: infiltrado linfocítico é maior, hiperplasia das criptas.

Tipo III: Destrutivo: ocorre ainda perda das vilosidades.

Tipo IV: Hipoplástico: destruição das vilosidades, perda das criptas.

Figura 6 - Esquema de classificação das anormalidades da mucosa proposto por Marsh

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

Posteriormente, Oberhuber *et al*, em 1999, estabeleceram a classificação de Marsh modificada, que consiste em:

Tipo I – infiltrado linfocitário do epitélio viloso;

Tipo II – linfocitose intraepitelial e hiperplasia de criptas;

Tipo IIIa – atrofia vilositária parcial (vilosidades curtas);

Tipo IIIb – atrofia vilositária sub-total (mucosa atrófica mas com vilosidades identificáveis); e

Tipo IIIc – atrofia vilositária total.

Algumas pesquisas revelam ainda que outras condições podem provocar o aparecimento das anormalidades na mucosa intestinal observadas na DC. Dentre essas condições, podemos destacar: a gastroenterites de repetição, esprue colagenoso, linfoma mediterrâneo, esprue tropical, vírus da imunodeficiência humana (HIV), enteropatia autoimune, intolerância a proteína do leite de vaca,

ulcerações intestinais, parasitoses infecciosas, desnutrição protéica calórica entre outras. (Marsh *et al*, 1992; Holmes e Catassi, 2000)

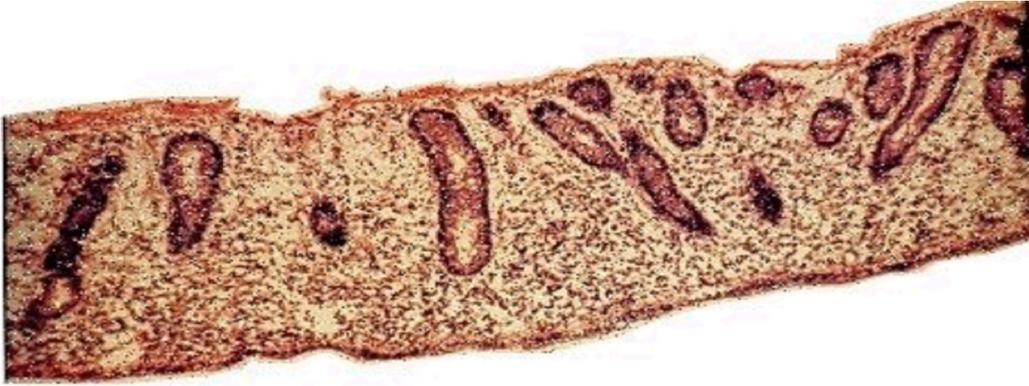


Figura 7 - Exemplo de biópsia intestinal mostrando atrofia das vilosidades total com hipertrofia das criptas e aumento do número de linfócitos intra-epiteliais

Mais recentemente, a investigação dos genes ligados à suscetibilidade da DC tem sido considerada importante para a obtenção de marcadores para o diagnóstico da doença. A busca tem sido constante e intensa, e muitos avanços estão sendo obtidos na descrição desses genes, principalmente no que se refere à participação dos genes do HLA.

2. A GENÉTICA DA DOENÇA CELÍACA

A DC tem uma base fortemente genética, sendo confirmada por taxas de concordância entre gêmeos monozigóticos e por uma maior prevalência entre os familiares de pacientes celíacos (Wolters & Wijmenga, 2008).

Os estudos entre gêmeos demonstram uma concordância de 70% a 100% entre gêmeos monozigóticos, e de cerca de 20% entre gêmeos dizigóticos. (Sollid e Thorsby, 1993; Clot *et al*, 2000; Greco *et al*, 2002). Sugere-se que a discordância entre gêmeos monozigóticos aconteça devido ao envolvimento de fatores ambientais adicionais, os quais determinariam o fenótipo exato da doença. (Hervonen *et al*, 2000)

Já entre os parentes de primeiro grau de celíacos, os estudos reportam uma prevalência de DC que varia de 1% a 22,5%. (Bonamico *et al*, 1996; Holmes e Catassi, 2000; Fasano *et al*, 2003; Kagnoff, 2005; Dube *et al*, 2005)

Foi sugerido inicialmente que o mecanismo de herança da DC era autossômico dominante com penetrância incompleta (McDonald *et al*, 1965). Porém, a hipótese de um único gene causar a DC era improvável (Frezal e Rey, 1970).

Estudos posteriores concluíram que a manifestação da DC é multifatorial e parece depender de uma herança complexa, não sendo identificados, entretanto, todos os genes envolvidos (Sollid *et al*, 2000).

Os genes que aparecem mais fortemente associados à suscetibilidade para a DC são os do sistema HLA. (Liu *et al*, 2002; Babron *et al*, 2003) Primeiramente, a doença foi associada à molécula do HLA-B8 de classe I (Falchuk *et al*, 1972). Falchuk *et al* (1972) interpretaram a frequência anormalmente elevada deste HLA em pacientes celíacos, como a presença de um gene de resposta anormal "imune" que leva à produção de anticorpos anti-glúten patogênicos. Ou, em alternativa, uma configuração especial de membrana levando a ligação do glúten para as células da mucosa com lesão tecidual subsequente.

Mais tarde, entretanto, de acordo com inúmeros estudos em diferentes populações, fortes evidências apontaram para a associação da DC com os antígenos da classe II do HLA, as moléculas DR3, DQ2, DR7 e DR5 (Betuel *et al*, 1980; Trabace *et al*, 1984; Alper *et al*, 1987).

No caso da DC, o desequilíbrio de ligação, ou seja, a observação de que alguns haplótipos aparecem em uma frequência maior do que era esperado pela combinação aleatória de alelos, especialmente entre os alelos DR e DQ, pode explicar a forte associação da doença com os alelos HLA-B8, DR3, DR5 e DR7.

Subseqüentemente, foi evidenciado que a mais forte associação com a DC estava relacionada à presença do HLA-DQ2 codificado pelos genes DQA1*0501 e DQB1*0201 em associação com o haplótipo HLA-B8-DR3 (Sollid *et al*, 1989). Vários estudos reportam uma prevalência de 80 a 100% do HLA-DQ2 entre os pacientes com DC (Sollid *et al*, 1989; Sollid & Thorsby, 1993; Sollid, 2000; Karell *et al*, 2003; Bonamico *et al*, 2006).

Os genes do HLA-DQ2 podem aparecer em indivíduos homozigotos em *cis* (no mesmo cromossomo) ligados à DR3 ou *trans* (em cromossomos diferentes) com DR5/DR7 em indivíduos heterozigotos. Indivíduos DR3-DQ2 e DR5/DR7-DQ2 produzem as mesmas moléculas protéicas funcionais na superfície celular, as quais são fundamentais para apresentação do glúten para as células T CD4+. (Sollid *et al*, 1989; Thorsby, 1997)

Observou-se que indivíduos DQ2 que carregam tanto DR3/DQ7 como o DR5/DR7 têm alto risco de desenvolver a DC, e que a combinação DR3/DR7 conferia maior risco para a doença (Ploski *et al*, 1993).

O heterodímero HLA-DQ2 é constituído por uma cadeia alfa (codificada pelo gene DQA1) e uma cadeia beta (codificada pelo gene DQB1), ambas ancoradas na membrana da célula. Essas moléculas desempenham um papel central no sistema imune por meio da apresentação de peptídeos derivados de proteínas extracelulares, sendo expressas nas células apresentadoras de antígenos. As cadeias alfa e beta têm aproximadamente 33-35 e 26-28 kDa, respectivamente, e são codificadas por cinco exons: o exon 1 codifica o peptídeo líder, os exons 2 e 3 codificam os dois domínios extracelulares e o exon 4 codifica o domínio transmembrana e da cauda citoplasmática.

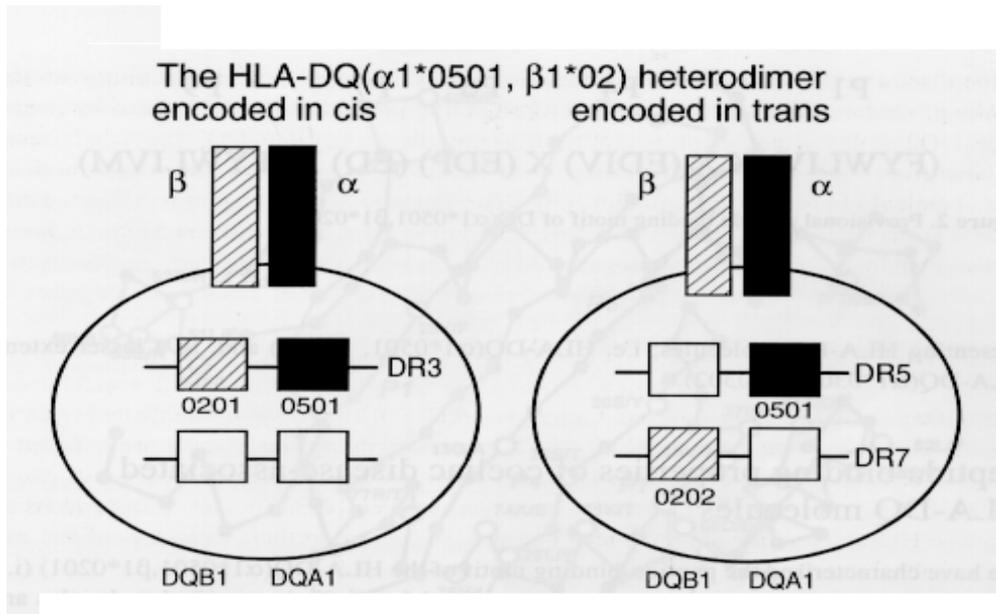


Figura 8 - Pacientes com DC que expressam HLA-DQ ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$), em cis (no mesmo cromossomo) em indivíduos DR3 DQ2 ou em trans (em cromossomos diferentes) em indivíduos heterozigotos DR5 DQ7/ DR7 DQ2

Fonte: Sollid LM, Lundin K E A et al. HLA-DQ molecules, peptides and T cells in coeliac disease. In: Markku Mäki, Pekka Collin, JK Visakorpi, editors. Coeliac Disease. Proceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease. Finland: Tampere; 1996. p. 291-309.

No entanto, a associação da DC com o HLA-DQ2 pode não aparecer em todos os casos, sendo constatado que a maioria dos pacientes DQ2 negativos (<5%) apresenta freqüentemente o HLA-DQ8 (DQA1*0301 - B1*0302) que está associado ao haplótipo DR4 (DRB1*04) (Sollid *et al*, 1989; Spurkland *et al*, 1992).

Foi observado, em estudo recente, que a falta de uma carga negativa na posição beta-57 do HLA-DQ8 confere uma preferência por peptídeos desaminados de glúten, e promove o recrutamento de células-T que mostraram uma reação mais forte com esses peptídeos - o que poderia explicar o papel do HLA-DQ8 na amplificação a resposta das células-T contra o glúten da dieta (Hovhannisyanyan *et al*, 2008).

Os pacientes DQ2 e DQ8 negativos podem, ainda, portar pelo menos um dos alelos do HLA-DQ2, ou seja, DQA1*0501 ou DQB1*0201. São descritos poucos casos de DC em que esses alelos de risco estão ausentes (Arranz, 2003; Karell *et al*, 2003).

Alguns estudos correlacionam a homozigose ou heterozigose dos alelos HLA com o risco para a DC e com a sua apresentação clínica. De acordo com esses estudos, indivíduos HLA-DQ2 homozigotos apresentaram um maior risco relativo para a DC, existindo um efeito da dosagem do gene DQB1*0201 no desenvolvimento da doença (Zubillaga *et al*, 2002; Peña-Quintana *et al*, 2003; Vader *et al*, 2003).

Outros genes do MHC de classe II dos *loci* DR e DP, como exemplos os genes do HLA-DRB4 (Clot *et al*, 1999) e do HLA-DPB1*0101 (Polvi *et al*, 1997), foram reportados na suscetibilidade à DC. Esses estudos demonstraram a associação desses genes com a doença, no entanto, falharam em provar que seu efeito seria independente da presença do HLA-DQ2.

O mesmo fato foi observado com genes do MHC fora da região de classe II, como o gene TNF, da classe III do MHC, entre as regiões DQ e DP (McManus *et al*, 1996; Garrote *et al*, 2002) e uma variante alélica na região do gene do MIC, o MICA-A5.1, da região de classe I, que aparece associado às formas atípicas da DC e confere efeito aditivo ao haplótipo DR3/DQ2, modulando o desenvolvimento da doença (Lopez-Vazquez *et al*, 2002).

Também existem estudos evidenciando que, além dos genes do HLA, outros fora desse sistema, assim como a interação entre eles, podem conferir a suscetibilidade à DC (Romanos *et al*, 2009). Foi observado que, coletivamente, os genes do HLA conferem até 40% do risco genético para o desenvolvimento da DC e os genes não-HLA o restante (Bevan *et al*, 1999; Dewar *et al*, 2004). Ou seja, curiosamente parece que os genes não-HLA, em conjunto, contribuem mais para a susceptibilidade genética do que os genes do HLA. Porém, a identificação dos genes de susceptibilidade verdadeira à DC é dificultada pela presença de outros genes que atuam como marcadores de genes vizinhos (Bevan *et al*, 1999)

Estudos genômicos de associação e de linkage identificaram algumas regiões cromossômicas que abrigam genes não-HLA associados com a DC. Podemos destacar alguns *loci* como candidatos para a suscetibilidade à DC nos seguintes cromossomos: 5q31-33 (Greco *et al*, 2001; Nalwai *et al*, 2001); 11p.11 (King *et al*,

2001); 2q33, que contém os genes *CD28/CTLA4* (Clot *et al*, 2000; Neuhausen *et al*, 2001; Holopainen *et al*, 2001); 19p13.1, que contém o gene *MYO9B* (van Belzen *et al*, 2003; Monsuur *et al*, 2005) e 4q27, que contém os genes *IL2/IL21* (van Heel *et al*, 2007; Hunt *et al*, 2008; Adamovic *et al*, 2008).

O estudo de Hunt *et al* (2008) demonstrou que uma variante alélica de único nucleotídeo mais significativamente relacionada com a DC, encontrada fora da região de HLA-DQ e da região previamente identificada por van Heel *et al* em 2007 no cromossomo 4q27 (genes *IL2/IL21*), foi rs2816316 em 1q31 em desequilíbrio de ligação com o gene *RGS1*. O *RGS1* regulamenta a sinalização das proteínas G e está envolvido com ativação celular e proliferação de células B. Ainda nesse estudo, outras seis regiões cromossômicas adicionais também mostraram associação significativa, a saber: 2q11-q12; 3p21; 3q25-q26; 3q28; 6q25 e 12q24. Outro estudo recente confirmou a associação com seis dos oito *loci* anteriormente relatados por Hunt *et al* (2008), mas não encontrou nenhuma associação com as regiões cromossômicas 2q11-q12 e 3p21 (Romanos *et al*, 2009). Os autores sugeriram que pode haver diferenças nos *loci* que contribuem para a doença celíaca na população em toda a Europa.

Torna-se extremamente necessária uma larga replicação destes estudos genômicos de associação em diferentes populações, principalmente em populações não-europeias, para que se possa chegar a uma conclusão sobre quais são os alelos não-HLA predisponentes para a DC.

De maneira geral, mesmo que os resultados de diferentes pesquisas realizadas em diferentes populações corroborem a característica poligênica da DC, não foram ainda identificados genes que apresentem efeito determinante no risco à doença, exceto para a região do HLA. Além disso, a contribuição de cada gene não-HLA predisponente separadamente parece ser modesta e acredita-se que tais genes apresentariam ação aditiva ou multiplicativa ao HLA (Molberg *et al*, 2000; Hunt *et al*, 2008; Sollid, 2008).

A pesquisa do HLA-DQ2 apesar de apresentar baixa sensibilidade, uma vez que 20% a 40% dos indivíduos não celíacos podem apresentá-lo (Sollid *et al*, 1993; Herrera *et al*, 1994; Brick *et al*, 2006; Cinto *et al*, 2006; Megiorni *et al*, 2009), como teste de triagem para DC apresenta uma alta especificidade e alto valor preditivo negativo. É raro o desenvolvimento da doença em indivíduos que não apresentam os alelos do HLA-DQ2 ou DQ8 e a ausência desses alelos depõe fortemente contra

o diagnóstico da DC (Cerf-Bersussan *et al*, 2003; Karell *et al*, 2003; Dolinsek *et al*, 2004; Hadithi *et al*, 2007).

