

**Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTIGLIADINA EM  
CRIANÇAS CELÍACAS E NÃO CELÍACAS**

**Flávia Alice Timburibá de Medeiros Guimarães**

**Orientadora: Prof. Dra Lenora Gandolfi  
Co-orientador: Prof. Dr. Riccardo Pratesi**

Dissertação submetida ao Corpo Docente do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Brasília

Julho de 2006

PREVALÊNCIA DE ANTICORPOS ANTIGLIADINA EM  
CRIANÇAS CELÍACAS E NÃO CELÍACAS

**Flávia Alice Timburibá de Medeiros Guimarães**

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, meu pai, tio Gagliardi e Conceição pelo exemplo de amor e dedicação e pelo estímulo contínuo na realização dos meus projetos.

Ao Rodrigo, meu amado companheiro, pela cumplicidade, renúncia, tolerância e especialmente pelo apoio incondicional.

À Dra Inês Modelli, Dra Daniela Sales, Dra Ana Raquel Macedo, Dra Cristiane Bezerra e Dra Lisliê Capoulade, pela boa vontade, disponibilidade e cooperação para a realização deste trabalho.

À enfermeira Sandra Maria Ferreira, pela colaboração indispensável na coleta de sangue dos pacientes.

Aos funcionários do laboratório de Pediatria da UnB, em especial ao Caíque, pela colaboração na realização dos exames.

Aos funcionários do ambulatório de pediatria da Unb pela cooperação.

Ao César Nunes, pela análise estatística.

Ao amigo e colega Dr Márcio Nakanishi, pela ajuda na revisão dos dados.

Ao primo e amigo Carlos Eduardo Reis, pela boa vontade, paciência e pela grande ajuda prestada.

Aos pacientes e responsáveis, pela confiança.

À Dra Lenora e Dr Pratesi, pela amizade, receptividade, confiança, estímulo e oportunidade de aprendizado, não apenas científico mas sobretudo humano.

## SUMÁRIO

Lista de siglas e abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 Conceito da Doença Celíaca	05
2.2 Histórico	06
2.3 Manifestações clínicas	08
2.4 Epidemiologia	12
2.5 Etiopatogenia	16
2.6 Diagnóstico	23
3. OBJETIVOS	35
4. PACIENTES E MÉTODOS	37
5. RESULTADOS	46
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES	64
8. ANEXO	66
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1</b> – O iceberg celíaco	08
<b>Figura 2</b> – Valores de IgA nos dois grupos	51
<b>Figura 3</b> – Valores de IgG nos dois grupos	51
<b>Figura 4</b> – Curva <i>ROC</i>	52

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Freqüência de diagnósticos do grupo 1	48
<b>Tabela 2</b> – Freqüência dos resultados de IgA do grupo 1	49
<b>Tabela 3</b> - Freqüência dos resultados de IgG do grupo 1	49
<b>Tabela 4</b> - Freqüência dos resultados de IgA do grupo 2	50
<b>Tabela 5</b> - Freqüência dos resultados de IgG do grupo 2	50

**LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS**

<b>AGA</b>	anticorpo antigliadina
<b>DC</b>	doença celíaca
<b>DH</b>	dermatite herpetiforme
<b>ELISA</b>	ensaio imunoenzimático ( <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
<b>EMA</b>	anticorpo antiendomísio
<b>ESPGAN</b>	Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição ( <i>European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition</i> )
<b>FNT</b>	fator de necrose tumoral
<b>HLA</b>	antígeno leucocitário humano
<b>HUB</b>	hospital universitário de Brasília
<b>MS</b>	Ministério da Saúde
<b>tTG</b>	anticorpo antitransglutaminase
<b>UnB</b>	Universidade de Brasília

## RESUMO

**Introdução:** A dosagem de anticorpos antigliadina é, no Brasil, teste ainda hoje bastante difundido para o rastreamento e diagnóstico de casos de doença celíaca. Estes anticorpos são, no entanto, freqüentemente encontrados em indivíduos não portadores desta afecção, o que pode resultar em diagnósticos errôneos. **Objetivo:** avaliar a prevalência dos anticorpos antigliadina em grupos de crianças brasileiras celíacas e não celíacas. **Métodos:** a prevalência dos anticorpos antigliadina IgA e IgG foi determinada em dois grupos de pacientes pediátricos pelo teste imunoenzimático ELISA. O primeiro grupo foi composto por 131 crianças com variadas patologias gastrointestinais e dosagem do anticorpo antitransglutaminase negativa (grupo 1). O segundo grupo foi composto por 48 crianças celíacas com diagnóstico confirmado pelo teste sorológico antitransglutaminase e biópsia jejunal típica (grupo 2). **Resultados:** no grupo 2, os valores de IgA e IgG foram maiores que no grupo 1, havendo diferença estatisticamente significativa, com  $p=0,000$  para IgA e  $p=0,002$  para IgG. O grupo 1 apresentou IgG positiva em 36,6% dos casos e IgA positiva em 9,2% dos casos. O grupo 2 apresentou positividade do exame em 52,1% dos casos para IgG e em 47,9% dos casos para IgA. **Conclusões:** na população estudada a prevalência de positividade do anticorpo antigliadina em crianças presumivelmente não celíacas foi alta para IgG (36,6%).

## SUMMARY

**Introduction:** The determination of antigliadin antibodies has been widely used in Brazil for the screening and diagnosis of celiac disease. These antibodies are, however, frequently found in non celiac patients. **Objective:** evaluate the prevalence of antigliadin antibodies in a two groups of Brazilian children composed by celiac and non celiac children. **Methods:** serum IgA and IgG antigliadin antibodies were analyzed by the ELISA method in two groups of children. One group of 131 patients, with varied gastrointestinal complaints and negative antitransglutaminase antibody test (group 1); and another group of 48 children with celiac disease diagnosis confirmed by positivity of the antitransglutaminase antibody test and jejunal biopsy (group 2). **Results:** the IgA and IgG antigliadin antibodies of group 2 showed higher values than group 1, with statistic significance ( $p=0,000$  for IgA and  $p=0,002$  for IgG). Group 1 had 36,6% of positive IgG and 9,2% of positive IgA. On the other side, group 2 was positive for IgG in 52,1% of the patients and in 47,9% of the patients for IgA. **Conclusions:** the prevalence of positive antigliadin antibodies in non celiac children was high for IgG (36,6%), on the studied population.

## **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

A Doença Celíaca (DC) é cada vez mais diagnosticada no mundo, devido à utilização de testes sorológicos que possibilitam identificar a doença e rastrear os casos suspeitos em grupos de risco (Catassi et al., 2002).

Inicialmente, o método mais utilizado para este rastreamento foi a dosagem de anticorpos antigliadina (AGA). Atualmente, porém, sabe-se que a sensibilidade, especificidade e valor preditivo deste exame são insatisfatórios. Novos testes sorológicos como a dosagem de anticorpo antitransglutaminase (tTG) mostram-se mais acurados que a dosagem de AGA, apresentando a mesma facilidade técnica de execução (Baudon et al., 2004).

A presença de AGA pode ser encontrada em pacientes com várias doenças que não a DC e até mesmo em indivíduos saudáveis. No Brasil, encontramos apenas dois estudos sobre a prevalência deste anticorpo em pacientes não celíacos (Bahia et al., 2001; Medeiros et al., 1994).

Em nosso país, a utilização da dosagem de AGA ainda é bastante difundida e conseqüentemente, quando o exame é positivo, este achado ainda é muito valorizado, especialmente por médicos generalistas.

Pretendemos então avaliar a prevalência de AGA em uma população de crianças presumivelmente não celíacas, mas com queixas gastrointestinais diversas. A presença dos anticorpos em indivíduos não

portadores da DC poderia alertar sobre a fragilidade do exame e a necessidade da utilização de métodos sorológicos mais precisos no rastreamento dos casos suspeitos.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. CONCEITO DA DOENÇA CELÍACA**

A Doença Celíaca (DC), também chamada de enteropatia sensível ao glúten, é uma doença intestinal inflamatória crônica, imunomediada, que ocorre em indivíduos geneticamente predispostos.