A tipagem de HLA pode ser muito útil, principalmente em casos nos quais há dúvidas em relação ao diagnóstico da DC, como aqueles de pacientes que já iniciaram uma dieta isenta de glúten sem um diagnóstico prévio, ou em pacientes com biópsia duvidosa (Guandalini e Gupta, 2002). Também pode ser útil na detecção de casos de DC de formas atípicas, subclínicas, oligossintomáticas ou assintomáticas e latentes e; na estratégia de triagem de indivíduos assintomáticos que pertencem a grupos de risco, como o caso de familiares de primeiro grau de pacientes celíacos.

Estudos com foco na determinação da frequência dos alelos do HLA-DQ2 e DQ8 entre parentes de celíacos realizados principalmente em países europeus e nos Estados Unidos, demonstram uma alta prevalência desses alelos nesse grupo (Bonamico *et al*, 1996; Farré *et al*, 1999). Na América do Sul e no Brasil, no entanto, há uma escassez de dados sobre a frequência dos genes implicados na predisposição à DC entre parentes de celíacos.

Ainda, têm-se destacado a importância do acompanhamento de parentes de celíacos visando à reavaliação dos indivíduos que a princípio tenham um diagnóstico negativo para a DC, mas que possuam os alelos predisponentes do HLA-DQ2 ou DQ8. Na literatura, há estudos que relatam casos de parentes que inicialmente não recebem o diagnóstico de DC, mas que, ao serem acompanhados por alguns anos, foram diagnosticados como positivos (Hill *et al*, 2005). No estudo de Niveloni *et al*, 2000, por exemplo, foram reportados dois novos casos de DC entre 44 parentes de primeiro grau de celíacos reavaliados após um período de em média 84 meses. Ambos eram HLA-DQ2 positivos e não apresentaram, inicialmente, atrofia na mucosa entérica.

Dessa maneira, entende-se que a tipagem dos genes do HLA predisponentes para a DC, pode contribuir para a seleção dos indivíduos susceptíveis, nos quais um único teste sorológico negativo não afasta totalmente a possibilidade do desenvolvimento da doença posteriormente; ao mesmo tempo em que contribui para a definição da população que seria excluída do monitoramento por meio dos testes para detecção dos anticorpos anti-transglutaminase (Liu *et al*, 2005).

Em conclusão, a detecção dos tipos de HLA ligados à suscetibilidade à DC pode ser uma importante ferramenta para o diagnóstico e prevenção da doença, uma vez que os alelos do HLA são marcadores estáveis ao longo da vida e sua tipagem pode detectar casos geneticamente suscetíveis muito antes do possível aparecimento do transtorno (Hill *et al*, 2005; Megiorni *et al*, 2009).

Além disso, a pesquisa dos genes de suscetibilidade à DC pode vir a contribuir para antecipação do tratamento de possíveis casos da doença, o que promoveria a melhora clínica das alterações da mucosa e reduziria os riscos de patologias e complicações associadas a seu desenvolvimento.

OBJETIVOS

- a. Verificar, por meio de rastreamento sorológico, a frequência de DC entre parentes de primeiro grau de pacientes celíacos;

- b. Verificar a frequência dos alelos do HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e do gene DRB1*04 (HLA-DR4) entre pacientes celíacos e entre seus parentes de primeiro grau.

MÉTODOS

1. TIPO E PERÍODO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo de prevalência com delineamento transversal. O estudo foi realizado no período de janeiro de 2004 a dezembro de 2008.

2. PACIENTES

A amostra contou com 207 parentes de primeiro grau (pais, irmãos e filhos) de 90 indivíduos comprovadamente celíacos diagnosticados segundo os critérios ESPGAN (Walter-Smith *et al*, 1990).

Os indivíduos pesquisados optaram, espontaneamente, por participar do estudo e a amostra foi recrutada por conveniência a partir do atendimento no ambulatório do Centro de Pesquisa em Doença Celíaca e no ambulatório de Gastroenterologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB/UnB). O Hospital Universitário de Brasília é um hospital geral frequentado principalmente por uma população de baixa renda originária de regiões da periferia da cidade de Brasília.

O grupo dos 90 casos índices do estudo contou com 55 indivíduos do sexo feminino e 35 do sexo masculino, com idade média de 15,5 anos e faixa etária de 1 a 55 anos. Nenhum desses indivíduos foram relacionados entre si.

Do grupo inicial de 298 parentes de primeiro grau dos casos índices identificados, 91 não puderam ser localizados ou se recusaram a participar. O grupo restante, de 207 familiares dos celíacos, contou com: 122 genitores (44 pais e 78 mães, com idade entre 18 - 75 anos, com idade média de 40 anos, mediana 42 anos), 63 irmãos (29 irmãos e 34 irmãs, com idades entre 1 - 48 anos, com idade média 16 anos e mediana 14 anos) e 22 filhos (11 meninos e 11 meninas, com idade entre 1 - 32 anos, com idade média 10 anos e mediana 11 anos).

Entre os parentes, a participação das mães foi maior em virtude de que são elas que geralmente acompanham os filhos às consultas médicas.

Em relação à raça, pode-se dizer que se trata de uma população predominantemente mista, na qual uma contribuição considerável de ascendência

européia pode ser detectada em associação com uma parcela variável de outras raças, principalmente de afro-descendentes e, em menor medida, de índios.

Previamente à inclusão ao protocolo e após esclarecimento dos objetivos da pesquisa e do significado dos possíveis resultados, solicitou-se a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice 2) dos participantes ou de seus responsáveis.

Em seguida, foi aplicado um questionário padronizado (Apêndice 3), que incluía os dados pessoais dos indivíduos pesquisados e questionamento com enfoque na presença de sinais e sintomas gastrointestinais e, na presença de outros sintomas não relacionados ao trato gastrointestinal, mas freqüentemente observados em associação com a DC (forma atípica).

Foram colhidas dos participantes da pesquisa amostras de 2 ml a 4 ml de sangue, em tubos com e sem anticoagulante, por meio de punção de veia do antebraço. O material foi enviado ao Laboratório de Pesquisa da Área de Medicina da Criança e do Adolescente, na Faculdade de Medicina da UnB, onde foram realizados os testes sorológicos e pesquisa dos marcadores genéticos.

Todos os parentes de celíacos participantes da pesquisa estavam em uma dieta contendo glúten quando os testes sorológicos foram realizados.

Todos os resultados obtidos foram fornecidos aos respectivos participantes ou aos seus responsáveis. Dessa forma, os pacientes identificados como positivos para DC foram beneficiados tanto pela possibilidade de iniciar o tratamento evitando complicações futuras, freqüentemente graves, como pela assistência continuada que lhes é oferecida pela equipe do Ambulatório de Gastroenterologia do Hospital Universitário de Brasília.

3. TESTES SOROLÓGICOS

As amostras de sangue, colhidas em tubos sem anticoagulante, foram centrifugadas para a separação do soro que foi armazenado a 20°C negativos até o uso. Foram realizados, nos soros dos parentes de celíacos, os testes para a determinação do nível de imunoglobulina A (IgA), pelo método de imunquantificação turbidimétrica (COBAS MIRA, Roche Diagnostic Systems), no intuito de se excluir a possível deficiência absoluta de imunoglobulina A e testes para a detecção de anticorpos da classe IgA anti-endomísio (IgA-EMA) e da classe IgA anti-transglutaminase (IgA-tTG).

No teste para a detecção de anticorpos da classe IgA anti-endomísio (IgA-EMA) pela técnica de imunofluorescência indireta, uma diluição de 1:5 do soro em tampão fosfato (pH 7,4) é incubada em um substrato de secções da porção distal do esôfago de macaco fixadas em lâmina (Birmingham, UK). A reação é detectada pela adição de conjugado de anticorpos de coelho anti-IgA humano com isotiocianato fluoresceína (FITC-anti IGA) (Biosystems, Barcelona, Espanha), que promove a marcação de possíveis anticorpos do soro do paciente que reagiram com epítomos do substrato. As lâminas são observadas por dois observadores independentes em microscópio de imunofluorescência, nos quais a positividade do teste se revela por meio de um característico padrão verde brilhante presente no tecido conjuntivo que circunda as fibras da camada muscular do esôfago.

No teste para a detecção de anticorpos da classe IgA anti-transglutaminase (IgA-tTG) pelo método ELISA (INOVA Diagnostic Inc., San Diego, California, USA), possíveis anticorpos anti-transglutaminase presentes no soro dos pacientes são aderidos ao antígeno presente nas paredes da placa utilizada para o exame. Em seguida, é adicionado um anticorpo anti-IgA humano, conjugado ao cromógeno, que se liga aos anticorpos. A reação positiva é mensurada pela atividade da enzima por meio do leitor de ELISA. Foram considerados positivos os indivíduos que apresentaram valores maiores que 25 UI/ml.

4. TESTES GENÉTICOS

Das amostras de sangue total colhidas em tubo com anticoagulante, tanto dos celíacos quanto dos parentes, foi extraído o DNA para realização da PCR (Polymerase Chain Reaction) para amplificação dos alelos do HLA-DQ2 e DRB1*04. A técnica utilizada foi baseada nos trabalhos de Sacchetti *et al*, 1997 e Sacchetti *et al*, 2001. Os primers usados foram elaborados com base à seqüência conhecida dos três *loci*:

- DQA1*0501 forward: 5'AGCAGTTCTACGTGGACCTGGGG3'
e reverse: 5'GGTAGAGTTGGAGCGTTTAATCAGAC3';
- DQB1*0201 forward: 5'CGCGTGCGTCTTGTGAGCAGAAG3'
e reverse: 5'GGCGGCAGGCAGCCCCAGCA3';
- DRB1*04 forward: 5'GGTTAAACATGAGTGTCATTTCTTAAAC3'
e reverse: 5'GTTGTGTCTGCAGTAGGTGTCCAC 3'.

Os controles positivos foram obtidos de amostras de DNA comprovadamente positivas para os alelos em questão, advindas do laboratório de transplantes do Hospital Regional da Asa Norte, Brasília – HRAN. Os pacientes com resultados duvidosos foram retestados com o uso de Kit Eu-DQ (Eurospital), próprio para a detecção de alelos DQ2 e DQ8.

A extração do DNA genômico foi realizada com a utilização de Kits comerciais (Ilustra™ genomicPrep Blood Mini Spin, GE HealthCare, Buckinghamshire, UK).

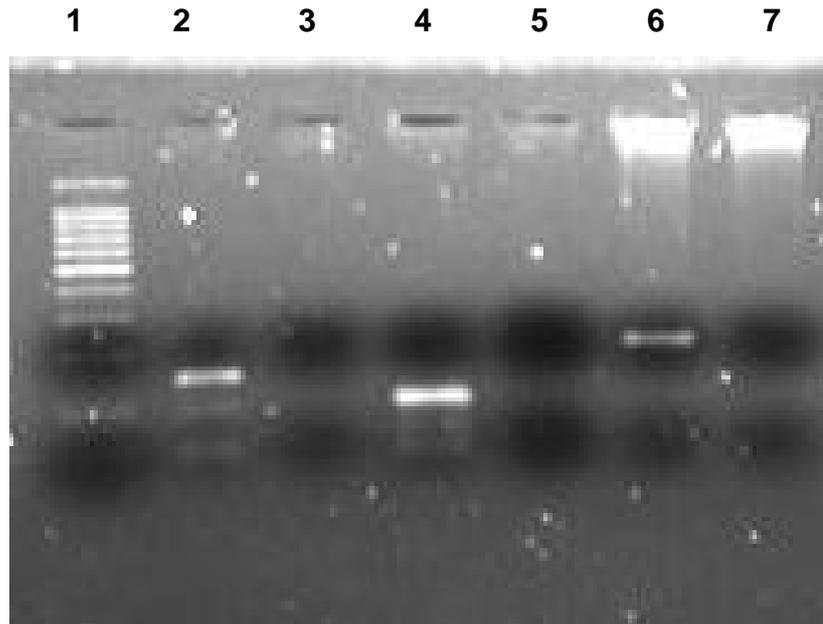
Para a amplificação separadamente dos alelos, utilizou-se, em um volume final de 50µl: 100ng de DNA genômico; 5µl de tampão de PCR 10X [200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl]; 5 µl de DMSO; 200µM/l de cada dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Pharmacia Biotech); 1µl de MgCl₂ 50mM/l; 2,5U de Taq DNA polimerase recombinante 5U/µl (Invitrogen) e 0,4µM dos primers.

No termociclador, uma primeira etapa de desnaturação de 5 minutos a 94 °C foi seguida por uma seqüência de 30 ciclos de 30s a 94°C para desnaturação, 30s a 60°C (para DQA1*0501 e DRB1*04) 64°C (para DQB1*0201) para anelamento, 30s a 72°C para extensão. Uma etapa adicional de 10 minutos a 72°C completa a extensão.

Quadro 2 - Resumo da Técnica de PCR

Componentes	Volumes	Concentração final
10x tampão	5 µl	0,5X
DMSO	5 µl	0,5 X
2,5 mM dNTP'S	4 µl	0,2 mM cada
50 mM MgCl ₂	1 µl	1 mM
10 µM Primer F	2 µl	0,4 µM
10 µM Primer R	2 µl	0,4 µM
5 U/µl Taq polimerase	0,5 µl	2,5 unidades
H ₂ O MiliQ	X µl	Para completar 50µl
DNA Template	X µl	100ng

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose preparado a 2% e pré-corado com brometo de etídio Sigma (0.5µg/ml gel), no qual para 12µl da reação foi adicionado 3µl de tampão de corrida (300mL/L de glicerol corado com azul-bromofenol e xileno-cianol). A eletroforese é efetuada a 100V durante 1 hora em tampão de TBE (89mmol/L de Tris base, 89mmol/L de ácido bórico, 0.2mmol/L de EDTA). Os resultados foram visualizados e fotografados por meio de iluminação UV como bandas de 177pb (DRB1*04), 144pb (DQA1*0501) e 110pb (DQB1*0201). (Figura 9).



1- Marcador; 2- Controle Positivo DQA1*0501; 3- Controle Negativo DQA1*0501; 4- Controle Positivo DQB1*0201; 5- Controle Negativo DQB1*0201; 6- Controle Positivo DRB1*04 e 7- Controle Negativo DRB1*04.

Figura 9 - Resultado da PCR para detecção dos alelos DQA1*0501, DQB1*0201 e DRB1*04

5. BIÓPSIA INTESTINAL

A biópsia intestinal foi sugerida a todos os EMA-IgA ou IgA-tTG positivos. Crianças foram submetidas à biópsia do intestino delgado com a cápsula de Watson pediátrica, e as amostras foram retiradas no ligamento de Treitz. Nos adultos, as amostras de biópsia foram obtidas por meio de um procedimento endoscópico, utilizando um endoscópio Olympus (Tóquio, Japão) com quatro a cinco fragmentos retirados a partir da segunda porção do duodeno. Todas as biópsias foram avaliadas cegamente por um patologista e um gastroenterologista da equipe do Centro de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital Universitário de Brasília e, classificadas de acordo com Marsh (1992) como o tipo (0) Normal, (I) Infiltrativo, (II) Hiperplástico, (III) Destrutivo e (IV) Hipoplástico.

6. ASPECTOS ÉTICOS

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB/FS) concedeu a aprovação ao protocolo do estudo (Anexo 1). Os pacientes elegíveis e os membros saudáveis da família receberam a informação escrita e oral a respeito do uso de seu sangue neste estudo, e todos forneceram o consentimento assinado.

RESULTADOS

1. RASTREAMENTO SOROLÓGICO E FREQUÊNCIA DE DC ENTRE OS PARENTES DE CELÍACOS

Os testes para a detecção dos anticorpos IgA-tTG foram positivos em 18 dos 207 dos parentes de celíacos (8,7%), e em 14 desses parentes foram detectados ainda os anticorpos IgA-EMA.

Os quatro parentes tTG positivos e EMA negativos com idades de 6, 13, 34 e 48 anos apresentaram, respectivamente, resultados de tTG de 32,3, 34,5, 28,73 e 35UI/ml. Estes parentes não relataram a presença de sinais e sintomas relacionados à DC.

Já os quatorze parentes IgA-tTG e IgA-EMA positivos apresentaram o resultado da biópsia compatível com a DC. De acordo com a classificação das anormalidades na mucosa entérica baseada em Marsh (1992), 64,2% (9/14) desses parentes apresentaram características de Marsh III, 14,2% (2/14) de Marsh II e 21,4% (3/14) de Marsh I.

Assim, com base nos achados sorológicos, na presença de alterações da mucosa entérica e na clínica, 6,7% (14/207) dos parentes de celíacos pesquisados foram diagnosticados como DC, sendo esse grupo constituído por: seis (4,9%) genitores (duas mães e quatro pais), seis (9,5%) irmãos (cinco irmãs e um irmão) e dois (9%) filhos (uma menina e um menino)

Os parentes diagnosticados como celíacos relataram a presença de um ou mais sintomas clássicos da doença, tais como: diarreias prolongadas, irritabilidade exagerada, constipação, flatulência, distensão abdominal, dor abdominal, apatia, cansaço exagerado, dores articulares, aftas recidivantes. Além dos sintomas clássicos, manifestações extra-intestinais foram ainda observadas. Entre elas: anemia, osteoporose, osteopenia e mialgia, dermatite herpiforme (DH), gastrite, herpes, tireoidite e abortos de repetição. Apenas um parente mostrou uma forma silenciosa da doença.

A Tabela 1 descreve os sinais e sintomas gastrointestinais e não relacionados ao trato gastrointestinal, descritos pelos parentes de celíacos no questionário padronizado aplicado aos indivíduos do estudo.

Tabela 1 - Número de parentes de celíacos que relataram sinais e sintomas gastrointestinais e não relacionados ao trato gastrointestinal

Sinais e Sintomas	Nº
1. Irritabilidade exagerada	05
2. Diarréias prolongadas	05
3. Dores articulares	07
4. Constipação	04
5. Distensão abdominal	08
6. Dor abdominal recorrente	05
7. Aftas recidivantes	09
8. Apatia, cansaço exagerado	07
9. Flatulência	07
10. Tontura	01
11. Anemia	05
12. Úlcera	01
13. Gastrite	01
14. Herpes	01
15. Abortos de repetição	01
16. Dermatite	02
17. Hipodesenvolvimento	01
18. Osteoporose	01
19. Osteopenia	01
20. Mialgia	01
21. Tireoidite	01
22. Não tem sintomas	186

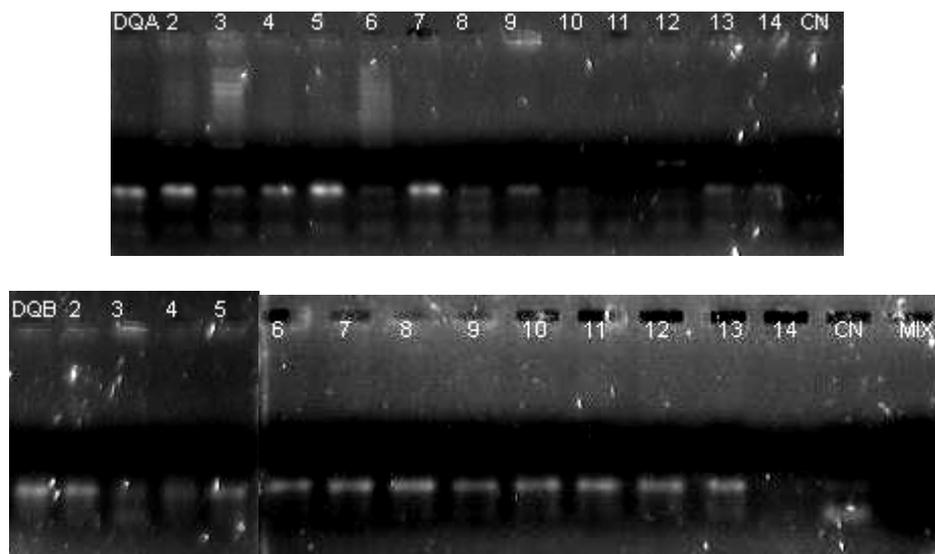
2. ESTUDO GENÉTICO

A frequência dos alelos do HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e DRB1*04 foi avaliada nos celíacos e em seus parentes. As frequências globais da presença dos genes DQA1*0501, DQB1*0201 e DRB1*04 nos grupos de celíacos e seus de parentes está descrita na Tabela 2. Na Figura 10 estão demonstrados exemplos de resultados da PCR para detecção dos alelos DQA1*0501 e DQB1*0201.

Tabela 2 - Frequência global dos genes DQA1*0501, DQB1*0201, do HLA-DQ2 e do gene DRB1*04 em pacientes celíacos e seus parentes

<i>HLA</i>	<i>Celíacos (%)</i>	<i>Parentes (%)</i>
DQA1	90,0	71,0
DQB1	93,3	76,8
DQ2	86,6	57,4
DRB1	27,8	26,1

DQ2= DQA1*0501 e DQB1*0201; DQA1= alelo DQA1*0501; DQB1= alelo DQB1*0201 e DRB1= alelo DRB1*04



Legenda: DQA e DQB: Controles Positivos; 2 a 14: Pacientes; CN: Controle Negativo; MIX: Todos os reagentes para a PCR, menos os primers.

Figura 10 – Exemplo de resultados da PCR para detecção dos alelos DQA1*0501 e DQB1*0201.

Entre os 90 casos índices de celíacos do estudo, 60 (66,6%) apresentaram o HLA-DQ2 e, em 18 (20%) deles, além do HLA-DQ2 também foi detectada a presença do gene DRB1*04. Dos demais pacientes celíacos, dois (2,2%) apresentaram apenas o gene DRB1*04, enquanto que, em cinco celíacos (5,5%), este gene foi detectado conjuntamente com um dos dois alelos (DQA1*0501 e DQB1*0201) que compõem o heterodímero DQ2. Além disso, em dois pacientes (2,2%) foi encontrado apenas o alelo DQA1*0501. E, em outros dois (2,2%), apenas o alelo DQB1*0201. Em um dos pacientes celíacos, nenhum dos alelos HLA predisponentes foi detectado.

No grupo de parentes de celíacos, 92 dos 207 (44,4%) apresentaram o HLA-DQ2 e 27 (13,0%) apresentaram concomitantemente o alelo DRB1*04. Ainda, nove (4,3%) dos parentes de celíacos apresentaram apenas o alelo DRB1*04, 18 (8,6%) apresentaram o alelo DRB1*04 em conjunto com um dos dois alelos do HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201), 21 (10,1%) apresentaram apenas o alelo DQA1*0501 e 29 (14%) apenas o alelo DQB1*0201.

Dos 207 parentes de celíacos pesquisados, 11 (5,3%) não apresentaram nenhum dos alelos pesquisados, sendo seis (4,9%) dos 122 genitores, quatro (6,3%) dos 63 irmãos e um (4,5%) dos 22 filhos.

A Tabela 3 descreve o resultado da tipagem HLA dos 90 pacientes com doença celíaca e de seus 207 parentes de acordo com o grau de parentesco.

Tabela 3 - Número de celíacos e de parentes, em relação à presença dos alelos do HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e DRB1*04

<i>HLA</i>	<i>Celíacos</i>	<i>Genitores</i>	<i>Irmãos(ãs)</i>	<i>Filhos(as)</i>
DQ2	60	52	30	10
DRB1	02	05	04	00
DQ2 e DRB1	18	18	06	03
DQA1 e DRB1	01	03	03	01
DQB1 e DRB1	04	09	00	02
Apenas DQA1	02	14	07	00
Apenas DQB1	02	15	09	05
Ausência de DQ2/DRB1	01	06	04	01
Total	90	122	63	22

DQ2= DQA1*0501 e DQB1*0201; DQA1= alelo DQA1*0501; DQB1= alelo DQB1*0201 e DRB1= alelo DRB1*04

3. PRESENÇA DOS ALELOS PREDISPOENTES PARA DC E OS RESULTADOS SOROLÓGICOS

Do total de parentes de celíacos analisados, 11% (13/119) daqueles que apresentaram o HLA-DQ2, seja isoladamente ou com o alelo DRB1*04, tiveram diagnóstico confirmado para a DC.

Onze (78,5%) dos 14 parentes diagnosticados como celíacos apresentaram o HLA-DQ2 e dois deles (14,2%) apresentaram conjuntamente o alelo DRB1*04. Um deles era negativo para o heterodímero, apresentando apenas o gene DQB1*0201, sendo ainda positivo para o gene DRB1*04.

Entre os quatro parentes tTG positivos e EMA negativos, três eram portadores do HLA-DQ2, um apresentou apenas o gene DQA1*0501 e outro foi negativo para os alelos predisponentes.

Dos demais parentes da pesquisa, cujos resultados sorológicos foram negativos, 104 de 189 (55%) apresentaram o HLA-DQ2 seja isoladamente ou com o alelo DRB1*04.

O Quadro 3 resume os resultados sorológicos, moleculares, histológicos e clínicos encontrados no grupo de parentes com sorologia positiva e a relação com a presença dos alelos do HLA-DQ2 e DRB1*04.

Quadro 3 - Descrição dos resultados do grupo de parentes com sorologia positiva

Nº	Id	Sx	Grau de parentesco	tTg	EMA	HLA	Biópsia Marsh	Sintomas Clássicos*	Outros Sinais e Sintomas
1	08	FEM	Filha	184,8	Positivo	DQB1 e DRB1	III	Sim	Anemia e Osteoporose
2	28	FEM	Mãe	91,7	Positivo	DQ2	III	Sim	Não
3	05	MAS	Irmão	246,5	Positivo	DQ2	III	Sim	Não
4	40	FEM	Irmã	94,2	Positivo	DQ2 e DRB1	III	Sim	Anemia, Tontura, Osteopenia e Mialgia
5	12	FEM	Irmã	82,8	Positivo	DQ2	I	Sim	Não
6	22	FEM	Irmã	213,2	Positivo	DQ2	III	Não	Não
7	59	MAS	Pai	109,3	Positivo	DQ2	II	Sim	Dermatite
8	36	FEM	Mãe	37,4	Positivo	DQ2	I	Sim	Anemia e Gastrite
9	35	MAS	Pai	31,3	Positivo	DQ2	III	Sim	Herpes
10	54	MAS	Pai	71,85	Positivo	DQ2	I	Sim	Tireoidite
11	02	MAS	Filho	92,54	Positivo	DQ2	III	Sim	Anemia e Dermatite
12	75	MAS	Pai	43,4	Positivo	DQ2 e DRB1	II	Sim	Não
13	45	FEM	Irmã	63,61	Positivo	DQ2	III	Sim	Abortos de repetição
14	19	FEM	Irmã	85,6	Positivo	DQ2	III	Sim	Não
15	06	MAS	Irmão	32,3	Negativo	DQ2	0	Não	Não
16	34	MAS	Pai	28,73	Negativo	DQA1	0	Não	Não
17	48	FEM	Mãe	35	Negativo	Negativo	0	Não	Não
18	13	FEM	Filha	34,5	Negativo	DQ2	0	Não	Não

DQ2= DQA1*0501 e DQB1*0201; DQA1= alelo DQA1*0501; DQB1= alelo DQB1*0201 e DRB1= alelo DRB1*04

* Sintomas clássicos: Presença de um ou mais dos seguintes sinais e sintomas: Irritabilidade exagerada, Diarréias prolongadas, Dores articulares, Constipação, Distensão abdominal, Dor abdominal recorrente, Aftas recidivantes, Apatia, cansaço exagerado e Flatulência.

DISCUSSÃO

No presente estudo, foram diagnosticados 14 (6,7%) novos casos de DC entre 207 parentes de primeiro grau de 90 pacientes celíacos. Foi definido como um indivíduo celíaco aquele que apresentou resultados sorológicos positivos e resultado de biópsia compatível com DC.

Embora tenha sido recomendada a biópsia do intestino delgado de todos os indivíduos que apresentaram os alelos predisponentes e positividade para os testes sorológicos, a DC não foi confirmada em quatro pacientes exclusivamente tTG positivos. Esses parentes apresentaram resultados de tTG não muito superiores ao cut-off (25 UI/ml) e não relataram a presença de sinais e sintomas relacionados à DC. Nossa experiência clínica com o uso dos testes sorológicos é consonante com a literatura que expõe que o teste IgA-tTG é mais sensível e o IgA-EMA é mais específico (Carroccio *et al*, 2002; Baudon *et al*, 2004; Brandt e Silva, 2008), o que poderia explicar os resultados positivos de tTG em parentes não diagnosticados com DC. Ainda, têm-se que, resultados falso-positivos de EMA são raros, sendo o teste IgA-EMA quase 100% específico (Unsworth, 1996; Volta *et al*, 1991). Apesar disso, resultados falso-negativos podem ser obtidos no grupo etário mais velho (> 35 anos) e em crianças menores de dois anos (Bürgin-Wolff *et al*, 1991; Boger *et al*, 2007), no entanto, só um dos pacientes apenas tTG positivos estaria inserido nessas exceções.

A prevalência de DC entre parentes de primeiro grau de celíacos encontrada no presente estudo está em consonância com as conclusões de vários estudos anteriores, que varia entre 4,5% e 9,5% (Farré *et al*, 1999; Högberg *et al*, 2003; Fasano *et al*, 2003; Bonamico *et al*, 2006). Em um estudo mais recente com 158 adultos parentes de primeiro grau de celíacos, Biagi *et al* (2008) encontraram uma prevalência de 17,7%, confirmando que os parentes de DC têm alto risco de desenvolver intolerância ao glúten e reforçam a necessidade de uma política de rastreamento extensa nesses indivíduos. Na América Latina, um exemplo de prevalência elevada da DC foi observada no estudo de Araya *et al* (2000) que encontrou uma frequência da doença de 1:21 entre índios chilenos parentes de celíacos.

No Brasil, estudos anteriores, realizados com grupos de parentes de primeiro grau de pacientes celíacos, demonstraram positividade nos testes sorológicos de 15,7% (Kotze *et al*, 2001) a 21% (Utiyama *et al*, 2007) e, ainda, prevalência de DC de 4,8% (Almeida *et al*, 2008) entre os parentes estudados.

Já estudos sobre a frequência dos alelos HLA predisponentes para a DC na população em geral e, particularmente, entre parentes de primeiro grau de pacientes celíacos, são extremamente raros no Brasil. Silva *et al*, 2000, em um primeiro relatório sobre a associação de HLA e DC na população brasileira, detectaram em 25 pacientes celíacos na cidade de Ribeirão Preto, SP, que os alelos HLA-DRB1*03, DRB1*07 e DQB1*02 conferiam suscetibilidade à DC, sendo semelhantes aos observados em estudos europeus, reforçando, assim, a hipótese do envolvimento do sistema HLA na fisiopatologia da doença em nossa região geográfica. Entretanto, a maioria dos pacientes estudados era de ascendência italiana e é provável que, tendo em conta o contexto notavelmente misto racial da população brasileira, a frequência dos alelos predisponentes para a DC no Brasil pode mostrar variações regionais significativas.

No presente estudo, observou-se, no grupo de parentes, uma frequência de HLA-DQ2 também semelhante à descrita nos estudos europeus. Bonamico *et al*, 1996, encontraram entre irmãos de celíacos uma prevalência de 75% de HLA-DQ2. Farré *et al*, 1999, encontraram uma frequência de HLA-DQ2 de 64% entre parentes de celíacos, comparado a 18% nos controles. Dolinsek *et al*, 2004 encontraram uma prevalência de DC entre parentes de celíacos de 4,72% sendo que todos os diagnosticados carregavam o HLA-DQ2 ou DQ8. Em nosso estudo, o heterodímero DQ2 foi encontrado sozinho ou em conjunto com o alelo DRB1*04 em 119 (57,4%) dos parentes de celíacos estudados e pelo menos um dos alelos de risco foi encontrado em 196 (94,6%).

Ainda foi observado em nosso estudo, que entre os casos índices de celíacos, 86,6% apresentavam o HLA-DQ2 seja isoladamente ou em conjunto com a DRB1*04. Os demais casos apresentaram pelo menos um dos alelos pesquisados (DQA1*0501, DQB1*0201 e/ou DRB1*04) e apenas um deles não apresentou nenhum dos alelos predisponentes. Ainda, todos os indivíduos do grupo de parentes de celíacos diagnosticados durante a pesquisa, apresentaram os alelos

predisponentes HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e/ou DRB1*04/DQ8, seja isoladamente ou em associação.

Esses dados corroboram o exposto na literatura, que praticamente todos os pacientes com DC carregam o HLA-DQ2 (DQA1*05 and DQB1*02) e/ou o HLA-DQ8 (DQA1*03 and DQB1*0302), ou ainda, uma cadeia do heterodímero DQ2, codificada pelos alelos DQA1*05 (cadeia α 5) ou DQB1*02 (cadeia β 2). Apenas excepcionalmente a DC ocorre na ausência dos genes de risco do HLA-DQ e essa proporção varia de 0,4% a 0,7% (Karell *et al*, 2003).

Um estudo de Megiorni *et al* (2009) indicou a presença de um gradiente de risco dependendo de quais alelos DQ o indivíduo possui, variando de 1:7 entre indivíduos HLA-DQ2 e DQ8 positivos até 1:2518 para aqueles que não apresentam nenhum dos alelos predisponentes. Um aumento significativo do risco de desenvolvimento da DC também é determinado pela presença de uma (risco de 1:35) ou duas cópias (risco de 1:10) do alelo DQB1*02. A homozigose desse alelo é associada com um início mais precoce, com o aumento dos níveis de anticorpos anti-tTG, com o aumento da gravidade e complicações da doença.