É causada por uma intolerância permanente ao glúten, composto protéico presente em cereais como o trigo, a aveia, o centeio e a cevada (Green e Jabri, 2003; Hill et al., 2005). Entre os achados histopatológicos da mucosa do intestino delgado proximal destes pacientes encontram-se: atrofia vilositária parcial ou total, hiperplasia de criptas e aumento de linfócitos intraepiteliais (LIEs) (Marsh, 1992). Os pacientes portadores desta doença apresentam melhora clínica e histológica quando em dieta isenta de glúten, e recorrência das alterações clínicas e/ou histológicas com a reintrodução do alimento (Farrell e Kelly, 2002).

Atualmente a DC é reconhecida como uma patologia comum que pode ocorrer e ser diagnosticada em pacientes de qualquer idade, podendo envolver diversas especialidades em seu manejo devido ao grande leque de manifestações que a doença pode apresentar (Green e Jabri, 2003).

## 2.2. HISTÓRICO

A primeira referência sobre a DC foi feita por Arateus, um estudioso grego, no segundo século DC (Paveley, 1988).

Em 1888, 1700 anos mais tarde, o Dr Samuel Gee voltou a descrever a doença, que era chamada de “Afecção Celíaca”. Ele entendia a doença como um tipo de “indigestão crônica” e foi o primeiro a sugerir que orientações dietéticas fariam parte do tratamento. Reconhecia que a doença poderia acometer todas as idades, mas relacionava-a principalmente à faixa etária pediátrica, especialmente crianças entre um e cinco anos de idade (Paveley, 1988).

Em 1950, o pediatra alemão Dicke demonstrou que a doença tinha relação com a ingestão de trigo. Ele notou melhora da doença durante a Segunda Guerra Mundial, época em que havia falta de trigo, e aumento dos casos com o fim da guerra, quando os estoques do alimento voltaram ao normal. Também foi relatado nesta época que a gliadina seria a fração tóxica do glúten (Auricchio e Troncone, 1996).

Em 1955, Royer et al, na Argentina, e Margot Shiner, na Inglaterra, inventaram os “tubos duodenais” de biópsia. Em 1957, foi introduzida no Brasil a técnica de biópsia *peroral* no serviço de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas de São Paulo (Campos, 1970).

As anormalidades da mucosa intestinal, em adultos e crianças, foram demonstradas por Rubin et al, em 1962. Em 1969, a Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição (ESPGAN) estabeleceu os critérios

diagnósticos da DC, que se baseavam na realização de 3 biópsias intestinais (Meuwisse, 1970).

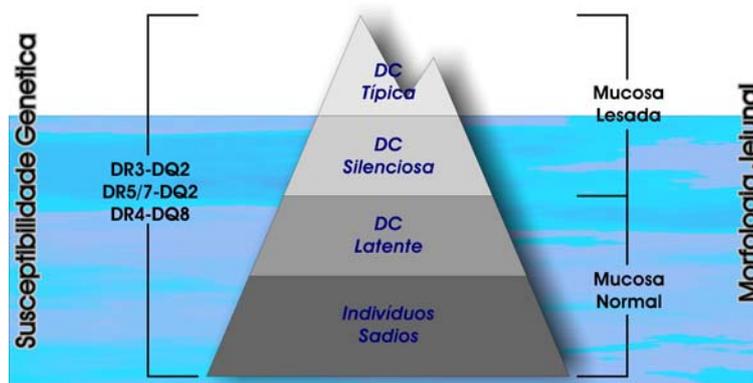
Entre as décadas de 70 e 80, houve grande avanço das técnicas sorológicas utilizadas para auxiliar o diagnóstico da DC. Com isso, as biópsias passaram a ser indicadas de forma mais precisa, evitando muitos procedimentos desnecessários. Além disso, os marcadores sorológicos passaram a evidenciar o diagnóstico naqueles pacientes oligosintomáticos ou até mesmo assintomáticos, através de rastreamentos populacionais de grupos considerados de risco para a DC (Unsworth, 1996).

### 2.3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A DC pode manifestar-se através de ampla variedade de sinais e sintomas, o que torna seu diagnóstico muitas vezes difícil. Em muitos casos, o diagnóstico não é suscitado clinicamente, já que a doença pode ocorrer em indivíduos assintomáticos ou com sintomas frustrados e não relacionados ao trato gastrointestinal.

Mäki e Collin (1997) compararam as formas de apresentação da DC a um iceberg. No topo do iceberg, em minoria, estão os casos mais evidentes, com sintomatologia aparente. No patamar intermediário, temos a chamada DC silenciosa, onde se encontram os casos com alterações de mucosa intestinal características da DC, porém em indivíduos aparentemente saudáveis. Por último, no patamar inferior, temos a forma chamada potencial ou latente. Esta é verificada em pessoas com marcadores sorológicos positivos (anticorpo anti-EMA e/ou tTG) e típico HLA predisponente para DC (DQ2 ou DQ8) com mucosa intestinal normal ou com mínima anormalidade (aumento dos linfócitos intraepiteliais), mesmo na vigência de dieta com glúten (Catassi et al., 2002).

FIGURA 1. O iceberg celíaco.



Fonte: Mäki M e Collin P. Coeliac disease. Lancet 1997; 349

Os sintomas apresentados pelos pacientes celíacos podem ser considerados típicos ou atípicos e envolver ou não o trato gastrointestinal. Existe uma correlação entre a idade de início da doença e o tipo de manifestação clínica apresentada (Guandalini e Gupta, 2002).

Em lactentes, predominam os sintomas gastrointestinais; em crianças maiores também podemos ter sintomas gastrointestinais mais leves, além de anemia, atraso puberal ou baixa estatura. Em adolescentes e adultos jovens a anemia é uma forma comum de apresentação. Em adultos e idosos voltam a predominar os sintomas gastrointestinais (Guandalini e Gupta, 2002).

A forma clássica da DC consiste de sintomas gastrointestinais que iniciam precocemente, entre 6 e 24 meses de idade, semanas ou meses após a introdução do glúten na dieta. Lactentes e crianças jovens apresentam tipicamente diarreia crônica (com fezes gordurosas, volumosas e fétidas), anorexia, distensão abdominal, dor abdominal, baixo ganho de peso ou perda de peso, hipotrofia muscular, vômitos, palidez e edema. Constipação pode acontecer em alguns casos. Desnutrição severa e até caquexia podem ocorrer se o diagnóstico for retardado. Alterações de comportamento como irritabilidade e depressão também são verificadas (Farrell e Kelly 2002; Hill et al., 2005).

Existe uma manifestação rara da doença, chamada crise celíaca, que ocorre em pacientes gravemente doentes. Caracteriza-se por diarreia aquosa e explosiva, expressiva distensão abdominal, desidratação, hipotensão, letargia, hipoproteïnemia, edema e distúrbios eletrolíticos.

Ocorre principalmente em crianças menores de 2 anos e ocasionalmente em adultos (Hill et al., 2005; Chand e Mihas, 2006).

A forma atípica da DC caracteriza-se pelo predomínio de manifestações extra-intestinais. Algumas manifestações encontradas são: anemia (por deficiência de ferro e folato); aumento de transaminases; hipoprotrombinemia por deficiência de vitamina K; alterações do esmalte dentário; baixa estatura isolada; atraso puberal; infertilidade; abortos e estomatites recorrentes; osteoporose; manifestações neurológicas (epilepsia, ataxia, neuropatia periférica) e artrites (Catassi et al., 2002; Green, 2003).