Por outro lado, a presença de alelos DQA1*05 apresenta probabilidade extremamente baixa de desenvolvimento de intolerância ao glúten (risco de 1:1842) (Karinen *et al*, 2006; Al-Toma *et al*, 2006; Megiorni *et al*, 2009). Já em relação à presença apenas do DQ8, o estudo de Megiorni *et al* (2009) demonstra um risco considerável (1:89) para o desenvolvimento da DC.

Os testes genéticos como triagem para DC foram propostos para reduzir o número de testes diagnósticos de parentes de celíacos que, sendo negativos para HLA-DQ2 ou DQ8, têm um risco mínimo de desenvolvimento da DC. Desta forma, entre 10% e 20% de parentes de primeiro grau poderiam ser excluídos da realização de testes sorológicos (Karinen *et al*, 2006).

No entanto, em estudo recente, Chang & Green (2009) concluíram que o uso da tipagem genética antes da triagem sorológica para a DC, pelo custo atual do teste sorológico, não reduziria os custos de triagem. Uma redução substancial no custo da tipagem HLA seria necessária para que se pudesse tornar essa opção acessível. Possivelmente e, especialmente, em situações nas quais uma ampla abordagem é necessária, o uso de SNP mostrou alta especificidade e sensibilidade

na identificação de doença celíaca associada haplótipos HLA de risco e poderá ser utilizado com custos significativos de tempo e dinheiro (Monsuur *et al*, 2008; Koskinen *et al*, 2009).

Por outro lado, a tipagem dos parentes sorologicamente negativos seria justificável para determinar o risco futuro de desenvolvimento da DC. O fato de que indivíduos HLA positivos podem tornar-se celíacos em qualquer momento durante a sua vida (Niveloni *et al*, 2000; Pittschieler *et al*, 2003; Bonamico 2006) implicaria na necessidade de se testar periodicamente os parentes que inicialmente mostraram resultados sorológicos negativos. A tipagem do HLA permite a não prossecução do trabalho de acompanhamento dos indivíduos HLA negativos e elimina a necessidade de futura vigilância clínica (Rubio-Tapia *et al*, 2008).

Todavia, a oportunidade, e o momento do rastreamento de parentes de primeiro grau de pacientes celíacos HLA positivos assintomáticos, é ainda uma questão em aberto.

Vários estudos de acompanhamento defendem a reavaliação periódica dos parentes que tenham sido negativos em triagem inicial (Niveloni *et al*, 2000; Högborg *et al*, 2003; Pittschieler *et al*, 2003; Bonamico *et al*, 2006; Goldberg *et al*, 2007). Mas uma análise detalhada destes estudos mostra que o número de participantes foi reduzido, o desenho do estudo foi diferente e os números de incidência não são necessariamente comparáveis.

De qualquer forma, pode-se observar que, dentro de um acompanhamento de 7 a 12 anos, cerca de 2% a 5% de parentes soronegativos desenvolveram a doença (Collin e Kaukinen, 2008). Biagi *et al* (2008) em um período de sete anos de estudo de seguimento de 158 adultos parentes de primeiro grau de celíacos, encontraram uma incidência anual de DC de 0,4%. Eles não realizaram estudos genéticos em virtude do seu alto custo e chamaram a atenção para o fato de que quase 50% dos parentes sorologicamente negativos se recusaram a realizar um segundo teste.

Estes autores concluíram que, tendo em conta a taxa de incidência baixa, são necessários mais estudos antes de se decidir se parentes de primeiro grau de celíacos adultos devem ser seguidos ao longo do tempo e qual seria a melhor estratégia de seleção em termos de relação custo-benefício. Eles enfatizaram que os seus dados são válidos para parentes adultos, mas não para crianças. Estudos

similares são absolutamente necessários em crianças nas quais a maior expectativa de vida poderia tornar a necessidade de acompanhamento mais importante.

Pela tipagem HLA, em nosso estudo, 54,9% dos parentes não diagnosticados como celíacos, poderiam ser monitorados por meio da execução de testes sorológicos, por serem considerados de maior risco para o desenvolvimento da DC por apresentarem o HLA-DQ2 sozinho ou concomitantemente com o alelo DRB1*04. Ao contrário, 11 (5,3%) dos parentes de primeiro grau de celíacos estudados poderiam ser excluídos de mais acompanhamento por não apresentarem nenhum dos alelos pesquisados e, foram identificados ainda outros 21 (10,9%) com um grau de risco baixo para o desenvolvimento de DC no futuro por serem portadores apenas do alelo DQA1.

Temos ainda que 2,2% dos celíacos e 4,3% dos parentes de celíacos apresentaram apenas o alelo DRB1*04. A pesquisa desse alelo foi realizada devido a sua associação ao HLA-DQ8 (DQA1*0301 - B1*0302), que aparece com frequência nos casos de celíacos HLA-DQ2 negativos e, por estar descrita nos protocolos de Sacchetti *et al*, 1997 e Sacchetti *et al*, 2001, os quais nos baseamos para o presente estudo. Entretanto, o alelo DRB1*04 pode estar em desequilíbrio de ligação tanto com DQB1*0302 quanto com o DQB1*0301, sendo que apenas o DQB1*0302 está associado à DC (Karinen *et al*, 2006). Dessa forma, observa-se que a pesquisa do alelo DQB1*0302 seria preferencial à pesquisa do alelo DRB1*04, e que o risco de suscetibilidade à DC, do grupo de pacientes pesquisados que carregavam apenas esse gene, pode estar superestimado.

Em suma, as frequências de DC entre parentes de celíacos e da presença dos alelos HLA predisponentes para a doença encontradas no presente estudo se mostraram semelhantes às descritas em estudos já realizados entre parentes de celíacos. Esse fato demonstra que, também em nossa região geográfica, a alta frequência desses alelos entre os parentes de celíacos sugere que a essa é uma população de alto risco para o desenvolvimento da intolerância ao glúten e que há necessidade da investigação diagnóstica entre esses sujeitos.

No entanto, considerando-se o fator custo-benefício da tipagem rotineira dos alelos HLA predisponentes em todos os parentes de primeiro grau de pacientes celíacos, é nossa opinião que, a identificação do perfil HLA deverá ser decidida em

bases individuais levando em conta as características de cada indivíduo, suas preferências e a concomitante existência de outras patologias médicas.

Em consonância com Chang & Green (2009), concluímos que atualmente a tipagem de HLA não seria vantajosa, considerando-se que é um processo demorado e que seria útil apenas para uma percentagem relativamente pequena dos parentes de primeiro grau. Porém, considerando o alto valor preditivo negativo da ausência dos alelos predisponentes HLA-DQ2 e DQ8, a sua determinação se justificaria nos casos em que o diagnóstico definitivo da DC for questionável e para a exclusão dos pacientes HLA negativos da realização de mais testes sorológicos.

CONCLUSÕES

- Neste estudo, quatorze (6,7%) novos casos de DC foram identificados entre os 207 parentes investigados.
- Entre os pacientes celíacos do estudo, o HLA-DQ2 estava presente seja isoladamente ou em conjunto com a DRB1*04, em 86,6% dos casos. Os demais casos apresentaram pelo menos um dos alelos predisponentes para a DC (DQA1*0501, DQB1*0201 e/ou DRB1*04), e apenas um deles não apresentou nenhum dos alelos predisponentes.
- No grupo de parentes de primeiro grau de celíacos pesquisados, pelo menos um dos alelos de risco foi encontrado em 94,6%, e o HLA-DQ2 foi encontrado sozinho ou conjuntamente com o alelo DRB1*04 em 57,4%.
- Todos os parentes de celíacos diagnosticados durante o estudo apresentaram os alelos predisponentes HLA-DQ2 (DQA1*0501 e DQB1*0201) e/ou DRB1*04/DQ8, seja isoladamente ou em associação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamovic S, Amundsen SS, Lie BA, *et al.* Association study of IL2/IL21 and FcγRIIa: significant association with the IL2/IL21 region in Scandinavian coeliac disease families. *Genes Immun* 2008; 9:364–7.

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

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

Alper CA, Fleischnick E, Awdeh Z, Katz AJ, Yunis EJ. Extended major histocompatibility complex haplotypes in patients with gluten-sensitive enteropathy. *J Clin Invest.* 1987 Jan; 79(1):251-6.

Al-Toma A, Goerres MS, Meijer JW, Peña AS, Crusius JB, Mulder CJ. Human leukocyte antigen-DQ2 homozygosity and the development of refractory celiac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2006; 4:315-9.

Arentz-Hansen, H.; Komer, R.; Molberg, O.; Quarsten, H.; Vader, W.; Kooy, Y. M. C.; Lundin, K. E. A.; Koning, F.; Roepstorff, P.; Sollid, L. M.; McAdam, S. N. The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J. Exp. Med,* 2000; 191: 603-612.

Arranz E, Ferguson A. Intestinal antibody pattern of celiac disease: Occurance in patients with normal jejunal biopsy histology. *Gastroenterology* 1993; 104: 1263-72.

Arranz E. Enfermedad celíaca: factores genéticos. *Pediatrika* 2003; 23 (4): 145-48

Araya M, Mondragon A, Perez-Bravo F, Roessler JL, Alarcon T, Rios G, Bergenfreid C. Celiac disease in Chilean population carrying Amerindian traits. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000; oct ,31(4): 362-4.

Ascher H, Krantz I, Kristianssen B. Increased incidence of coeliac disease in Sweden. *Arch Dis Child* 1991; 66:608-11.

Babron, M.-C.; Nilsson, S.; Adamovic, S.; Naluai, A. T.; Wahlstrom, J.; Ascher, H.; Ciclitira, P. J.; Sollid, L. M.; Partanen, J.; Greco, L.; Clerget-Darpoux, F.; European Genetics Cluster on Coeliac Disease. Meta and pooled analysis of European coeliac disease data. *Europ. J. Hum. Genet.* 2003; 11: 828-834.

Barbieri, D. Doenças gastroenterológicas em pediatria. Dorina Barbieri, Yu Kar Ling Koda. São Paulo: Editora Atheneu. 1996; 21:176-188.

Baudon J-J, Johanet C, Absalon YB, Morgant G, Cabrol S, Mougenot J-F. Diagnosing celiac disease: A comparison of Human Tissue transglutaminase antibodies with antigliadin and antiendomysium antibodies. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2004; 158: 584-8.

Betuel H, Gebuhrer L, Descos L, Percebois H, Minaire Y, Bertrand J. Adult celiac disease associated with HLA-DRw3 and -DRw7. *Tissue Antigens*; 1980 Mar:15(3): 231-8.

Bevan S, Popat S, Houlston RS. Relative power of linkage and transmission disequilibrium test strategies to detect non-HLA linked coeliac disease susceptibility. *Gut* 1999; 45: 668-71

Biagi F, Campanella J, Bianchi PI, Zanellati G, Capriglione I, Klersy C, Corazza GR. The incidence of coeliac disease in adult first degree relatives. *Dig Liver Dis.* 2008;40:97-100.

Boger CP, Thomas PW, Nicholas DS, Surgenor SL, Snook JA. Determinants of endomysial antibody status in untreated coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007; 19:890-5.

Bonamico M, Mariani P, Mazzilli MC, Triglione P, Lionetti P, Ferrante P *et al.* Frequency and clinical Pattern of Celiac disease among siblings of celiac children. *J Ped gastroenterol Nutr* 1996; 23:159-63.

Bonamico M, Ferri M, Mariani P, Nenna R, Thanasi E, Luparia RPL *et al.* Serologic and genetic markers of celiac disease: A sequential study in the screening of first degree relatives. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 2006; 42:150-54.

Brandt KG, Silva GAP. Seroprevalence of celiac disease at a general pediatric outpatient clinic. *Arq Gastroenterol.* 2008;45:239-242.

Briani C, Samaroo D, Alaedini A. Celiac disease: from gluten to autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2008; 7:644-50.

Brick C, Bennani N, Atouf O, Essakalli M. HLA-A, -B, -DR and -DQ allele and haplotype frequencies in the Moroccan population: a general population study. *Transfusion Clinique et Biologique* 2006; 346–52.

Bürgin-Wolff A, Gaze H, Hadziselimovic F, Huber H, Lentze MJ, Nusslé D *et al.* Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. *Arch Dis Child* 1991; 66:941-947.

Carroccio A, Vitale G, Di Prima L, Chifari N, Napoli S, La Russa C, Gulotta G, Averna MR, Montalto G, Mansueto S, Notarbartolo A. Comparison of anti-transglutaminase ELISAs and an anti-endomysial antibody assay in the diagnosis of celiac disease: a prospective study. *Clin Chem.* 2002; 48:1546-50.

Cataldo F, Marino V, Ventura A, Botttaro G, Corrazza GR. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian

multicenter study. Italian Society of Paediatric Gastroenterology and Hepatology and "Club del Tenue" Working Groups on Coeliac Disease. *GUT* 1998; 42:362.

Catassi C, Ratsch IM, Fabiane E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F *et al.* Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet* 1994; 343: 200-3.

Catassi C, Fabiani E, Räscht IM, Ricci S, Bordicchia F, Pierdomenico R *et al.* High prevalence of undiagnosed coeliac disease in 5280 Italian students screened by antigliadin antibodies. *Acta Paediatr* 1995; 84:672-6.

Catassi C, Fabiani E, Räscht IM, Coppa GV, Giorgi PL, Pierdomenico R *et al.* The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin Antibodies screening for coeliac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr Suppl* 1996; 412:29-35.

Catassi C, Ratsch I, Gandolfi L, *et al.* Why is celiac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet* 1999; 354: 647-8.

Catassi C, Doloretta Macis M, Ratsch IM, De Virgilis 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; 58:402-5.

Catassi C, Cobellis, G. Coeliac disease epidemiology is alive and kicking, especially in the developing world. *Dig Liver Dis.* 2007;39:908-10.

Catassi C, Kryszak D, Louis-Jacques O, Duerksen DR, Hill I, Crowe, SE *et al.* Detection of celiac disease in primary care: A multicenter case finding study in North America. *Am J gastroenterol* 2007;102:1454-60.

Cerf-Bensussan N, Cellier C, Heyman M, Brousse N, Schmitz J. Coeliac disease: an update on facts and questions based on the 10th International Symposium on Coeliac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37:412-21.

Chang M, Green PHR. Genetic Testing Before Serologic Screening in Relatives of Patients With Celiac Disease as a Cost Containment Method. 1: J Clin Gastroenterol. 2009;43:43-50.

Chorzelski TP, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonska S, Beutner EH, Kumar V. IgA class endomysium antibodies (IgA-EMA) in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. Ann NY Acad Sci 1983; 420:324-5.

Cintado A, Sorell L, Galván JA, Martínez L, Castañeda C, Fragoso T, *et al.* HLA DQA1*0501 and DQB1*02 in Cuban celiac patients. Hum Immunol. 2006; 67:639-42.

Clot F, Gianfrani C, Babron MC, Bouguerra F, Southwood S, Kagnoff MF, Troncone R, Percopo S, Eliaou JF, Clerget-Darpoux F, Sette A, Greco L. HLA-DR53 molecules are associated with susceptibility to celiac disease and selectively bind gliadin-derived peptides. Immunogenetics; 1999 Aug;49(9):800-7.

Clot F, Babron MC. Genetics of celiac disease. Mol Genet Metab 2000; 71: 76-80.

Collin P, Reunala T, Pukkala E, Laippala P, Keyriläinen, Pasternack A. Coeliac disease associated disorders and survival. GUT 1994; 35:1215-18.

Collin P, Reunala T, Rasmussen M, *et al.* High incidence and prevalence of Adult coeliac disease: Augmented diagnostic approach. Scand J Gastroenterol 1997; 32:1129-33.

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

Corazza GR, Frisoni M, Treggiari EA, *et al.* Subclinical Celiac Sprue. J Clin Gastroenterol 1993, 16(1): 16-21.

Corazza GR, Di Sario A, Cecchetti L, *et al.* Bone mass and metabolism in patients with coeliac disease. Gastroenterology 1995; 109:122-8.

Corrão G, Corrazza GR, Bagnardi V, Brusco G, Giacci C, Cottoni M, Sategna Guidetti C *et al.* Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study. *Lancet* 2001; 358: 356-361.

Crovella S, Brandão L, Guimarães R, Crovella S, Ventura A. Speeding up coeliac disease diagnosis in developing countries. *Dig Liver Dis.* 2007; 39:900-2.

Davidson LSP, Fountain JR. Incidence of sprue syndrome with some observation on the natural history. *Br Med J.* 1950; 1:1157-61.

Dewar D, Pereira SP, Ciclitira PJ. The pathogenesis of coeliac disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36: 17-24.

Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of coeliac disease. *Nat Med.* 1997 jul; 3(7): 797-801.