A DC também pode estar associada a outras doenças e ser descoberta através do rastreamento de grupos considerados de risco para apresentar DC como os diabéticos tipo I, pacientes com síndrome de Down, deficiência de IgA, tireoidite auto-imune e doença hepática crônica, como a cirrose biliar primária (Green, 2003). A dermatite herpetiforme (DH), especialmente, é doença fortemente relacionada à DC. Estudos têm mostrado que mais de 90% dos pacientes com DH apresentam enteropatia do intestino delgado indistinguível da DC. Estes pacientes também apresentam melhora histológica e clínica com a dieta sem glúten (Shamir, 2003).

Doenças malignas são mais freqüentes em pacientes celíacos, incluindo adenocarcinoma de intestino delgado, carcinoma de esôfago, de orofaringe e linfoma não-Hodgkin. Entre as doenças citadas, o linfoma não-Hodgkin é o que mais se associa à DC. No entanto, já foi demonstrado que a

aderência à dieta sem glúten reduz o risco de linfoma e de outras doenças malignas (Holmes et al., 1989).

## 2.4. EPIDEMIOLOGIA

A DC era considerada uma doença rara, que ocorria predominantemente em indivíduos de origem europeia e se desenvolvia nos primeiros anos de vida. Atualmente, diversos estudos demonstram que a DC é considerada uma das doenças crônicas mais comuns, que pode afetar indivíduos de quase todas as partes do mundo e ser diagnosticada em qualquer idade. É uma doença presente não apenas em países desenvolvidos, mas tem aumentado em países em desenvolvimento, como o norte da África e Índia (Catassi, 2005).

Com o aparecimento de métodos sorológicos mais sensíveis e específicos e com estudos de rastreamento populacional, foi evidenciada uma frequência inesperada de casos clinicamente atípicos, além de casos silenciosos de DC (Catassi, 2005).

Na década de 50, estudos populacionais mostravam que a incidência cumulativa de DC na população geral era de 1:4000 na Escócia a apenas 1:8000 na Inglaterra (Davidson e Fountain, 1950, citado por Fasano e Catassi, 2001). O diagnóstico naquela época era baseado apenas nos sintomas típicos da doença. Com o advento de testes mais específicos para má-absorção e da biópsia *peroral*, na década de 70 incidências de 1: 450 a 500 foram relatadas em estudos na Irlanda e Suíça (Mylotte et al., 1973; Van Stirum et al., 1972, citado por Fasano, 2000).

Acredita-se que atualmente a prevalência da DC na população geral mundial seja de 1 em cada 100 a 300 indivíduos (Fasano, 2000). Em

crianças, estima-se que a prevalência atual na população geral entre 2,5 a 15 anos, baseada em estudos na Europa e nos Estados Unidos, seja da ordem de 1:80 a 1:300 (Hill et al., 2005).

A DC é encontrada em vários países e continentes. No entanto, as prevalências variam amplamente devido a diversos fatores como: número limitado de estudos científicos em alguns países; população alvo estudada (pacientes sintomáticos ou não; envolvendo ou não grupos de risco); diferenças nos valores limiares dos testes sorológicos; diferenças ambientais como quantidade e idade de início do glúten na dieta, entre outros fatores ainda não esclarecidos (Fasano e Catassi, 2001).

Na Europa, a freqüência de DC na população geral é alta, em sua maioria variando de 0,4% a 0,75% (Catassi, 2005). Há relatos de prevalências de cerca de 1% em alguns locais como a Finlândia, onde foi encontrado 1 caso para 99 crianças, num estudo que avaliou 3654 escolares de 7 a 16 anos (Mäki et al., 2003). Na Sardenha a prevalência também foi cerca de 1%, com 1 caso de DC para cada 94 crianças, entre 1607 escolares de 6 a 14 anos avaliados (Meloni et al., 1999).

Nos Estados Unidos, estudos epidemiológicos recentes mostraram que a DC neste país é tão freqüente quanto na Europa, tanto na população geral (Fasano et al., 2003), quanto em grupos de risco (Hill et al., 2000b).

Na América também há estudos de prevalência da DC. Na Argentina um estudo com 2000 adultos evidenciou 1 caso de DC para cada 167 pessoas avaliadas (Gómez et al., 2001).

No Oriente Médio a DC já foi relatada, com prevalências da doença comparáveis às encontradas na Europa. Na Ásia (Índia) também há relatos de DC em adultos e crianças e na Oceania (Austrália) foi detectado 1 caso para 251 adultos de uma população rural (Catassi, 2005).

A maior prevalência mundial de DC na população geral encontra-se em uma comunidade do deserto do Saara, onde se evidenciou 5,6% de casos de DC em 989 pessoas avaliadas (Catassi et al., 1999).

Os estudos de rastreamento foram capazes de demonstrar que muitos casos não eram diagnosticados, porque a doença era assintomática ou com sintomas atípicos e discretos. Um estudo com 3351 estudantes assintomáticos entre 11 e 15 anos, na Itália, encontrou que a prevalência de DC era de 1:304 (Catassi et al., 1994). Outro estudo italiano que avaliou 17.201 estudantes saudáveis entre 6 e 15 anos detectou uma prevalência de DC de 1:210 (Catassi, 1996). Na Hungria, um rastreamento sorológico de 427 crianças saudáveis entre 3 e 6 anos encontrou uma prevalência de 1:85 (Korponay-Szabó et al., 1999). Nos EUA, um estudo recente que rastreou mais de 12.000 pessoas saudáveis encontrou uma prevalência de 1:163 (Fasano, 2003). No Brasil, foi publicado um estudo que avaliou 4405 pacientes (incluindo adultos e crianças) atendidos no Hospital Universitário de Brasília (HUB). Foram avaliadas 2034 crianças e adolescentes entre 1 e 14 anos, entre os quais 10 pacientes apresentaram EMA positivo e biópsia com padrão celíaco, resultando numa prevalência de 1:184 (Pratesi et al., 2003).

Entre doadores de sangue, a prevalência de DC também surpreende. Na Itália, um estudo com 4000 doadores, em Trieste, detectou 1 caso de DC para 400 indivíduos avaliados (Trevisiol et al., 1999). No Brasil também há dados de prevalência da DC em doadores de sangue. Gandolfi et al. (2000), avaliaram 2045 doadores sadios entre 18 e 61 anos, encontrando uma prevalência de 1:681 casos de DC.

A forte influência genética na susceptibilidade da DC é sugerida pela ocorrência de múltiplos casos em uma mesma família. Em um estudo multicêntrico a prevalência de DC encontrada em parentes de primeiro grau de pacientes celíacos foi de 8,7%. Além disso, até 75% de gêmeos monozigóticos apresentam concordância da DC (Troncone et al., 1996). A predisposição genética também pode ser evidenciada pela baixa prevalência da doença em determinadas raças como em pessoas da raça negra, mesmo em países com alta prevalência de DC. Japoneses e chineses também têm baixa prevalência de DC (Walker-Smith, 2000).

## 2.5. ETIOPATOGENIA

Fatores genéticos, ambientais e imunológicos são importantes na patogênese da DC (Kagnoff, 2005). Alguns aspectos desses fatores já estão claramente definidos, enquanto outros ainda vêm sendo estudados para avaliar seu verdadeiro papel.

### 2.5.1. FATORES GENÉTICOS

Os fatores genéticos desempenham um papel chave na DC. Isto foi sugerido inicialmente através de observações clínicas que mostravam alta concordância da doença em gêmeos monozigóticos (70% a 75%) e também alta prevalência da DC (8,7% a 15%), em familiares de primeiro grau de pacientes celíacos (Troncone et al., 1996; Kagnoff, 2005).

Vários genes parecem estar implicados na patogênese da DC, porém os genes do HLA (Antígeno Leucocitário Humano) estão fortemente relacionados à doença. O HLA está localizado no braço curto do cromossomo 6 e é dividido em 3 subregiões: I, II e III. O HLA tipo II codifica os antígenos DR, DQ e DP (Partanen, 1996).

Na DC, a associação primária parece ser com DQ. Cerca de 90% a 95% dos pacientes celíacos apresentam os alelos DQA1\*0501 (que codifica a cadeia alfa) e DQB1\*02 (que codifica a cadeia beta). Juntos estes alelos formam o heterodímero DQ2 (Kagnoff, 2005). O risco relativo de apresentar DC em um indivíduo que possui DQ2 é de 40 a 50 vezes maior que na

população geral, porém o risco absoluto é de apenas 1% (Walker-Smith, 2000).

Pacientes celíacos DQ2 negativos constituem cerca de 2% a 10% da população de celíacos. Quase todos esses pacientes possuem o haplótipo DR4DQ8 (DQA1\*03 + DQB1\*0302) ou parte do heterodímero DQ2 (DQA1\*0501 ou DQB1\*02). A razão mais plausível da associação entre a DC e a presença de DQ2 ou DQ8 é a necessidade destas moléculas na apresentação dos peptídeos de gliadina aos linfócitos. Menos de 1% dos pacientes com DC não apresentam o HLA DQ2 ou DQ8 (James, 2005).

No entanto, a presença de alelos específicos do *locus* HLA-DQ parece necessária, mas insuficiente para a expressão fenotípica da DC (Green, 2003). A presença dos alelos DQ2 ou DQ8 é relativamente comum em populações brancas, em indivíduos que não expressam a doença. Na população europeia a frequência de DQ2 é alta (15% a 30%), mas somente uma minoria (menos de 1%) de indivíduos DQ2 positivos desenvolverão a doença (Catassi et al., 2002; James, 2005).

Genes não relacionados ao HLA, encontrados nas regiões 2q33, 5q31-33, 11q e 19p13 também parecem estar relacionados à susceptibilidade para apresentar DC (Sollid, 2005; Robins e Howdle, 2005; Green e Jabri, 2003; Jones, 2006).

## 2.5.2. FATORES AMBIENTAIS

Os cereais tóxicos para o paciente com DC são trigo, centeio e cevada. Os grãos da cevada e do centeio são taxonomicamente próximos do trigo. O trigo contém classes heterogêneas de proteínas, classificadas de acordo com sua forma de extração e solubilidade (Troncone et al., 1999). Assim temos a albumina e a globulina, solúveis em água, e o glúten, insolúvel em água. O glúten por sua vez contém prolaminas e gluteninas. As prolaminas correspondem à gliadina no trigo, à secalina no centeio e à hordeína na cevada (Unsworth, 1996). A toxicidade do trigo deve-se à gliadina, que pode ser classificada segundo sua mobilidade eletroforética em alfa, beta, gama e ômega, sendo o componente alfa o principal ativador da DC (Troncone et al., 1999).

A alfa gliadina origina um peptídeo conhecido como 33-mer que é resistente às enzimas intestinais da borda em escova e é um substrato muito específico para deaminação pela transglutaminase e altamente estimulatório para as células T CD4<sup>+</sup> (Mowat, 2003). Este peptídeo é capaz de estimular três diferentes clones de células T restritas ao HLA-DQ2, derivadas de biópsias intestinais de pacientes celíacos. Cada um destes clones seria capaz de reconhecer um epítipo distinto encontrado no 33-mer (PFPQPQLPY, PQPQLPYPQ e PYPQPQLPY). Assim, a combinação de estabilidade metabólica e multivalência do 33-mer o tornariam excepcionalmente tóxico para a mucosa do intestino delgado (Shan et al., 2002).

Homólogos do peptídeo 33-mer foram identificados apenas no trigo, centeio e cevada, todos com capacidade de provocar a DC. No entanto, arroz, aveia e maisena não contêm a região homóloga, não sendo tóxicos para pacientes com DC. Assim, a geração do 33-mer parece ser a base para a associação entre glúten, resposta imune, transglutaminase e DC (Mowat, 2003).

### 2.5.3 FATORES IMUNOLÓGICOS

Mecanismos imunológicos envolvendo a imunidade inata e a imunidade adquirida (celular e humoral) estão presentes na DC.

Em condições fisiológicas o epitélio intestinal age como uma barreira contra a passagem de macromoléculas como o glúten. Nos pacientes celíacos existe um aumento da permeabilidade intestinal às macromoléculas, devido à perda da junção intercelular do epitélio intestinal. Assim, peptídeos de gliadina não totalmente degradados pelas peptidases intraluminais podem penetrar através do epitélio (Guandalini e Gupta, 2002). Este aumento de permeabilidade parece estar relacionado, ao menos em parte, a um peptídeo intestinal chamado zonulina, que está envolvido na regulação das junções intercelulares (Catassi et al., 2002). Foi demonstrado que esta proteína encontra-se aumentada na submucosa intestinal de pacientes celíacos em relação aos controles (Fasano et al., 2000).

Alterações da mucosa intestinal que precedem o envolvimento das células T foram observadas logo após estímulo com gliadina. Após uma

hora, a biópsia intestinal de pacientes celíacos mostrava aumento da expressão de HLA-DR tanto nos enterócitos quanto nos macrófagos da lâmina própria. Depois de 2 horas ocorreu aumento da expressão da molécula de adesão intercelular (ICAM-1), necessária para a aderência das células T ao sítio de inflamação. Após 4 horas estas células começaram a migrar para camadas mais superficiais da mucosa e entre 4 a 24 horas linfócitos T CD4+ e macrófagos migravam para o compartimento subepitelial. A expressão do HLA-DQ se tornou aumentada em células mononucleares e finalmente as células T CD8+ invadiram a camada epitelial (linfócitos intraepiteliais) (Guandalini e Gupta, 2002).

Com a passagem dos peptídeos de glúten pela barreira epitelial eles atingem a lâmina própria onde encontram a enzima transglutaminase (tTG) e as células apresentadoras de antígeno que expressam DQ2 ou DQ8. Estas células apresentarão o antígeno (gliadina) para populações específicas de linfócitos T CD4+ que expressam o receptor alfa/beta. Clones de células T CD4+ específicas para o reconhecimento da gliadina têm sido encontradas em biópsias intestinais de pacientes com DC, mas não em controles (Guandalini e Gupta, 2002).

A tTG encontra-se aumentada na mucosa de pacientes celíacos. Ela promove a deaminação dos peptídeos de gliadina, originando resíduos de ácido glutâmico, que contém carga negativa. Isto promove maior afinidade na ligação entre os peptídeos gerados e o HLA DQ2 ou DQ8, que possuem sítios de ligação carregados positivamente (Green e Jabri, 2003).

A deaminação dos peptídeos também tem um papel muito importante para que eles sejam posteriormente reconhecidos pelas células T específicas. A razão para isto não está clara, mas uma possibilidade é que as células T reativas aos peptídeos de glúten “nativos” tenham sido deletadas ou tenham se tornado anérgicas como parte do mecanismo de tolerância oral. Assim, o processo de deaminação seria necessário para a quebra desta tolerância oral (Sollid, 2002). No entanto, esta hipótese é controversa. Vader et al. (2002) demonstraram que peptídeos nativos, não deaminados, também podem ser imunogênicos em pacientes celíacos.

A tTG também é importante na diferenciação e maturação das células intestinais. As células intestinais dependem da presença de fator de crescimento TGF- $\beta$ , que para tornar-se ativo necessita de plasmina ou tTG. Como na DC ocorre a formação de anticorpos anti-tTG, fica prejudicada a diferenciação e maturação necessárias para manter a integridade das vilosidades (Hill et al., 2000a).

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> estimulados passam então a produzir inúmeras citocinas que são responsáveis pela inflamação e atrofia vilositária (Green e Jabri, 2003). Ocorre um aumento da produção de IL-18 e IFN- $\alpha$  que promovem a diferenciação celular para o perfil chamado de Th1. Com isto ocorre produção de IFN- $\gamma$ , a citocina predominante na estimulação das células T glúten específicas (Sollid, 2002). Outra importante citocina produzida é o fator de necrose tumoral (FNT). O FNT estimula os fibroblastos a secretar metaloproteinases que promovem lesão da mucosa através da destruição do tecido conectivo. Os fibroblastos ativados da lâmina

própria são a principal fonte de fator de crescimento de ceratinócitos, um importante mitógeno epitelial, o que está relacionado à hiperplasia de criptas observada na DC (Schuppan, 2000).