Dieterich W, Laag E, Schopper H, *et al.* Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictor of coeliac disease. *Gastroenterology* 1998; 115:1317-21.

Dolinsek J, Urlep D, Karell K, Partanen J, Miceti-turk D. The prevalence of coeliac disease among family members of coeliac disease patients. *Wien Klin Wochenschr* 2004; 116:S8-12.

Dube C, Rostom A, Sy R, Cranney A, Saloojee N, Garrity C *et al.* The prevalence of coeliac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systemic review. *Gastroenterology* 2005;128:S57-67.

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

Farré C, Humbert P, Vilar P, Varea V, Aldeguer X, Carnicer J, Carballo M, Gassul M.A, and Catalanian coeliac disease study group. Serological Markers and HLA-DQ2 haplotype among first-degree relatives of coeliac patients. *Digestive Disease and Science*, 1999; vol 44, 11: 2344-2349.

Farrell R, Kelly CP. Current concepts: Celiac sprue. *N Engl J med* 2002;346:180-8.

Fasano A, Not T, Wang W, Uzzau S, Bert I, Tommasini A *et al.* Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 2000; 355:1518-9.

Fasano A. Celiac Disease: The Past, the Present, the Future. *Pediatrics* 2001; 107: 768-770.

Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S *et al.* Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: large multicenter study. *Arch Intern Med* 2003; 163: 286-92.

Fasano, A. Celiac disease--how to handle a clinical chameleon. (Editorial) *New Eng. J. Med.* 2003; 348: 2568-2570.

Fasano A, Catassi C. Coeliac disease in children. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2005 Jun; 19(3):467-78. Review.

Ferguson A, Array E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of celiac disease--active, silent, latent, potential. *Gut* 1993; 34:150-1.

Frezal, J.; Rey, J. Genetics of disorders of intestinal digestion and absorption. *Adv. Hum. Genet.* 1970; 1: 275-336.

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

Garrote JA, Arranz E, Tellería JJ, Castro J, Calvo C, Blanco-Quirós A. TNF alpha and LT alpha gene polymorphisms as additional markers of celiac disease susceptibility in a DQ2-positive population. *Immunogenetics.* 2002 Nov;54(8):551-5. Epub 2002 Oct 3.

Guandalini S, Gupta P. Celiac disease a diagnostic challenge with many facets. *Clin Applied Immunol* 2002; 2: 293-305.

Gobbi G, Bouquet F, Greco L, Lambertini A, Tassinari CA, Ventura A *et al.* Coeliac disease, epilepsy, and cerebral calcifications. The Italian Working Group on Coeliac Disease and Epilepsy. *Lancet* 1992; 340:439-43.

Goldberg D, Kryszak D, Fasano A, Green PH. Screening for celiac disease in family members: is follow-up testing necessary? *Dig Dis Sci.* 2007; 52:1082-6.

Gomez JC, Selvaggio GS, Viola M, Pizzarro B, la Motta G, *et al.* Prevalence of celiac disease in Argentina: Screening of an adult population in the La Plata area. *The American Journal of Gastroenterology* 2001; 96:2700-4.

Green PH. The many faces of celiac disease: clinical presentation of celiac disease in the adult population. *Gastroenterology.* 2005 Apr; 128 (4 Suppl 1):S74-8.

Greco L, Babron MC, Corazza GR, *et al.* Existence of a genetic risk factor on chromosome 5q in Italian coeliac disease families. *Ann Hum Genet* 2001; 65:35-41.

Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M *et al.* The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut* 2002; 50: 624-8.

Grodzinsky E, Franzen L, Hed J, Ström M. High prevalence of coeliac disease in healthy adults revealed by anti gliadin antibodies. *Ann Allergy* 1992; 69:66-70.

Hadithi M, von Blomberg BM, Crusius JB, Bloemena E, Kostense PJ, Meijer JW, Mulder CJ, Stehouwer CD, Peña AS. Accuracy of serologic tests and HLA-DQ typing for diagnosing celiac disease. *Ann Intern Med.* 2007;147:294-302.

Hallert C, Dereteldt T. Psychic disturbances in adult coeliac disease. I. Clinical observations. *Scand J Gastroenterol.* 1982; 17:17-9.

Hass SV. The value of the banana in the treatment of celiac disease. *Am J Dis Child* 1924; 24: 421-437.

Herrera M, Theiler G, Augustovski F, Chertkoff L, Fainboim L, DeRosa S, *et al.* Molecular characterization of HLA class II genes in celiac disease patients of Latin American Caucasian origin. *Tissue Antigens*. 1994;43:83-7.

Hervonen, K.; Karell, K.; Holopainen, P; Collin, P.; Partanen, J.; Reunala, T. Concordance of dermatitis herpetiformis and celiac disease in monozygous twins. *Invest. Derm.* 2000; 115: 990-993.

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

Hill ID. What are the sensitivity and specificity of serologic tests for celiac disease? Do sensitivity and specificity vary in different populations? *Gastroenterology* 2005 Apr; 128(4 Suppl 1):S25-32. Review.

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

Holmes GKT, Prior P, Lane MR, *et al.* Malignancy in coeliac disease - Effect of gluten- free diet. *Gut* 1989; 30:333-8.

Holmes GKT, Catassi C. *Fast Facts- Coeliac Disease*. Ed. Health Press, London: 2000; pp.55.

Holopainen, P.; Mustalahti, K.; Uimari, P.; Collin, P.; Maki, M.; Partanen, J. Candidate gene regions and genetic heterogeneity in gluten sensitivity. *Gut* 2001; 48: 696-701.

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

Hovhannisyan, Z.; Weiss, A.; Martin, A.; Wiesner, M.; Tollefsen, S.; Yoshida, K.; Ciszewski, C.; Curran, S. A.; Murray, J. A.; David, C. S.; Sollid, L. M.; Koning, F.; Teyton, L.; Jabri, B. The role of HLA-DQ8 beta-57 polymorphism in the anti-gluten T-cell response in coeliac disease. *Nature* 2008; 456: 534-538.

Hue, S.; Mention, J.-J.; Monteiro, R. C.; Zhang, S.; Cellier, C.; Schmitz, J.; Verkarre, V.; Fodil, N.; Bahram, S.; Cerf-Bensussan, N.; Caillat-Zucman, S. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during Celiac disease. *Immunity* 2004; 21: 367-377.

Hunt, K. A.; Zhernakova, A.; Turner, G.; Heap, G. A. R.; Franke, L.; Bruinenberg, M.; Romanos, J.; Dinesen, L. C.; Ryan, A. W.; Panesar, D.; Gwilliam, R.; Takeuchi, F.; and 25 others Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nature Genet.* 2008; 40: 395-402.

Iltanen S, Collin P, Korpela M, *et al.* Celiac disease and markers of coeliac disease latency in patients with primary Sjogren's syndrome. *Am J Gastroenterology* 1999; 94:1042.

Ivarsson SA, Carlsson A, Bredberg A, *et al.* Prevalence of coeliac disease in Turner syndrome. *Acta Paediatr* 1999; 88:933.

Janatuinen EK, Kempainen TA, Julkunen RJ, Kosma VW, Maki M, Heikkinen M, Uusitupa MI *et al.* No harm from five-year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut* 2002; 50:332-5.

Kagnoff MF, Austin RK, Hubert JJ, Bernardin JE, Kasarda DD. Possible role for a human adenovirus in the pathogenesis of celiac disease. *J Exp Med* 1984 Nov 1; 160(5): 1544-57.

Kagnoff MF. Overview and pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology* 2005; 128:S10-8.

Kagnoff M.F. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest.* 2007 Jan;117(1):41-9. Review.

Karell K, Louka A.S, Moodie S. J, Acher H, Clot F, Greco L, Ciclitira P. J, Sollid L.M, Partanen J and Members of the European Genetics Cluster on Celiac Disease. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1* 02 (DQ2) heterodimer: results from the European genetics cluster on celiac disease. *Humam Immunology* 2003; 64:469-477.

Karinen H, Kärkkäinen P, Pihlajamäki J, Janatuinen E, Heikkinen M, Julkunen R, Kosma VM, Naukkarinen A, Laakso M. HLA genotyping is useful in the evaluation of the risk for coeliac disease in the 1st-degree relatives of patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.* 2006; 41:1299-304.

Kennedy NP, Feighery C. Clinical features of celiac disease today. *Biomed & Pharmacother* 2000; 54:373-80.

Kim, C.-Y.; Quarsten, H.; Bergseng, E.; Khosla, C.; Sollid, L. M. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2004; 101: 4175-4179.

King AL, Ciclitira PJ.Celiac disease: strongly heritable, oligogenic, but genetically complex. *Mol Genet Metab.* 2000 Sep-Oct; 71(1-2):70-5.

King, A. L.; Fraser, J. S.; Moodie, S. J.; Curtis, D.; Dearlove, A. M.; Ellis, H. J.; Rosen-Bronson, S.; Ciclitira, P. J. Coeliac disease: follow-up linkage study provides further support for existence of a susceptibility locus on chromosome 11p11. *Ann. Hum. Genet.* 2001; 65: 377-386.

Koskinen L, Romanos J, Kaukinen K, Mustalahti K, Korponay-Szabo I, Barisani D, Bardella MT, Ziberna F, Vatta S, Széles G, Pocsai Z, Karell K, Haimila K, Adány R, Not T, Ventura A, Mäki M, Partanen J, Wijmenga C, Saavalainen P. Cost-effective HLA typing with tagging SNPs predicts celiac disease risk haplotypes in the Finnish, Hungarian, and Italian populations. *Immunogenetics*. 2009; 61:247-56.

Kotze LMS, Utiyama SRR, Nishihara RM, Zeni MPB, Sena MG, Amarante HMS. Antiendomysium antibodies in Brazilian patients with celiac disease and their first degree relatives. *Arq Gastroenterol*. 2001; 38:94-103.

Lebenthal E, Branski D. Celiac disease: An emerging global problem. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2002; Oct. 35: 472-474.

Liu, J.; Juo, S.H.; Holopainen, P.; Terwilliger, J.; Tong, X.; Grunn, A.; Brito, M.; Green, P.; Mustalahti, K.; Maki, M.; Gilliam, T. C.; Partanen, J. Genomewide linkage analysis of celiac disease in Finnish families. *Am. J. Hum. Genet*. 2000; 70: 51-59.

Liu E, Rewers M, Eisenbarth GS. Genetic testing: who should do the testing and what is the role of genetic testing in the setting of celiac disease? *Gastroenterology* 2005; 128: S33-37.

Lopez-Vazquez A, Rodrigo L, Fuentes D, Riestra S, Bousoño C, Garcia-Fernandez S, Martinez-Borra J, Gonzalez S, Lopez-Larrea C. MHC class I chain related gene A (MICA) modulates the development of coeliac disease in patients with the high risk heterodimer DQA1*0501/DQB1*0201. *Gut*. 2002 Mar; 50(3):336-40.

Louka AS, Sollid LM. HLA in celiac disease: Unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens* 2003; 61: 105 -17.

Lubrano E, Ciacci C, Ames PR, Mazzacca G, Oriente P, Scarpa R. The arthritis of coeliac disease: prevalence and pattern in 200 adult patients. *Br J Rheumatol*. 1996 Dec; 35(12):1314-8.

McDonald, W. C.; Dobbins, W. O., III; Rubin, C. E. Studies of the familial nature of celiac sprue using biopsy of the small intestine. *New Eng. J. Med.* 1965; 272: 448-456.

McManus R, Wilson AG, Mansfield J, Weir DG, Duff GW, Kelleher D. TNF2, a polymorphism of the tumour necrosis-alpha gene promoter, is a component of the celiac disease major histocompatibility complex haplotype. *Eur J Immunol.* 1996 Sep; 26(9):2113-8.

Maiuri L, Ciacci C, Vacca L, Ricciardelli I, Auricchio S, Quarantino S, Londei M. IL-15 drives the specific migration of CD94+ and TCR-gammadelta+ intraepithelial lymphocytes in organ cultures of treated celiac patients. *Am J Gastroenterol.* 2001 Jan; 96(1): 150-6.

Maki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet* 1997; 349:1755-1759.

Maki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T *et al.* Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N Eng J Med* 2003; 348:2517-24.

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

Mazzilli MC, Bonamico M. Role of the HLA class II molecules in the pathogenesis of coeliac disease. In: G. Gobbi *et al*, editors. *Epilepsy and neurological disorders in coeliac disease*. London: Ed. John Libbey & Company Ltd.; 1997. p.55-58.

Meeuwisse G. Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paediatr Scand* 1970; 59:461.

Megiorni F, Mora B, Bonamico M, Barbato M, Nenna R, Maiella G, Lulli P, Mazzilli MC. HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Hum Immunol.* 2009; 70:55-9.

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

Meresse, B.; Chen, Z.; Ciszewski, C.; Tretiakova, M.; Bhagat, G.; Krausz, T. N.; Raulet, D. H.; Lanier, L. L.; Groh, V.; Spies, T.; Ebert, E. C.; Green, P. H.; Jabri, B. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 2004; 21: 357-366.

Molberg O, McAdam SN, Sollid LM. Role of tissue transglutaminase in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000; 30:232-240.

Monsuur, A.J.; de Bakker, P.I.W.; Alizadeh, B. Z.; Zhernakova, A.; Bevova, M. R.; Strengman, E.; Franke, L.; van't Slot, R.; van Belzen, M. J.; Lavrijsen, I. C. M.; Diosdado, B.; Daly, M. J.; Mulder, C. J. J.; Mearin, M. L.; Meijer, J. W. R.; Meijer, G. A.; van Oort, E.; Wapenaar, M. C.; Koeleman, B. P. C.; Wijmenga, C. Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nature Genet.* 2005; 37: 1341-1344.

Monsuur A.J., de Bakker P.I.W., Zhernakova A, Pinto D, Verduijn W, Romanos J, Auricchio R, Lopez A, van Heel DA, Crusius JB, Wijmenga C. Effective detection of human leukocyte antigen risk alleles in celiac disease using tag single nucleotide polymorphisms. *PLoS One.* 2008; 3:e2270.

Mustalahti K, Bravi E, Caradonna M, Fabiani E, Catassi C, Reunanen A *et al.* Coeliac disease in Finland – even more common than thought before. *J Pediatric Gastroenterol Nut* 2004; 39:56.

Naluai, A. T.; Nilsson, S.; Gudjonsdottir, A. H.; Louka, A. S.; Ascher, H.; Ek, J.; Hallberg, B.; Samuelsson, L.; Kristiansson, B.; Martinsson, T.; Nerman, O.; Sollid, L. M.; Wahlstrom, J. Genome-wide linkage analysis of Scandinavian affected sib-pairs

supports presence of susceptibility loci for celiac disease on chromosomes 5 and 11. *Europ. J. Hum. Genet.* 2001; 9: 938-944.

Neuhausen SL, Feolo M, Farnham J, *et al.* Linkage analysis of HLA and candidate genes for celiac disease in a North American family-based study. *BMC Med Genet* 2001; 2:12. Epub; 2001 Nov 30.

Niveloni S, Pedreira S, Sugai E, Vasquez H, Smecuol E, Fiorini A, Cabanne A, Dezi R, Valero J, Kogan Z, Maurino E, Bai JC. The natural history of gluten sensitivity: report of two new celiac disease patients resulting from a long-term follow-up of non-atrophic, first-degree relatives. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:463-8.

Not T, Hovarth K, Hill ID, *et al.* Celiac disease risk in the USA: High prevalence of antiendomysium antibodies in healthy blood donors. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33:494-8.

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

Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA, Cortez AJ, Carvalho FO, Bordin JO, de Camargo Soares MA, da Silva Patricio FR, Kawakami E, de Moraes MB, Fagundes-Neto U. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007;19(1):43-9.

O'Mahony s, Arranz E, Barton JR & Ferguson A. Dissociation between systemic and mucosal humoral immune responses in coeliac disease. *Gut* 1991; 32: 29-35.

Paveley WF. From Aretaeus to Crosby: a history of coeliac disease. *BJM* 1988; 24-31 dec (297): 1646-49.

Peña-Quintana L, Torres-Galván MJ, Déniz-Naranjo MC, Ortigosa-Castillo L, Ramos-Varela JC, Calvo-Hernandéz F, Fiuza-Pérez MD, Rodríguez-Gallego JC, Sánchez-

García F. Assessment of the DQ heterodimer test in the diagnosis of celiac disease in the Canary Islands (Spain). *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2003; 37 (5): 604-8

Pender SL, Tickle SP, Docherty AJ, Howie D, Wathen NC, Mac Donald TT. A major role for matrix metalloproteinases in T cell injury in the gut. *J Immunol.* 1997; 158(4):1582-90.