As alterações intestinais mediadas pelas células T CD4+ glúten específicas não explicam, no entanto, a infiltração intraepitelial pelos linfócitos CD8+. Assim, há autores que apontam a IL-15 como o pivô na indução da expansão e sobrevivência de linfócitos intraepiteliais anormais, que por sua vez desencadeariam a secreção de IFN- $\gamma$  que tem efeito citotóxico contra as células epiteliais intestinais (Mention et al., 2003).

Os mesmos autores demonstraram que a IL-15 encontra-se fortemente expressada por muitas células mononucleares da lâmina própria em indivíduos com DC ativa, enquanto estaria quase ausente em controles normais. A persistência da expressão aumentada de IL-15 nos pacientes com doença refratária explicaria a manutenção das lesões epiteliais nestes pacientes mesmo durante a dieta sem glúten. Nos pacientes com DC não refratária ocorre diminuição da IL-15 durante a dieta (Mention et al., 2003).

## 2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da DC envolve a avaliação de dados clínicos, histopatológicos, sorológicos e, algumas vezes, até estudos genéticos são necessários para a sua definição.

Os critérios de diagnóstico atuais foram definidos pela primeira vez em 1970, tendo sido revisados e atualizados em 1990 pela ESPGAN. São baseados na sorologia positiva e uma biópsia do intestino delgado mostrando dano da mucosa característico, seguidos de melhora clínica e normalização dos testes sorológicos após retirada do glúten da dieta (Walker-Smith et al., 1990). Tais critérios são seguidos em todo o mundo.

### 2.6.1 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

A biópsia intestinal sempre foi considerada o “padrão ouro” para o diagnóstico da DC, através dos achados clássicos de atrofia vilositária e hiperplasia de criptas, características da DC. No entanto, devemos enfatizar que tais achados também podem ser encontrados em outras doenças que acometem o intestino delgado como a alergia à proteína do leite de vaca ou de soja, parasitoses intestinais como a giardíase, desnutrição, gastroenteropatia eosinofílica, enteropatia auto-imune como a doença de Crohn, linfoma intestinal e imunodeficiências (Macdonald, 2002; Shamir, 2003).

Assim, reforça-se a necessidade de outros achados para a confirmação diagnóstica. Além disso, o espectro de alterações da mucosa intestinal encontrado na DC é bastante amplo. Desta maneira, em 1992 Marsh definiu uma classificação histológica que leva em consideração não apenas a característica da mucosa intestinal mas também a presença de linfócitos intraepiteliais.

A importância da linfocitose intraepitelial é demonstrada por relevantes complicações da doença como o linfoma de células T associado a enteropatia e o sprue refratário, que representam expansões de linfócitos intraepiteliais anormais. No entanto, a linfocitose intraepitelial também ocorre em outras doenças intestinais associadas à inflamação como na alergia à proteína do leite de vaca, giardíase, enteropatia auto-imune etc (Chand e Mihas, 2006).

Os linfócitos intraepiteliais apresentam dois subtipos: aqueles com receptores gama-delta e aqueles com receptores alfa-beta. Os linfócitos T de uma mucosa normal expressam cerca de 90% de receptores alfa-beta. Entretanto, a proporção de células gama-delta em pacientes celíacos está aumentada. Alguns estudos sugerem que este aumento estaria fortemente relacionado à existência de marcadores genéticos relacionados à DC (Holm et al., 1992). Assim, o aumento desses linfócitos seria uma forma de evidenciar os casos latentes de DC. Já foram relatados casos de pacientes que desenvolveram a DC, onde o único achado inicial era o aumento dos linfócitos gama-delta na biópsia (Mäki et al., 1991).

A biópsia deve ser obtida da porção distal do duodeno, sendo recomendada a retirada de pelo menos 3 fragmentos de tamanhos adequados (Shidrawi et al., 1994; Hill et al., 2005).

Segundo Marsh poderíamos dividir as alterações encontradas nas biópsias em 4 tipos:

Tipo I: epitélio das vilosidades com presença de linfócitos intraepiteliais com densidade maior que 30 para cada 100 células epiteliais (enterócitos).

Tipo II: epitélio das vilosidades com presença de linfócitos intraepiteliais com densidade maior que 30 para cada 100 enterócitos e com hiperplasia de criptas.

Tipo III: epitélio das vilosidades atrofiado e hiperplasia de criptas (mucosa achatada típica de DC), subdividindo-se em:

IIIa: atrofia vilositária parcial;

IIIb: atrofia vilositária subtotal;

IIIc: atrofia vilositária total.

Tipo IV: epitélio das vilosidades com atrofia total e perda das criptas.

## 2.6.2 TESTES SOROLÓGICOS

O surgimento dos testes sorológicos revolucionou a história da DC, uma vez que permitiu o rastreamento de grupos de risco, o diagnóstico de formas clínicas leves com sintomas não característicos, dos casos assintomáticos e o monitoramento da aderência à dieta isenta de glúten.

Assim, os testes sorológicos têm um papel relevante no manejo de pacientes com DC, contribuindo para o diagnóstico da doença. Alguns deles são utilizados desde os anos 70, como é o caso dos anticorpos anti gliadina (AGA) IgA e IgG. O anticorpo anti-endomísio (EMA) da classe IgA vem ganhando popularidade, já que vários estudos têm demonstrado sua alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da DC. Mais recentemente, foi identificada a tTG, enzima reconhecida como um auto-antígeno presente em pacientes com DC não tratada (Dieterich et al., 1997). A dosagem do anticorpo anti-tTG mostra-se bastante sensível e específica para o diagnóstico da DC.

Apesar da necessidade da biópsia intestinal para se firmar o diagnóstico da DC, os testes sorológicos têm crucial importância já que eles orientam a necessidade da biópsia e evidenciam os casos suspeitos de DC. No entanto, há que se ter cautela na interpretação de seus resultados, uma vez que a sensibilidade, a especificidade e a reprodutibilidade dos testes variam, especialmente quando nos referimos à dosagem de AGA.

### 2.6.2.1. Antigliadina

A gliadina constitui a fração tóxica do glúten, sendo encontrada no trigo. A dosagem de AGA passou a ser utilizada como método sorológico de diagnóstico da DC na década de 70 (Catassi et al., 2002).

A dosagem de AGA é feita através do método ELISA, porém a padronização do método pode variar entre os diferentes laboratórios, dificultando a comparação dos valores encontrados (Perticarari et al., 1992).

A sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos do exame, na população pediátrica, variam nos diversos estudos, tanto para IgA quanto para IgG. Para IgA a sensibilidade pode variar de 53% (Rich e Christie, 1990) a 100% (Savilahti et al., 1983) e para IgG de 54% a 100% (Savilahti et al., 1983). A especificidade também varia de 65% (Tucker et al., 1988) a 97% (Perticarari et al., 1990) para IgA e de 58% (Rich e Christie, 1990) a 98% (Bodé et al., 1993) para IgG. Valores preditivos positivos chegam a ser muito baixos, especialmente quando se trata da IgG, chegando a valores de apenas 44% (Rich e Christie, 1990).

A presença destes anticorpos tem sido demonstrada em pacientes não celíacos, em ampla gama de doenças, gastrointestinais ou não, e até mesmo em indivíduos saudáveis. Tucker et al. (1988) encontraram 44% de IgA positivo e 12% de IgG positivo em um grupo de 25 pacientes de zero a 27 anos, sem DC e com outras doenças gastrointestinais como diarreia crônica, atresia de vias biliares, cirrose, apendicite etc.

Bottaro et al. (1993) avaliaram 234 pacientes não celíacos com diversas doenças gastrointestinais como síndrome do cólon irritável, intolerância à proteína do leite de vaca, diarreia aguda, parasitose, dor abdominal recorrente, constipação intestinal crônica, refluxo gastroesofágico etc. Foi encontrado 10% de positividade para IgA e 24,7% para IgG.

O fato da presença de AGA em pacientes não celíacos poder refletir um aumento da permeabilidade intestinal a antígenos alimentares foi citada por Unsworth et al. (1981). Os autores encontraram 15% de positividade de anticorpos AGA entre 152 crianças não celíacas e com outros distúrbios gastrointestinais. Unsworth (1996) reafirma que a soropositividade do AGA e também de outros anticorpos alimentares refletem uma sensibilização não específica a antígenos alimentares, secundária à lesão da mucosa, apesar destes anticorpos serem frequentemente encontrados em pacientes com biópsia e macroscopia normais do intestino delgado.

Bonamico et al. (1997) estudaram 167 crianças com várias doenças como dor abdominal recorrente, baixa estatura, baixo peso, diarreia, constipação, alergia à proteína do leite de vaca, vômitos recorrentes e gastroenterites prévias. Em 35,9% dos pacientes avaliados foi encontrado AGA positivo (IgA e/ou IgG). Em 19,7% dos pacientes houve positividade para IgA e IgG. Estes casos foram submetidos à biópsia e em nenhum deles foi evidenciada atrofia de mucosa. Com isto, a autora sugere que a presença dos anticorpos AGA estaria relacionada a um fenômeno imunológico ligado a um aumento da permeabilidade intestinal a macromoléculas e não a um marcador de lesão intestinal.

Bahia et al. (2001), demonstraram a presença de AGA em crianças não celíacas, onde 61 pacientes com enteropatias diversas foram avaliados, sendo que 18% dos pacientes apresentaram IgG positivo e 11% tiveram IgA positivo para AGA.

A permeabilidade intestinal poderia alterar os resultados da dosagem de AGA ao favorecer o contato entre os antígenos alimentares e o sistema imunocompetente (Bonamico et al., 1997).

Por outro lado, indivíduos celíacos podem apresentar dosagem de AGA normal. Em uma população de 130 crianças celíacas avaliadas por Bottaro et al. (1995), 18,5% dos pacientes apresentaram IgA AGA normal e 13,1% tiveram IgG AGA normal. Chartrand et al. (1997), ao avaliarem 30 crianças celíacas, encontraram 20% com IgA AGA normal e 6,6% com IgA e IgG AGA normais. Mais recentemente, outro estudo com 30 crianças celíacas evidenciou 40% delas com IgA AGA normal e 6,6% com IgG AGA normal (Baudon et al., 2004).

#### 2.6.2.2. Anti-endomísio

Chorzelsky (1984) descreveu anticorpos, principalmente da classe IgA, que reagem contra o endomísio, uma proteína do tecido conectivo encontrada entre as miofibrilas da musculatura lisa do trato gastrointestinal de primatas. Este achado foi relacionado à presença da DC. Utilizando-se o esôfago de macaco como substrato antigênico no teste de imunofluorescência indireta, o antiendomísio (EMA) é considerado positivo

quando se visualiza o chamado padrão favo de mel verde brilhante (Catassi et al., 2002). O resultado é expresso de forma semi-quantitativa como positivo forte, positivo, positivo fraco e negativo. Também pode ser usado cordão umbilical como substrato antigênico para a realização do EMA (Green e Jabri, 2003).

Entre as desvantagens do EMA encontram-se a limitada disponibilidade do substrato antigênico, o alto custo, a necessidade de laboratório especializado e a dependência do examinador para a leitura do resultado da imunofluorescência (Catassi et al., 2002). No entanto, um estudo europeu realizado com o intuito de padronizar testes de rastreamento para DC, demonstrou que o resultado do EMA foi mais confiável entre os vários laboratórios do que o resultado de testes automatizados como a dosagem de AGA e do anti- tTG (Stern, 2000).

A utilização do EMA para o diagnóstico de DC ficaria prejudicada em algumas situações: no caso de pacientes com deficiência de IgA (onde teríamos que usar um método que dosasse IgG) e em crianças abaixo de dois anos, onde a acurácia do exame é menor (Hill et al., 2005; Farrell e Kelly, 2001).

A grande vantagem do EMA reside na alta especificidade do teste, que atinge níveis muito próximos de 100% em diversos estudos já realizados (Stern, 2000; Johnston, 2003; Collin et al., 2005). A sensibilidade do exame também é alta, variando de 89% a 100% em diversos estudos (Chan et al., 1994; Stern, 2000; Johnston, 2003; Collin et al., 2005). Há estudos que sugerem que a avaliação do EMA deveria ser feita em conjunto com a

dosagem de AGA para aumentar a sensibilidade e especificidade do método (Stern, 1996; Murray, 2000). Já outros estudos demonstram que a dosagem associada de AGA não aumentaria nem a sensibilidade e nem a especificidade do EMA (Chan et al., 1994; Riestra et al., 2000).

Outra vantagem do EMA é que estes anticorpos não são encontrados em outras doenças inflamatórias gastrointestinais nem em casos de diarreia inespecífica em crianças (Rossi et al., 1988). São encontrados porém em familiares assintomáticos de pacientes com DC, o que é importante nos estudos de rastreamento (Kumar et al., 1989).

Estudos comparando a positividade do EMA e achados de biópsia demonstraram forte correlação entre os resultados encontrados, a ponto de alguns autores questionarem a necessidade de biópsia (Valdimarsson et al., 1996). Trabalho realizado na Inglaterra, somente com crianças, evidenciou que todos os pacientes com DC confirmada por biópsia apresentavam EMA positivo ou fortemente positivo (Chan et al., 1994). Uma revisão sistemática da literatura evidenciou que o valor preditivo negativo do EMA situa-se entre 95% e 100% (Rostom et al., 2005).

#### 2.6.2.3. Antitransglutaminase

A transglutaminase tecidual (tTG) é uma enzima do compartimento intracelular, que ao ser secretada pelas células, forma o auto-antígeno da DC, reconhecido pelo anticorpo antiendomísio.

A dosagem de IgA anti-tTG é utilizada tanto no diagnóstico quanto no seguimento de crianças com DC (Baudon et al., 2004).

A tTG foi reconhecida pela primeira vez por Dietrich et al., em 1997, em pacientes com DC não tratada. Foi então desenvolvida a detecção quantitativa do anticorpo anti-tTG da classe IgA através do método ELISA. Inicialmente, o antígeno era extraído de fígado de porco, o que resultou em grande número de exames falso-positivos. A especificidade do teste aumentou com a utilização de tTG recombinante humana. Resultados falso-positivos ainda devem ser investigados em pacientes com doenças linfoproliferativas, disfunção hepática e doenças auto-imunes (Catassi et al., 2002).

A detecção do anticorpo anti-tTG da classe IgG também pode ser realizada, porém é um teste de baixa sensibilidade (ao redor de 40%), apesar de ter alta especificidade (cerca de 98%). Sua utilização torna-se então inapropriada como único teste de rastreamento para DC. Ele poderia ser útil em pacientes com deficiência de IgA ou em combinação com a dosagem de IgA anti-tTG (Rostom et al., 2005).

Um estudo que avaliou 70 crianças de uma clínica de Gastroenterologia pediátrica espanhola demonstrou que a sensibilidade do teste para IgA foi de 95%, enquanto a especificidade chegou a 100% (Vitoria et al., 2001). Outro estudo com 67 crianças, na Suécia, encontrou 100% de sensibilidade e 98% de especificidade do IgA anti-tTG (Hansson et al., 2000). Revisão sistemática da literatura realizada por Rostom et al. (2005),

mostrou sensibilidade e especificidade do IgA tTG de 95,7% e 99% respectivamente, em estudos com crianças.