Pereira MA, Ortiz-Agostinho CL, Nishitokukado I, Sato MN, Damiao AO, Alencar ML, Abrantes-Lemos CP, Cancado EL, de Brito T, Ioshii SO, Valarini SB, Sipahi AM. Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(40):6546-50.

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

Ploski R, Ek J, Thorsby JE, Sollid LM. On the HLA-DQ (A1*0501, B1*0201) associated susceptibility in coeliac disease: a possible gene dose effect of DQB1*0201. *Tissue Antigens* 1993; 41:173-77.

Polvi A, Maki M, Partanen J. Celiac patients predominantly inherit HLA-DPB1*0101 positive haplotype from HLA-DQ2 homozygous parent. *Hum Immunol.* 1997 Apr 1;53(2):156-8.

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

Reunala T, Kosnaai T, Karpati S, *et al.* Dermatitis herpetiformis: jejunal findings and skin response to gluten free diet. *Arch Dis Child,* 1984; 59:517

Robins G, Howdle PD. Advances in celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2005; 21: 152-161.

Romanos, J.; Barisani, D.; Trynka, G.; Zhernakova, A.; Bardella, M. T.; Wijmenga, C. Six new coeliac disease loci replicated in an Italian population confirm association with coeliac disease. *J. Med. Genet.* 2009; 46: 60-63.

Rossi, T. M.; Albini, C. H.; Kumar, V. Incidence of celiac disease identified by the presence of serum endomysial antibodies in children with chronic diarrhea, short stature, or insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Pediatr*, 1993. 123: 262-264.

Rubio-Tapia A, Van Dyke CT, Lahr BD, Zinsmeister AR, El-Youssef M, Moore SB, Bowman M, Burgart LJ, Melton LJ 3rd, Murray JA. Predictors of family risk for celiac disease: a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6:983-7.

Sacchetti L, Sarrantonio C, Pastore L, Carlino V, Calcagno G, Ferrajolo A, Salvatore F. Rapid identification of HLA DQA1*0501, DQB1*0201, and DRB1*04 alleles in celiac disease by PCR-based methodology. *Clin Chem.* 1997;43:2204-6.

Sacchetti L, Tinto G, Calcagno G, Improta P, Salvatore F. Multiplex PCR typing of the three most frequent HLA alleles in celiac disease. *Clinica Chimica Acta* 310 2001; 205-207.

Sagodi L, Solyom E, Tamasi K, Minik K. Prevalence of coeliac disease in Turner syndrome. *Orv Hetil.* 2006; 25, 147:1185-88.

Savilahti E, Simell O, Koskimes S, *et al.* Coeliac disease in insuline-dependent diabetes mellitus. *J Pediatr* 1986; 108: 690.

Savilahti E, Ormala T, Maki M. Density of gamma/delta+ Tcells in the jejunal epithelium of patients with celiac disease and dematitis herpiformis in increased with age. *Clin Exp Immunol* 1997; 109:464-467.

Schuppan D. Current concepts of celiac disease pethogenesis. *Gatroenterology* 2000; 119: 234-42.

Shan L, Molberg O, Parrot I. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*. 2002; 297:2275-9.

Sher KS, Mayberry JF. Female fertility, obstetric and gynaecological history in coeliac disease: A case control study. *Acta Paediatr* 1996; 412(suppl): 76-7.

Silva EM, Fernandes MI, Galvao LC, Sawamura R, Donadi EA. Human leukocyte antigen class II alleles in White Brazilian patients with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31:391-4.

Sollid LM, Markussen G, Ek J, *et al.* Evidence for a primary association of celiac disease to particular HLA-DQ $\alpha\beta$ heterodimer. *J Exp Med* 1989; 169: 345.

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

Sollid LM, Lundin K E A *et al.* HLA-DQ molecules, peptides and T cells in coeliac disease. In: Markku Mäki, Pekka Collin, JK Visakorpi, editors. *Coeliac Disease. Proceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease*. Finland: Tampere; September 5-7, 1996. p. 265-274.

Sollid LM, Molberg O, McAdam S, Lundin KE. Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase-guilt by association? *Gut*. 1997;41(6):851-2.

Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:53-81.

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

Sollid LM. Hunting for celiac disease genes. *Gastroenterology*. 2008;134:869-71.

Spurkland A, Sollid LM, Polanco I, Vartdal F, Thorsby E: HLA DR and QD genotypes of celiac disease patients serologically typed to be non-DR3 and non-DR5-7. *Hum Immunol*, 1992; 35:188.

Trabace S, Giunta A, Rosso M, Marzorati D, Cascino I, Tettamanti A, Mazzilli MC, Gandini E. HLA-ABC and DR antigens in celiac disease. A study in a pediatric Italian population. *Vox Sang*. 1984; 46(2):102-6.

Thorsby E. HLA associated diseases. *Hum Immunol* 1997; 53:1-11.

Trejdosiewicz LK, Calabrese A, Smart CJ *et al.* $\gamma\delta$ T cell receptor-positive cells of the human gastrointestinal mucosa: occurrence and V region gene expression in *H. pylori*-associated gastritis, coeliac disease and inflammatory bowel disease. *Clin.Exp.Immunol* 1991; 84:440-444.

Trevisol C, Brandt KG, Pontes Silva GA, Crovella S, Ventura A. High prevalence of unrecognized celiac disease in an unselected hospital population in North-Eastern Brazil (Recife-Pernambuco). *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004; 39:214-5.

Troncone R, Greco L, Auricchio S. Gluten sensitive enteropathy. *Pediatr Clin North Am* 1996; 43: 355-73.

Troncone R, Maurano F, Rosse M, Micillo M, Greco L, Auricchio R, Salerno G, Salvatore F, Sacchetti L. IgA antibodies to tissue transglutaminase: An effective diagnostic test for celiac disease. *J. Pediatr* 1999, 134: 166-71.

Tümer L, Hasanoglu A, Aybay C. Endomysium antibodies in the diagnosis of celiac disease in short-statured children with no gastrointestinal symptoms. *Pediatr Int*. 2001 Feb; 43(1):71-3.

Unsworth DJ. ACP Broadsheet No 149: September 1996. Serological diagnosis of gluten sensitive enteropathy. *Clin Pathol*. 1996; 49:704-11.

Utiyama SRR, Nass FR, Kotze LMS, Nisihara RM, Ambrosio AR, Messias-Reason IT. Serological screening of relatives of celiac disease patients: antiendomysium

antibodies, anti-tissue transglutaminase or both? *Arq. Gastroenterol.* 2007; 44:156-61.

Vader, W.; Stepniak, D.; Kooy, Y.; Mearin, L.; Thompson, A.; van Rood, J. J.; Spaenij, L.; Koning, F. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2003; 100: 12390-12395.

van Belzen MJ, Meijer JW, Sandkuijl LA, *et al.* A major non-HLA locus in celiac disease maps to chromosome 19. *Gastroenterology* 2003;125:1032–41.

van Berge-Henegouwen GP, Mulder CJJ. Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten free diet. *Gut* 1993; 34:1473-5.

van Heel D.A., West J. Recent advances in celiac disease. *Gut* 2006; 55:1037-46.

van Heel, D.A.; Franke, L.; Hunt, K. A.; Gwilliam, R.; Zhernakova, A.; Inouye, M.; Wapenaar, M. C.; Barnardo, M. C. N. M.; Bethel, G.; Holmes, G. K. T.; Feighery, C.; Jewell, D.; and 16 others. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nature Genet.* 2007; 39: 827-829.

Ventura A, Maguzzu G, Greco L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. *Gastroenterol* 1999; 117:297-303.

Visakorpi JK. Changing features of coeliac disease. In: Markku Mäki, Pekka Collin, JK Visakorpi, editors. *Coeliac Disease. Proceedings of the Seventh International Symposium on Coeliac Disease.* Finland: Tampere; September 5-7, 1996. p. 1-7

Volta U, Molinaro N, Fusconi M, Cassani F, Bianchi FB. IgA antiendomysial antibody test. A step forward in celiac disease screening. *Dig Dis Sci.* 1991; 36:752-6.

Volta U, De Franceschi L, Molinaro N, Cassani F, Muratori L, Lenzi M, Bianchi FB, Czaja AJ. Frequency and significance of anti-gliadin and anti-endomysial antibodies in autoimmune hepatitis. *Dig Dis Sci*. 1998 Oct;43(10):2190-5.

Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnostic of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990; 65: 909-11.

Wang W, Uzzau S, Goldblum SE, Fasano A. Human Zonulin, a potential modulator of intestinal tight junctions. *J Cell Sci*. 2000; 113:4435-40.

Weile B, Grodzinsky E, Skogh T, Jordal R, Cavell B, Krasilnikoff PA. Screening Danish blood donors for antigliadin and antiendomysium antibodies. *Acta Paediatrica* 1996; 85 (suppl 412): 46.

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

Wieser H. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatrica* 1996; suppl 412: 3- 9.

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

Zubillaga P, Vidales MC, Zubillaga I, Ormarchea V, García-Urkía N, Vitoria JC. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genetic markers and clinical presentation in celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 2002; 34 (5): 548-54.

APÊNDICE 1

Artigo Original: Gastroenterologia Clínica

Rastreamento sorológico e tipagem genética em pacientes com doença celíaca e em seus parentes de primeiro grau.

Serologic screening and genetic testing among Brazilian patients with celiac disease and their first-degree relatives.

Rita de Cássia Azevedo Martins¹, Lenora Gandolfi^{1,2,3}, Inês Cristina Modelli^{1,3}, Rodrigo Coutinho de Almeida^{1,2}, Luiz Claudio Castro³, Riccardo Pratesi^{1,2,3}

1. Graduate Program in Health Sciences, University of Brasília School of Health Sciences, Brasília, DF, Brazil
2. Pediatric Research Center and Celiac Disease Investigation Center, University of Brasilia School of Medicine, Brasilia, DF, Brazil
3. Pediatric Department, Brasília University Hospital, University of Brasilia School of Medicine, Brasilia DF, Brazil

Corresponding author:

Riccardo Pratesi, MD, PhD

SQN 212 – Bloco F – Apto 605

CEP 70864-060 – Brasília – DF – Brazil

pratesir@unb.br or pratesir@gmail.com

Tels. 61-3307-2134, 61-3340-9192, 61-9298-6028

RESUMO

Introdução: A susceptibilidade para a doença celíaca (DC) está principalmente associada à presença dos alelos HLA DQA1*0501 e DQB1*0201 (que conjuntamente codificam o heterodímero DQ2), os quais são praticamente encontrados em todos os pacientes celíacos. O heterodímero DQ8 (codificado pelos alelos DQA1*03 e DQB1*0302) associado ao haplotipo DRB1*04 (DR4) é comumente encontrado nos pouco pacientes celíacos que não carregam o heterodímero DQ2. **Objetivos:** O propósito deste estudo foi determinar a prevalência de DC em grupo de parentes de primeiro grau de pacientes celíacos e a frequência da presença de alelos HLA predisponentes tanto nos pacientes celíacos como em seus parentes de primeiro grau, identificando neste último grupo, os que iriam necessitar de futuros testes diagnósticos. **Métodos:** Noventa pacientes celíacos e 207 dos seus parentes de primeiro grau foram submetidos a testes sorológicos para a DC (pesquisa de anticorpos antiendomísio e antitransglutaminase) sendo a seguir efetuada biopsia intestinal nos pacientes sorologicamente positivos. Tanto nos pacientes celíacos como em seus parentes foi determinada a frequência de alelos HLA-DQA1*0501, DQB1*0201 e DRB1*04 pela técnica de PCR. **Resultados:** Todos os pacientes celíacos (n=90), com exceção de um (1.1%) eram portadores de pelo menos um dos alelos investigados. Onze (5.3%) dentre os 207 parentes de celíacos não carregavam nenhum dos alelos predisponentes para DC. Quatorze (6.7%) novos casos de DC foram identificados entre os 207 parentes investigados. **Conclusões:** Considerando o fator custo-benefício da tipagem rotineira dos alelos HLA predisponentes em todos os parentes de primeiro grau de pacientes celíacos é nossa opinião que a identificação do perfil HLA deverá ser decidida em bases individuais levando em conta as características de cada indivíduo, suas preferências e a concomitante existência de outras patologias médicas.

Descritores: doença celíaca, testes sorológicos, triagem genética, familiares

ABSTRACT

Introduction: Celiac disease (CD) susceptibility has been shown to be associated with the HLA alleles DQA1*0501 and DQB1*0201 (together encoding the DQ2 heterodimer) that are present in practically all CD patients. The DQ8 heterodimer (coded by DQA1*03-DQB1*0302), which is carried on a DRB1*04 (DR4) haplotype, is commonly encoded for by the few celiacs who do not carry the DQ2 heterodimer. Only a few CD patients have been reported without these known risk alleles. **Objective:** The aim of this study was to assess the prevalence of CD in a group of first degree relatives (FDR) of celiac patients, and the frequency of HLA predisposing alleles both in the group of celiac patients and in their FDR, identifying those FDR who would need further screening for CD. **Methods:** Ninety CD patients and 207 FDR underwent serologic screening for CD (endomysial and transglutaminase antibodies) followed by intestinal biopsy in positive patients. The HLA-DQA1*0501, DQB1*0201 and DRB1*04 frequencies of celiac patients and their FDR were determined utilizing the PCR method. **Results:** All the CD patients (n=90) with the exception of one (1.1%) carried at least one of the alleles investigated. Altogether 11 (5.3%) of the investigated FDR did not carry any of the alleles studied. Fourteen (6.7%) new cases of CD were found among the 207 CD patients FDR. **Conclusions:** Considering the cost-benefit of the HLA typing of all the FDR of celiac patients, their HLA status should be decided on an individual basis, taking account of their profile and preferences, and the existence of other medical conditions.

Keywords: celiac disease, serological tests, genetic screening, relatives

INTRODUCTION

Celiac disease (CD) is an autoimmune disorder triggered by the ingestion of gluten and related cereals, resulting in jejunal villous atrophy and flattening of mucosa. The disease has a strongly genetic basis that has been confirmed by a concordance rate among monozygotic twins and a higher prevalence among family members of celiac patients ⁽⁴⁷⁾.

CD was initially considered a rare malabsorption syndrome in childhood affecting predominantly Europeans or individuals of European ancestry. Today CD is recognized as a common disorder with an increasing prevalence in the general population, being described in several different non-European countries ⁽¹¹⁾. It manifests at any age, with a large proportion of new cases being diagnosed in patients with extraintestinal manifestations. Prevalence in Brazil is apparently similar to those found in European countries. Screening studies performed during the last decade showed a prevalence varying from 1:213 to 1:681 in presumably healthy blood donors ^(19, 31, 34) and from 1:53 to 1:417 in the general population in different Brazilian regions ^(38, 43, 35, 15).

Although CD is one of the most common autoimmune lifelong diseases, most affected individuals remain undiagnosed ⁽¹²⁾. This is probably due to the fact that many patients have atypical symptoms or none at all. CD aggregates in families and this is the first observable clue to its genetic susceptibility. Concordance in monozygotic twins is high at approximately 75% ⁽²¹⁾, whereas prevalence among first-degree relatives (FDR) varies from 5 to 22.5% ⁽¹⁶⁾.

CD has a strong genetic association with the human leucocyte antigen (HLA) that is estimated to account for up to 40% of genetic load ⁽⁴⁾. Practically all patients with CD are positive for the DQA1*0501 and DQB1*02 alleles which, either *in cis* or *in trans*, form the DQ2 heterodimer ⁽⁴²⁾. Most CD patients who lack the entire DQ2 complex have at least one of the alleles coding for it, either DQA1*0501 or DQB1*02. The DQ8 heterodimer (coded by DQA1*03-DQB1*0302), which is carried on a DRB1*04 (DR4) haplotype, is commonly encoded for by the few celiacs who do not carry the DQ2 heterodimer. Only a few CD patients have been reported without these known risk alleles ^(25, 26).

Considering that as many as 20-30% of healthy subjects in the general population are also carriers of these alleles, the value of HLA typing in CD is mainly considered for its negative predictive value since the disorder very rarely develops unless a person carries alleles that encode for HLA-DQ2 or DQ8^(25, 22). Despite the fact that its results are not absolutely certain, HLA typing for CD is generally considered as an important tool in the definition of dubious cases and in the screening strategy for asymptomatic individuals who belong to at-risk groups such as the case of FDR of celiac patients. The HLA alleles are lifelong stable markers and their typing may detect genetically susceptible or non-susceptible subjects long before the possible appearance of the disorder^(23, 30).

Studies on the prevalence of HLA alleles predisposing to CD in the general population and studies on the risk among FDR of celiac patients remain scarce in Brazil. In view of the largely mixed racial background of the Brazilian population, it is likely that such studies will show significant regional variations. Consequently, the aims of the present study were to assess: (1) the frequency of undiagnosed CD among FDR of celiac patients applying highly sensitive serologic tests (IgA-EMA and IgA-tTG), and (2) the frequency of HLA predisposing alleles DQA1*0501 e DQB1*0201 and DRB1*04 in a group of CD patients, and their FDR.