A avaliação da IgA anti-tTG mostra-se bom método sorológico para exclusão da DC, uma vez que apresenta valores preditivos negativos altos, chegando a 98,2% (Baudon et al., 2004). O valor preditivo positivo do exame também atinge valor semelhante, chegando a 98% (Troncone et al., 1999).

As características do IgA anti-tTG acima descritas tem sido atualmente valorizadas pelo Ministério da Saúde (MS). O fluxograma para diagnóstico da DC, que está em fase de aprovação pelo MS, prevê a dosagem da IgA anti-tTG como método de rastreamento sorológico da DC. Quando o resultado é normal e o paciente não apresenta deficiência de IgA e nem outro fator de risco para DC, a doença é considerada pouco provável naquele momento e a investigação é encerrada. Se o resultado é anormal, o paciente passa a ter indicação de biópsia intestinal.

A utilização da dosagem de IgA anti-tTG no lugar do uso da dosagem de AGA IgA e IgG seguidos do EMA para o rastreamento inicial de DC foi avaliada por Gomez et al. (2002). Neste estudo, o autor avaliou 1000 pacientes entre 16 e 71 anos através do uso dos dois protocolos citados. Concluiu que a prevalência detectada através da utilização do tTG foi de 7:1000 pacientes, enquanto a prevalência da DC utilizando o AGA caiu para 5:1000 pacientes. Os dois pacientes cujo diagnóstico não tinha sido feito com a dosagem de AGA apresentavam IgG positivo, mas IgA negativo para AGA e não tinham deficiência de IgA.

Ao se realizarem estudos comparativos entre anticorpos tTG e EMA, já foi demonstrado que seus resultados são concordantes. Troncone et al. (1999) e Vitoria et al. (2001) demonstraram que a concordância entre EMA e tTG, na população avaliada, foi de 95% e 95,2% respectivamente. Outros estudos também demonstraram correlação positiva entre tTG e EMA (Hansson et al., 2000; Bonamico et al., 2001).

As vantagens do tTG em relação ao EMA são o menor custo, o resultado não depender do observador, ser quantitativo, sua técnica ser mais fácil e mais rápida; por isso em estudos de rastreamento populacional a sua utilização seria mais vantajosa (Hansson et al., 2000; Gomez et al., 2002).

### **3. OBJETIVOS**

### **3. OBJETIVOS**

O presente estudo tem como objetivo determinar a prevalência de positividade do teste antigliadina (AGA) IgA /IgG em um grupo de pacientes com queixas gastrointestinais e presumivelmente não celíacos e também em um grupo de pacientes celíacos.

## **4. PACIENTES E MÉTODOS**

## 4. PACIENTES E MÉTODOS

**4.1. Descrição da área de estudo:** a presente pesquisa foi desenvolvida em 2005, no ambulatório de Gastroenterologia pediátrica do HUB.

**4.2. Tipo de estudo:** transversal, de prevalência de positividade do teste antigliadina.

### 4.3. População alvo:

**Grupo 1** – pacientes com queixas gastrointestinais diversas como constipação, diarreia, refluxo gastroesofágico, dor abdominal recorrente, vômitos e pacientes com baixo peso para a idade, acompanhados no ambulatório de Gastroenterologia pediátrica do HUB, entre fevereiro e novembro de 2005.

**Grupo 2** – soro de pacientes com DC confirmada segundo os critérios da ESPGAN (1990), previamente diagnosticados pelo serviço de Gastroenterologia pediátrica do HUB. Os soros estavam estocados no laboratório de pediatria da UnB.

#### 4.4. Tamanho da amostra:

**Grupo 1** – foram selecionados 132 pacientes.

**Grupo 2** – 48 amostras de soro foram utilizadas.

#### 4.5. Critérios de inclusão:

**Grupo 1** – pacientes de ambos os sexos, que apresentavam os diagnósticos mencionados acima, firmados por um dos gastroenterologistas pediátricos do ambulatório do HUB, com idade entre 6 meses a 12 anos.

**Grupo 2** – pacientes celíacos, de ambos os sexos, com idade entre 1 e 12 anos, cujo soro tivesse sido colhido em vigência da dieta com glúten.

#### 4.6. Critérios de exclusão:

**Grupo 1** – pacientes que estivessem assintomáticos no período da consulta; pacientes que tivessem um familiar de primeiro grau com DC; pacientes com doenças auto-imunes como diabetes melito insulino-dependente, tireoidite auto-imune, deficiência seletiva de IgA, síndrome de Sjögren e colestase auto-imune; pacientes com doenças não auto-imunes relacionadas à DC como síndrome de Down, síndrome de Turner e anemia ferropriva refratária à ferroterapia oral.

**Grupo 2** – pacientes celíacos que estivessem em dieta sem glúten.

#### 4.7. Método:

**Grupo 1** – Antes da adesão do paciente ao protocolo, foram claramente expostos aos pais ou responsáveis os objetivos, riscos e benefícios da pesquisa. Após os esclarecimentos eram assinados formulários de consentimento para a coleta das informações e dos exames necessários. O termo de consentimento e o projeto da pesquisa foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB), com base nas Resoluções 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética da pesquisa em seres humanos. O projeto teve como número de registro 017/2005.

Todos os pacientes foram submetidos a um questionário para caracterização dos sinais e sintomas clínicos sugestivos dos distúrbios gastrointestinais (Anexo).

Após o preenchimento do questionário foi retirada uma amostra de sangue de aproximadamente 3 ml, por punção venosa. As amostras foram centrifugadas e o soro separado e armazenado em tubos de *ependorf* que foram congelados para análise posterior, realizada no laboratório de Pediatria da UnB.

Todos os soros foram submetidos à quantificação de IgA sérica total, dos anticorpos AGA IgG e IgA e do anticorpo IgA anti-tTG. Pacientes que apresentaram tTG positivo, fizeram a dosagem de EMA. Os casos positivos foram submetidos à biópsia intestinal.

**Grupo 2** – Foi realizada a dosagem de AGA (IgA e IgG), em todos os soros estocados. A dosagem de IgA sérica total havia sido realizada previamente em todos os soros avaliados. Todos os pacientes deste grupo, à época do diagnóstico, foram submetidos à dosagem de tTG.

#### 4.7.1. Imunoquantificação de IgA

Em todos os pacientes foi dosada a IgA sérica total através do método de nefelometria utilizando o nefelômetro BN 100 (Medcorp produtos hospitalares) e o *kit* de N anti-soros contra imunoglobulinas humanas da Dade Behring Marburg GmbH (EUA). Os N anti-soros são soros fluídos de origem animal e são produzidos mediante a imunização de coelhos com imunoglobulinas humanas altamente purificadas.

O princípio do método consiste na formação de imunocomplexos, numa reação imunoquímica entre as proteínas contidas no soro humano e anticorpos específicos, que dispersam a luz incidente. A intensidade da luz difusa depende da concentração da respectiva proteína na amostra. Faz-se a avaliação comparando com um padrão conhecido da concentração. As amostras séricas foram diluídas e medidas automaticamente com N diluente, código OUMT, a 1:20. Os resultados foram calculados automaticamente mediante uma função logit-log.

Consideramos deficiência de IgA valores menores que 7 mg/dl.

#### 4.7.2. Dosagem de IgA e IgG anti gliadina

Os anticorpos anti gliadina (AGA) da classe IgA e IgG foram dosados em todos os pacientes, utilizando-se a técnica de ELISA. O exame foi realizado usando-se o *kit* de enzimoimunoanálise da *BioSystems reagents and instruments* (Barcelona, Espanha).

Todos os soros foram diluídos a 1:400, usando-se o diluente de amostra. A cada micropoço da placa, revestido com o antígeno gliadina, adicionaram-se, em micropoços diferentes, 100 microlitros (mcl) de um controle positivo, do controle negativo e as amostras diluídas. As amostras foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, e após esse período de incubação, 300 mcl de tampão de lavagem diluído 1/25 foi adicionado a todos os poços. Essa lavagem foi repetida por mais 3 vezes.