MATERIALS AND METHODS

Population and Design

Between January 2004 and December 2008, FDR (parents, siblings and offspring) of 90 CD patients diagnosed according to the ESPGAN criteria (Walter-Smith *et al.*, 1990) who attended the Brasilia University Hospital Gastroenterology Clinics were invited to take part in the study. None of these index cases were related to each other. The group was composed of 55 (61.1%) females and 35 (38.9%) males (mean age at diagnosis, 15.5 years; age range, 1 to 55 years).

Of the initial group of 298 identified FDR, 91 could not be located or refused to participate. The remaining group of 207 family members included 122 parents (44 fathers and 78 mothers, aged 18–75 years; mean age 40 years; median 42 years),

63 siblings (29 brothers and 34 sisters, aged 1–48 years; mean age 16 years; median 14 years) and 22 offspring (11 males and 11 females, aged 1–32 years; mean age 10 years; median 11 years).

The Brasilia University Hospital is a general hospital attending to mainly low-income population originating from the outskirts and suburban regions of the city of Brasilia (Federal District). Racially, this is a predominantly mixed-blood population in which a considerable contribution of European ancestry can be detected in association with a variable parcel of other races, mainly Africans and, to a lesser extent, Amerindians.

The study protocol was approved by the institution Ethics Committee of the Brasilia University School of Health Sciences (protocol CEP-FM 051/2003). Eligible patients and healthy family members received written and oral information concerning the use of their blood in this study, and all provided signed consent. All participant family members were on a gluten-containing diet when the serologic tests were performed. On each participant relative was applied a standardized questionnaire focusing on the presence of gastrointestinal signs and symptoms, and the presence of other symptoms, not related to the gastrointestinal tract but frequently seen in association with CD (atypical form).

Serologic Markers

Blood samples were centrifuged to separate the serum and stored at -20 °C for further use. All sera were previously tested by turbidimetric immunoquantification (COBAS MIRA, Roche Diagnostic Systems) to determine immunoglobulin A level, to exclude IgA deficiency. The serologic screening included: (1) Serum IgA endomysial antibody test (IgA-EMA) determined by indirect immunofluorescence method using sections from the distal portion of monkey's esophagus (The Binding Site, Birmingham, UK) as substrate. The patient's serum was diluted 1:5 in phosphate buffer at pH 7.4. The final reaction was detected with fluorescein isothiocyanate (FITC) rabbit anti-human IgA conjugate (Biosystems, Barcelona, Spain). Two independent observers examined all the slides and results were considered positive when bright green fluorescence of the reticulin like staining of smooth muscle was seen under fluorescence microscope. (2) IgA human recombinant

antitransglutaminase antibody (IgA-tTG) evaluated with by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacturer instructions (INOVA Diagnostic Inc., San Diego, California, USA).

Genetic Markers

Genomic DNA was extracted from peripheral venous blood using a commercial kit (Illustra™ Blood genomicPrep Mini Spin, GE Helathcare, Buckinghamshire, UK). Celiac patients and relatives were typed for the presence of HLA DQ2 (DQA1*0501,DQB1*0201) and DRB1*04 by PCR applying the method described by Sacchetti *et al.*⁽⁴⁰⁾. PCR products were separated by pre-stained ethidium bromide agarose gel electrophoresis and subsequently visualized by UV illumination as separated bands of 177 bp (DRB1*04), 144 bp (DQA1*05) e 110 bp (DQB1*0201). Equivocal results were retested and confirmed using the kit Eu-DQ (Eurospital, Trieste, Italy).

Small Bowel Histology

Intestinal biopsy was suggested to all IgA-EMA or IgA-tTG positive subjects. In addition, serologic follow-up was advised to all relatives who were carriers of the predisposing HLA alleles. Children underwent small intestinal biopsy with a Watson paediatric capsule, samples being taken at the ligament of Treitz. In adults, biopsy samples were obtained through an endoscopy procedure, using an Olympus gastroscop (Tokyo, Japan) with four to five fragments being taken from the second portion of the duodenum. All biopsy specimens were blindly evaluated by a pathologist and a gastroenterologist and classified according to Marsh⁽²⁶⁾ as type (O) normal, (I) infiltrative, (II) infiltrative hyperplastic, (III) flat destructive, and (IV) atrophic hypoplastic.

RESULTS

Increased levels of IgA-tTG were present in 18 of the 207 CD relatives (8.7%), whereas 14 of 207 (6.7%) were both IgA-tTG and IgA-EMA positive. Three of the four subjects who were tTG positive and EMA negative, respectively aged 6, 13, 34 years, were carriers of the DQ2 heterodimer and underwent jejunal biopsy with normal results. The fourth subject, an asymptomatic mother aged 48 years, that had disclosed only a slightly increased level of IgA-tTG was negative for predisposing alleles and was consequently considered as non-celiac. Intestinal biopsy was suggested and subsequently carried out in all the 14 subjects positive in both serological tests, and reported compatible with the diagnosis of CD in all cases.

Eleven (78.5%) of these 14 patients were carriers of the HLA-DQ2 heterodimer, two carried concomitantly the DQ2 heterodimer and the DRB1*04 allele. Only one of the CD diagnosed relatives was negative for the DQ2 heterodimer, being a carrier of a single DQB1*0201 allele in association with the DRB1*04 allele. Consequently, the strict prevalence of biopsy proven celiac disease among the 1st degree relatives of CD patients was 6.7% (14/207). Among this group of 14 relatives diagnosed as celiac, six (4.9%) were parents (2 mothers, 4 fathers), six (9.5%) were siblings (5 sisters, 1 brother) and two (9%) were offsprings (1 girls, 1 boys) (Table 1).

Only one relative showed a silent form of the disease, despite the fact that she was positive in both serologic tests, was a carrier of a DQ2 allele, and her biopsy sample disclosed Marsh III jejunal lesions. The remaining 13 disclosed a variety of signs and symptoms, including diarrhea, anemia, abdominal distension, fatigue, recurrent abdominal pain, joint pain and depression.

Table 1 - Serologic, molecular, histologic and clinical findings in 14 first-degree relatives identified as celiac

N	Age	Genre	Kinship	Ttg	EMA	HLA	Biopsy
1	08	Female	Daughter	184,8	Positive	DQB1& DRB1	Marsh III
2	28	Female	Mother	91,7	Positive	DQ2	Marsh III
3	5	Male	Brother	246,5	Positive	DQ2	Marsh III
4	40	Female	Sister	94,2	Positive	DQ2 & DRB1	Marsh III
5	12	Female	Sister	82,8	Positive	DQ2	Marsh I
6	22	Female	Sister	213,2	Positive	DQ2	Marsh III
7	59	Male	Father	109,3	Positive	DQ2	Marsh II
8	36	Female	Mother	37,4	Positive	DQ2	Marsh I
9	35	Male	Father	31,3	Positive	DQ2	Marsh III
10	54	Male	Father	71,85	Positive	DQ2	Marsh I
11	2	Male	Son	92,54	Positive	DQ2	Marsh III
12	75	Male	Father	43,4	Positive	DQ2 & DRB1	Marsh II
13	45	Female	Sister	63,61	Positive	DQ2	Marsh III
14	19	Female	Sister	85,6	Positive	DQ2	Marsh III

DQ2 = DQA1*0501, DQB1*0201; DRB1=DRB1*04; DQA1= DQA1*0501; DQB1= DQB1*0201

Among the 90 index cases, the DQ2 heterodimer was present alone in 60 (66.6%), and in 18 (20%) it was detected in association with the DRB1*04 allele. Amid the remaining celiac patients, two (2.2%) carried only the DRB1*04 allele while in five (5.5%) this allele was detected in association with one of the two alleles (DQA1*0501 or DQB1*0201) that compose the DQ2 heterodimer. Furthermore, in two patients (2.2%), a single DQA1*0501 was present and in another two (2.2%), a single DQB1*0201 was found. In one (1.1%) celiac patient, none of the predisposing HLA alleles was detected.

Table 2 shows the results of the HLA typing of 90 celiac disease patients, their 14 celiac positive relatives and 193 non-celiac relatives on the basis of disease status and kinship degree.

Table 2 - HLA status of the probands (n=90) and their first-degree relatives (n=207)

	Celiac relatives				Non-celiac relatives				Non-celiac FDR
	Probands	Parents	Siblings	Offspring	Celiac FDR	Parents	Siblings	Offspring	
DQ2	60	5	5	1	11	47	25	9	81
DRB1	2	0	0	0	0	5	4	0	9
DQ2 & DRB1	18	1	1	0	2	17	5	3	25
DQA1 & DRB1	1	0	0	0	0	3	3	1	7
DQB1 & DRB1	4	0	0	1	1	9	0	1	10
Only DQA1	2	0	0	0	0	14	7	0	21
Only DQB1	2	0	0	0	0	15	9	5	29
Absence of DQ2/DRB1	1	0	0	0	0	6	4	1	11
Total	90	6	6	2	14	116	57	20	193

DQ2 = DQA1*0501, DQB1*0201; DRB1=DRB1*04; DQA1= DQA1*0501; DQB1= DQB1*0201

Among the 193 non-celiac FDR, the heterodimer DQ2 was found in 81 (42%), and in 25 (13%), was concomitantly seen associated with the allele DRB1*04. DRB1*04 was present alone in nine (4.6%), associated with DQA1 in seven (3.6%), and with DQB1 in 10 (5.2%). Isolated DQA1 and DQB1 were respectively observed in 21 (10.9%) and 29 (15%) subjects. The absence of any CD predisposing alleles was ascertained in 11 (5.7%) subjects.

DISCUSSION

Although previous studies have focused on the prevalence of celiac disease among first-degree relatives of celiac patients ^(28, 45, 1), surveys of prevalence of CD predisposing HLA alleles in the general population and particularly in FDR of patients with CD are extremely rare in Brazil. Silva *et al.* ⁽⁴¹⁾, in a first report on the association of HLA and CD in Brazilian population concluded that susceptibility alleles observed in Brazilian patients were similar to those observed in European studies. However, most of the patients studied by these authors were of Italian ancestry; it is likely that due to the remarkably mixed racial background of the Brazilian population, the CD predisposing allele frequency in Brazil will show significant regional variations.

In this study, we defined an individual as celiac when found to be serologically positive and when the individual's biopsy result is consistent with CD. Although we recommend and obtained small bowel biopsy from all subjects disclosing predisposing alleles and positivity for one or both serologic tests, CD was not confirmed in four exclusively tTG positive patients. Our clinical experience with our serologic assays agrees with that of the literature whereby the IgAanti-tTG is more sensitive and the IgA-EMA is more specific ^(8,10,3). False positive EMA results are rare and IgA-EMA testing is nearly 100% specific ^(44, 46). False negative results can be obtained in older age groups (>35 years) and in children younger than two years ^(9, 6).

In our series, the prevalence of CD among relatives was 14/207 (6.7%) and the CD predisposing alleles, DQ2 (DQA1*0501 and DQB1*02) and/or DRB1/DQ8, alone or in association were present in all newly diagnosed celiac relatives. In contrast among the non-celiac relatives, at least one of the risk alleles was found in

182 (94.3%) and the heterodimer DQ2 was found alone or in association with the DRB1*04 allele in 106 (54.9%).

It has been demonstrated that practically all CD patients carry HLA-DQ2 and / or HLA-DQ8 molecules or one chain of the DQ2 heterodimer, coded by DQA1 * 05 (α 5 chain) or DQB1 * 02 (β 2 chain) alleles, and that CD only exceptionally occurs in the absence of at-risk DQ factors ⁽²⁵⁾. A variable risk gradient does exist, depending on which susceptible DQ alleles are present, ranging from 1:7 in subjects carrying both alleles DQ2 and DQ8 to 1:2518 in individuals who do not display any predisposing allele ⁽³⁰⁾. A significant increased risk of developing CD is also determined by the presence of one (risk of 1:35) or two copies (risk of 1:10) of the allele DQB1*02. The homozygosis of this allele is associated with an earlier onset, increased anti tTG antibody levels, presence of complications and increased severity of the disease. On the other hand, the presence of DQA1*05 allele alone is associated with extremely low odds of developing gluten intolerance (risk of 1:1842) ^(26, 2, 30).

The prevalence of 6.7% found in the present study is in agreement with the findings of several previous studies in which the prevalence of CD among FDR varied between 4.5% and 9.5% ^(17, 24, 18, 7). In a more recent study of 158 adult FDR, Biagi *et al.* ⁽⁵⁾ found a prevalence of 17.7%, confirming that CD relatives are at high risk of developing gluten intolerance, reinforcing the need for extensive screening policy in these subjects. Genetic testing before serologic screening has been proposed to reduce the number diagnostic testing of relatives that, being negative for HLA-DQ2 or DQ8, have a minimum risk of developing CD. In this way, between 10 to 20% FDR could be excluded from serologic testing ⁽²⁶⁾. However, in a recent study, Chang and Green ⁽¹³⁾ concluded that the use of HLA typing before serologic screening for CD, at the current cost of serologic assays, would not reduce screening expenses. A substantial reduction in the cost of HLA typing would be required before it could become an affordable option. In situations in which a high-throughput approach is needed, HLA-tagging single-nucleotide polymorphisms (SNPs), which has shown high specificity and sensitivity in the identification of celiac-disease-associated HLA risk haplotypes, could be used with significant cost and time savings ^(32, 27).

On the other hand, HLA typing of serologically negative relative would be justifiable to determine their future risk of developing CD. The fact that HLA positive subjects can become celiac at any time during their lifetime ^(36, 33, 7) would imply the need to periodically test those relatives who have tested negative for celiac antibodies the first time. HLA typing would preclude further work-up of these individuals and eliminate the need of future surveillance clinic visits ⁽³⁹⁾.

Nevertheless, the appropriateness and timing of further screening of asymptomatic HLA positive FDR of celiac patients is still an open question. Several follow-up studies advocate the periodic reevaluation of relatives who have been negative on initial screening ^(33, 24, 36, 7, 20) but a close analysis of these studies show that the number of subjects was low, the study designs were different, and the incidence figures were not necessarily comparable. However, it can be seen that within a follow-up from 7 to 12 years, about 2 to 5% of seronegative relatives developed the disease ⁽¹⁴⁾. Biagi *et al.* ⁽⁵⁾, in a seven-year follow-up study of 158 adult FDR, concluded that the annual incidence of CD in his study group was 0.4%. They did not perform genetic studies due to high cost considerations and also cited that almost 50% of the serologically negative FDR refused a second test. These authors concluded that, in view of the low incidence rate, further studies are necessary before deciding whether adult FDR should be followed up over time and which is the best screening strategy in terms of the cost-benefit relationship. They stressed that their data are valid for adult FDR but not for children. Similar studies are necessary among children in whom the greater life expectancy makes the need for follow-up more important.

In conclusion, we found 14 (6.7%) new cases of DC among 207 FDR of 90 biopsy-proven celiac patients. The prevalence of DC and the frequency of predisposing HLA alleles in this FDR group are similar to those previously described in other studies. HLA typing excluded 11 (5.7%) FDR from further follow-up and identified other 21 (10.9%) with a low grade risk of developing CD in the future (carriers of a single DQA1 allele).

In line with Chang *et al.* ⁽¹³⁾ we did not find HLA typing to be cost-effective, considering that it is a time consuming process and that it would be beneficial solely to a relatively small percentage of FDR. In our opinion, considering the high negative predictive value of the absence of the HLA DQ2 and DQ8 predisposing alleles, its

determination would be only justified in those cases in which the definitive diagnosis of CD is questionable, allowing the exclusion of negative HLA patients from further serologic testing.

REFERÊNCIAS

1. Almeida PL, Gandolfi L, Modelli IC, Martins RC, Almeida RC, Pratesi R. Prevalence of celiac disease among first degree relatives of Brazilian celiac patients. *Arq Gastroenterol*. 2008;45:69-72.
2. Al-Toma A, Goerres MS, Meijer JW, Peña AS, Crusius JB, Mulder CJ. Human leukocyte antigen-DQ2 homozygosity and the development of refractory celiac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2006;4:315-9.
3. Baudon J-J, Johanet C, Absalon YB, Morgant G, Cabrol S, Mougnot J-F. Diagnosing celiac disease: A comparison of Human Tissue transglutaminase antibodies with antigliadin and antiendomysium antibodies. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2004;158:584-8.
4. Bevan S, Popat S, Braegger CP, Busch A, O'Donoghue D, Falth-Magnusson K, Ferguson A, Godkin A, Hogberg L, Holmes G, Hosie KB, Howdle PD, Jenkins H, Jewell D, Johnston S, Kennedy NP, Kerr G, Kumar P, Logan RF, Love AH, Marsh M, Mulder CJ, Sjoberg K, Stenhammer L, Walker-Smith J, Marossy AM, Houlston RS. Contribution of the MHC region to the familial risk of coeliac disease. *J Med Genet*. 1999;36:687-90.
5. Biagi F, Campanella J, Bianchi PI, Zanellati G, Capriglione I, Klersy C, Corazza GR. The incidence of coeliac disease in adult first degree relatives. *Dig Liver Dis*. 2008;40:97-100.
6. Boger CP, Thomas PW, Nicholas DS, Surgenor SL, Snook JA. Determinants of endomysial antibody status in untreated coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007;19:890-5.

7. Bonamico M, Ferri M, Mariani P, Nenna R, Thanasi E, Luparia RP, Picarelli A, Magliocca FM, Mora B, Bardella MT, Verrienti A, Fiore B, Uccini S, Megiorni F, Mazzilli MC, Tiberti C. Serologic and genetic markers of celiac disease: a sequential study in the screening of first degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;42:150-4.
8. Brandt KG, Silva GAP. Seroprevalence of celiac disease at a general pediatric outpatient clinic. *Arq Gastroenterol.* 2008;45:239-242.
9. Bürgin-Wolff A, Gaze H, Hadziselimovic F, Huber H, Lentze MJ, Nusslé D, Reymond-Berthet C. Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. *Arch Dis Child.* 1991;66:941-7.
10. Carroccio A, Vitale G, Di Prima L, Chifari N, Napoli S, La Russa C, Gulotta G, Averna MR, Montalto G, Mansueto S, Notarbartolo A. Comparison of anti-transglutaminase ELISAs and an anti-endomysial antibody assay in the diagnosis of celiac disease: a prospective study. *Clin Chem.* 2002;48:1546-50.
11. Catassi C, Cobellis G. Coeliac disease epidemiology is alive and kicking, especially in the developing world. *Dig Liver Dis.* 2007;39:908-10.
12. Catassi C, Kryszak D, Louis-Jacques O, Duerksen DR, Hill I, Crowe SE *et al.* Detection of celiac disease in primary care: A multicenter case finding study in North America. *Am J gastroenterol* 2007;102:1454-60.
13. Chang M, Green PHR. Genetic Testing Before Serologic Screening in Relatives of Patients With Celiac Disease as a Cost Containment Method. 1: *J Clin Gastroenterol.* 2009;43:43-50.
14. Collin P, Kaukinen K. Serologic screening for coeliac disease in risk groups: is once in the lifetime enough? *Dig Liver Dis.* 2008;40:101-3.
15. Crovella S, Brandão L, Guimarães R, Crovella S, Ventura A. Speeding up coeliac disease diagnosis in developing countries. *Dig Liver Dis.* 2007;39:900-2.
16. Dube C, Rostom A, Sy R, Cranney A, Saloojee N, Garrity C *et al.* The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology* 2005;128:S57-67.

17. Farré C, Humbert P, Vilar P, Varea V, Aldeguer X, Carnicer J, Carballo M, Gassull MA. Serological markers and HLA-DQ2 haplotype among first-degree relatives of celiac patients. Catalanian Coeliac Disease Study Group. *Dig Dis Sci.* 1999;44:2344-9.
18. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, Elitsur Y, Green PH, Guandalini S, Hill ID, Pietzak M, Ventura A, Thorpe M, Kryszak D, Fornaroli F, Wasserman SS, Murray JA, Horvath K. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med.* 2003;163:286-92.
19. Gandolfi L, Pratesi R, Cordoba JC, Tauil PL, Gasparin M, Catassi C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:689-92.
20. Goldberg D, Kryszak D, Fasano A, Green PH. Screening for celiac disease in family members: is follow-up testing necessary? *Dig Dis Sci.* 2007;52:1082-6.
21. Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M *et al.* The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut* 2002; 50: 624-8.
22. Hadithi M, von Blomberg BM, Crusius JB, Bloemena E, Kostense PJ, Meijer JW, Mulder CJ, Stehouwer CD, Peña AS. Accuracy of serologic tests and HLA-DQ typing for diagnosing celiac disease. *Ann Intern Med.* 2007;147:294-302.
23. Hill ID, Dirks MH, Liptak GS, Colletti RB, Fasano A, Guandalini S, Hoffenberg EJ, Horvath K, Murray JA, Pivor M, Seidman EG; North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005;40:1-19.
24. Högberg L, Fälth-Magnusson K, Grodzinsky E, Stenhammar L. Familial prevalence of coeliac disease: a twenty-year follow-up study. *Scand J Gastroenterol.* 2003;38:61-5.
25. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, Ciclitira PJ, Sollid LM, Partanen J. HLA types in celiac disease patients not carrying the

- DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: Results from the European Genetics Cluster on Celiac disease. *Hum Immunol.* 2003;64:469-77.
26. Karinen H, Kärkkäinen P, Pihlajamäki J, Janatuinen E, Heikkinen M, Julkunen R, Kosma VM, Naukkarinen A, Laakso M. HLA genotyping is useful in the evaluation of the risk for coeliac disease in the 1st-degree relatives of patients with coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.* 2006;41:1299-304.
27. Koskinen L, Romanos J, Kaukinen K, Mustalahti K, Korponay-Szabo I, Barisani D, Bardella MT, Ziberna F, Vatta S, Széles G, Pocsai Z, Karell K, Haimila K, Adány R, Not T, Ventura A, Mäki M, Partanen J, Wijmenga C, Saavalainen P. Cost-effective HLA typing with tagging SNPs predicts celiac disease risk haplotypes in the Finnish, Hungarian, and Italian populations. *Immunogenetics.* 2009;61:247-56.
28. Kotze LMS, Utiyama SRR, Nisihara RM, Zeni MPB, Sena MG, Amarante HMS. Antiendomysium antibodies in Brazilian patients with celiac disease and their first degree relatives. *Arq Gastroenterol.* 2001;38:94-103.
29. Marsh MN. Gluten, Major Histocompatibility Complex, and the small intestine. *Gastroenterology.* 1992;102:330-54.
30. Megiorni F, Mora B, Bonamico M, Barbato M, Nenna R, Maiella G, Lulli P, Mazzilli MC. HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Hum Immunol.* 2009;70:55-9.
31. Melo SB, Fernandes MI, Peres LC, Troncon LE, Galvão LC. Prevalence and demographic characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. *Dig Dis Sci.* 2006;51:1020-5.
32. Monsuur AJ, de Bakker PI, Zhernakova A, Pinto D, Verduijn W, Romanos J, Auricchio R, Lopez A, van Heel DA, Crusius JB, Wijmenga C. Effective detection of human leukocyte antigen risk alleles in celiac disease using tag single nucleotide polymorphisms. *PLoS One.* 2008;3:e2270.
33. Niveloni S, Pedreira S, Sugai E, Vasquez H, Smecuol E, Fiorini A, Cabanne A, Dezi R, Valero J, Kogan Z, Maurino E, Bai JC. The natural history of gluten sensitivity: report of two new celiac disease patients resulting from a long-term

- follow-up of non-atrophic, first- degree relatives. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:463-8.
- 34.Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA, Cortez AJ, Carvalho FO, Bordin JO, de Camargo Soares MA, da Silva Patrício FR, Kawakami E, de Moraes MB, Fagundes-Neto U. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2007;19:43-9.
- 35.Pereira MA, Ortiz-Agostinho CL, Nishitokukado I, Sato MN, Damião AO, Alencar ML, Abrantes-Lemos CP, Caçado EL, de Brito T, Ioshii SO, Valarini SB, Sipahi AM.Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. *World J Gastroenterol.* 2006; 12:6546-50.
- 36.Pittschieler K, Gentili L, Niederhofer H. Onset of coeliac disease: a prospective longitudinal study. *Acta Paediatr.* 2003;92:1149-52.
- 37.Polvi A, Arranz E, Fernandez-Arquero M, Collin P, Mäki M, Sanz A, Calvo C, Maluenda C, Westman P, de la Concha EG, Partanen J. HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. *Hum Immunol.* 1998;59: 169-75.
- 38.Pratesi R, Gandolfi L, Garcia SG, Modelli IC, Lopes de Almeida P, Bocca AL, Catassi C. Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population. *Scand J Gastroenterol.* 2003;38:747-50.
- 39.Rubio-Tapia A, Van Dyke CT, Lahr BD, Zinsmeister AR, El-Youssef M, Moore SB, Bowman M, Burgart LJ, Melton LJ 3rd, Murray JA. Predictors of family risk for celiac disease: a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6:983-7.
- 40.Sacchetti L, Sarrantonio C, Pastore L, Carlino V, Calcagno G, Ferrajolo A, Salvatore F. Rapid identification of HLA DQA1*0501, DQB1*0201, and DRB1*04 alleles in celiac disease by PCR-based methodology. *Clin Chem.* 1997;43:2204-6.
- 41.Silva EMBT, Fernandes MIM, Galvão LV, Sawamura R, Donadi AD. Human leucocyte antigen class II alleles in White Brazilian patients with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;31:391-4.

- 42.Sollid LM, Thorsby E. HLA susceptibility genes in celiac disease: Genetic mapping and role in pathogenesis. *Gastroenterology*. 1993;105:910-22.
- 43.Trevisol C, Brandt KG, Pontes Silva GA, Crovella S, Ventura A.High prevalence of unrecognized celiac disease in an unselected hospital population in North-Eastern Brazil (Recife-Pernambuco). *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;39:214-5.
- 44.Unsworth DJ. ACP Broadsheet No 149: September 1996. Serological diagnosis of gluten sensitive enteropathy. *Clin Pathol*. 1996;49:704-11.
- 45.Utiyama SRR, Nass FR, Kotze LMS, Nisihara RM, Ambrosio AR, Messias-Reason IT. Serological screening of relatives of celiac disease patients: antiendomysium antibodies, anti-tissue transglutaminase or both? *Arq. Gastroenterol*. 2007;44:156-61.
- 46.Volta U, Molinaro N, Fusconi M, Cassani F, Bianchi FB. IgA antiendomysial antibody test. A step forward in celiac disease screening. *Dig Dis Sci*. 1991;36:752-6.
- 47.Wolters, VM, Wijmenga, C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am J gastroenterol*. 2008;103:190-95.

APÊNDICE 2

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UnB

Departamento de Pediatria - Serviço de Gastroenterologia Pediátrica

Projeto: Rastreamento sorológico e tipagem genética em pacientes com doença celíaca e em seus parentes de primeiro grau.

Pesquisador: Rita de Cássia Azevedo Martins (61) 3272-1684

Médico Responsável: Prof. Riccardo Pratesi (61) 3307-2134

Termo de consentimento livre e esclarecido:

Dados de identificação do sujeito da pesquisa:

Nome do paciente:.....

Data de nascimento:...../...../..... Sexo: M F

Endereço:.....N^o:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....

Telefone de contato: (.....).....

Nome do responsável:.....

Fui informado que a doença celíaca é uma doença intestinal, que já nascemos com ela, mas poderemos desenvolver ou não, dependendo da nossa alimentação com trigo, aveia, cevada e outros cereais, que tem uma proteína chamada glúten. Entendi que quando comemos pão, biscoito, bolo, massas e outros alimentos que contém glúten, podemos ter sintomas como: diarreia, fezes volumosas, perda peso e apetite, vômitos, barriga distendida, fraqueza e irritação. Mas nem sempre esses sintomas aparecem e eu posso ter a doença sem saber e mais tarde ter uma série de problemas por causa disso.

O pesquisador me explicou que como a doença tem ligação com a genética, se alguém na minha família tem, eu posso vir a ter. Por isso fui convidado a

participar de uma pesquisa que procura três genes que quase todos os celíacos têm. Se eu tiver esses genes, eu tenho chance de desenvolver a doença celíaca, mas não é certeza porque muitas pessoas têm esses genes e não são celíacos. Mas como meu parente tem a doença e os pesquisadores dizem que muitos parentes de celíacos também são celíacos, o médico irá me acompanhar para ver se eu posso ficar doente.

Fui informado que para participar da pesquisa terei que tirar sangue de uma das veias do braço, que é um procedimento comum em medicina e não tem risco para a saúde, porém, pode provocar um desconforto passageiro.

Foi garantido a mim pelos pesquisadores, que os testes realizados são confiáveis e realizados por profissionais com ampla experiência. Eu não pagarei nada pelo exame e serei informado do seu resultado. Além disso, o resultado do meu teste será mantido em privacidade e meu nome não será identificado em nenhum relatório ou publicação.

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

Dessa maneira, depois de ter sido devidamente informado, declaro que concordo voluntariamente em participar de pesquisa e/ou concordo que o sujeito sob minha responsabilidade participe.

Brasília,.....de200.....

Assinatura do paciente.....

Assinatura do médico responsável.....

**Comitê de Ética em pesquisa da Universidade de Brasília: (61) 3307-2520 e
3273-4069**

APÊNDICE 3**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UnB****Departamento de Pediatria - Serviço de Gastroenterologia Pediátrica****Projeto: Rastreamento sorológico e tipagem genética em pacientes com doença celíaca e em seus parentes de primeiro grau.****Responsável: Prof. Riccardo Pratesi**

Residência:

Tel.:

Tel. (recados):

Peso:

Estatura:

Apresenta ou apresentou freqüentemente um ou mais dos sintomas abaixo?

- | | |
|---|--|
| <input type="checkbox"/> Irritabilidade exagerada | <input type="checkbox"/> Dor abdominal recorrente |
| <input type="checkbox"/> Diarréias prolongadas | <input type="checkbox"/> Apatia, cansaço exagerado |
| <input type="checkbox"/> Constipação | <input type="checkbox"/> dores articulares |
| <input type="checkbox"/> Flatulência | <input type="checkbox"/> Aftas recidivantes |
| <input type="checkbox"/> Distensão abdominal | |
| <input type="checkbox"/> Outros | |

Detalhar:

Heredograma:

IgA:

IgA-EmA:

tTg:HLA:

Biopsia:

Observações:

ANEXO 1

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

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **070/06**

Título do Projeto: “Estudo da Frequência do HLA-DQ2 (DQA 0501,B1 0201) e DRB1 04 entre celíacos e parentes de celíacos no Distrito Federal, Brasil”

Pesquisadora Responsável: Rita de Cássia Azevedo Martins

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **070/06** com o título: “Estudo da Frequência do HLA-DQ2 (DQA 0501,B1 0201) e DRB1 04 entre celíacos e parentes de celíacos no Distrito Federal, Brasil”, analisado na 7ª Reunião Ordinária, realizada no dia 1º de agosto de 2006.

A pesquisadora responsável fica notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto. Este prazo já expirou um ano após a aprovação do projeto (01/08/2007 - item VII.13 da resolução 196/06 CNS). Assim, o pesquisador deverá enviar imediatamente o relatório resumido do desenvolvimento do projeto, que não enviou na data exigida.

Brasília, 14 de abril de 2010.

Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP-FS/UnB

ANEXO 2

ARQUIVOS de GASTROENTEROLOGIA

- Fundada em 1964 -

Órgão Oficial de:

INSTITUTO BRASILEIRO de ESTUDOS e PESQUISAS de GASTROENTEROLOGIA - IBEPEGE

COLÉGIO BRASILEIRO de CIRURGIA DIGESTIVA - CBCD

SOCIEDADE BRASILEIRA de MOTILIDADE DIGESTIVA - SBMD

FEDERAÇÃO BRASILEIRA de GASTROENTEROLOGIA - FBG

SOCIEDADE BRASILEIRA de HEPATOLOGIA - SBH

SOCIEDADE BRASILEIRA de ENDOSCOPIA DIGESTIVA - SOBED

São Paulo, 7 de janeiro de 2010

Prof. **RICCARDO PRATESI**
E-mail: pratesiri@gmail.com

Prezado Prof. Riccardo Pratesi,

Referente ao artigo intitulado: **Serologic screening and genetic testing among Brazilian patients with celiac disease and their first-degree relatives (Reg. 64/09 – refira-se sempre a este número)** de autoria de Rita de Cássia Azevedo Martins, Lenora Gandolfi, Inês Cristina Modelli, Rodrigo Coutinho de Almeida, Luiz Claudio Castro e Riccardo Pratesi, comunicamos que o referido foi aprovado pela Comissão Editorial dos ARQUIVOS de GASTROENTEROLOGIA e deverá ser publicado num dos próximos números desta Revista.

Renovamos os agradecimentos e nos subscrevemos,

Atenciosamente



Dr. RICARDO GUILHERME VIEBIG
- Editor Executivo -

Redação e SecretariaRua Dr. Seng, 320
01331-020 – SÃO PAULO, SP.
BRASIL

E-mail: arqgastr@hospitaligesp.com.br