Terminada a lavagem, adicionaram-se 100 mcl de conjugado IgA ou IgG anti-humano, a todos os poços e incubou-se a reação por 30 minutos à temperatura ambiente. O passo de lavagem foi repetido como mencionado anteriormente. O desenvolvimento da reação foi feito no escuro, em temperatura ambiente, por 15 minutos, após adição de 100 mcl de cromógeno 3,3',5,5'- tetrametilbencidina. Parou-se a reação com 100 mcl de solução de paragem (ácido sulfúrico 0,5mol/L), que foi adicionada a cada poço. A absorbância foi lida usando-se a leitora de ELISA (*Quick ELISA*) para cada poço a 450 nm.

Unidades foram calculadas para cada amostra, usando-se a equação

1.

$$\text{Equação 1: } \frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do controle positivo}} \times 10$$

Valores de referência foram obtidos do manual de instruções.

Valores de IgG acima de 24 U/L foram considerados positivos; valores abaixo de 16 U/L foram considerados negativos e os valores indeterminados aqueles entre 16 U/L e 24 U/L. Para IgA, valores acima de 18 U/L eram positivos, abaixo de 12 U/L eram negativos e entre 18 U/L e 12 U/L indeterminados.

#### 4.7.3. Dosagem de antitransglutaminase (tTG)

Os anticorpos antitransglutaminase (tTG) da classe IgA foram dosados em todos os pacientes, utilizando-se a técnica de ELISA. O exame foi realizado usando-se o *kit* de enzimoimunoanálise *QUANTA Lite TM* tTG recombinante humana, fabricado por INOVA Diagnósticos, San Diego, Estados Unidos.

Todos os soros foram diluídos a 1:101, usando-se o diluente de amostra. A cada micropoço da placa, revestido com o antígeno transglutaminase, adicionaram-se, em micropoços diferentes, 100 mcl de um controle positivo, controle negativo e as amostras diluídas. As amostras foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, e após esse período de incubação, 300 mcl de tampão de lavagem diluído 1/20 foi

adicionado a todos os poços. Essa lavagem foi repetida por mais duas vezes.

Terminada a lavagem e retirado o excesso de água dos micropoços, adicionaram-se 100 µl de conjugado IgA anti-tTG humana, a todos os poços e incubou-se a reação por 30 minutos à temperatura ambiente. O passo de lavagem foi repetido como mencionado anteriormente. O desenvolvimento da reação foi feito no escuro, por 30 minutos, após adição de 100 µl de cromógeno 3,3',5,5'- tetrametilbencidina. Parou-se a reação com 100 µl de solução de paragem (ácido sulfúrico 0,5 mol/L), que foi adicionada a cada poço. A absorbância foi lida uma hora após, usando-se a leitora de ELISA (*Quick ELISA*) para cada poço a 450 nm.

Considerou-se positivo o exame com valor acima de 25 unidades.

Unidades foram calculadas para cada amostra, usando-se a equação

2.

$$\text{Equação 2: } \frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do controle positivo}} \times 25$$

#### 4.7.4 Análise estatística

Toda análise estatística foi realizada com auxílio do programa SPSS 11.0.4 para Macintosh (Apple Computers), e consideramos estatisticamente significativo  $p = 0,05$ .

Para testar a normalidade da distribuição dos dados de IgA e IgG, utilizamos o teste de Kolmogorov-Smirnov. Como não foram paramétricas, a mediana e o intervalo interquartil foram utilizados na análise descritiva destas variáveis.

A comparação dos valores de positividade de IgA e IgG entre os grupos 1 e 2 foi feita pelo teste de Mann-Whitney. O teste do qui-quadrado foi utilizado para testar a dependência entre DC e positividade de IgA e IgG AGA. A avaliação global da acurácia do teste de IgA e IgG para DC foi feita pela *Receiver Operator Curve* – curva ROC.

## **5. RESULTADOS**

## 5. RESULTADOS

**Grupo 1** – Um total de 132 crianças assistidas no Serviço de Gastroenterologia pediátrica do HUB foram avaliadas de fevereiro a novembro de 2005. Entre os 132 pacientes, 65 eram do sexo feminino (49,2%) e 67 eram do sexo masculino (50,8%).

Uma criança do sexo feminino foi posteriormente excluída da amostra pois ficou comprovado o diagnóstico de DC. Desta forma, o estudo foi concluído com 131 pacientes.

As idades variaram de 10 meses a 12 anos, sendo a mediana igual a 4 anos.

Os diagnósticos apresentados pelos pacientes avaliados foram: diarreia, constipação intestinal crônica (CIC), dor abdominal recorrente (DAR), refluxo gastroesofágico (RGE), distensão abdominal, vômitos e baixo peso para idade. Considerou-se como baixo peso as crianças que se encontravam abaixo do percentil 10 para idade.

TABELA 1. Frequência de diagnósticos do grupo 1

Diagnóstico	Frequência	%
RGE	14	10,7
Diarréia	51	38,9
CIC	17	13,0
DAR	34	26,0
Vômitos	3	2,3
Baixo peso	10	7,6
Distensão abdominal	1	,8
Diarréia + desnutrição	1	,8
Total	131	100,0

Nenhum dos pacientes apresentou deficiência de IgA. Em todos os pacientes foram dosados os anticorpos AGA, da classe IgA e IgG e o tTG. Dos 132 pacientes avaliados, apenas uma paciente apresentou tTG positivo. Esta paciente foi então submetida à realização do anti-EMA, que resultou fortemente positivo, sendo indicada a biópsia intestinal, que por sua vez confirmou o diagnóstico de DC, evidenciando lesão da mucosa intestinal do tipo Marsh III. A paciente foi então excluída do grupo de não celíacos. A paciente referida acima apresentou valor de AGA IgA negativo e AGA IgG de 26,37 mg/dl.

As frequências dos resultados de AGA IgA e IgG estão representadas nas tabelas 2 e 3 respectivamente.

TABELA 2. Frequência dos resultados de AGA IgA do grupo 1

<b>Resultado</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	106	80,9
<b>Indeterminado</b>	13	9,9
<b>Positivo</b>	12	9,2
<b>Total</b>	131	100,0

TABELA 3. Frequência dos resultados de AGA IgG do grupo 1

<b>Resultado</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	69	52,7
<b>Indeterminado</b>	14	10,7
<b>Positivo</b>	48	36,6
<b>Total</b>	131	100,0

Dos 131 pacientes avaliados, 6 deles (4,6%) apresentaram AGA tanto IgA quanto IgG positivos.

**Grupo 2** – Os soros de 48 pacientes celíacos foram analisados. Entre eles, 19 pacientes eram do sexo masculino (39,6%) e 29 do sexo feminino (60,4%).

As idades variaram de 1 a 12 anos, sendo a mediana igual a 6 anos.

As frequências dos resultados de AGA IgA e IgG estão representadas nas tabelas 4 e 5 respectivamente.

TABELA 4. Frequência dos resultados de AGA IgA do grupo 2.

<b>Resultado</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	15	31,3
<b>Indeterminado</b>	10	20,8
<b>Positivo</b>	23	47,9
<b>Total</b>	48	100,0

TABELA 5. Frequência dos resultados de AGA IgG do grupo 2.

<b>Resultado</b>	<b>Frequência</b>	<b>%</b>
<b>Negativo</b>	13	27,1
<b>Indeterminado</b>	10	20,8
<b>Positivo</b>	25	52,1
<b>Total</b>	48	100,0

Em 18,8% dos pacientes tanto IgA quanto IgG foram negativos.

Houve diferença estatística dos valores de positividade de IgA e IgG entre o grupo 1 e o grupo 2, calculada através do teste de Mann-Whitney, com  $p = .000$  para IgA e  $p = .002$  para IgG. No grupo 2, os valores de IgA e IgG são maiores que no grupo 1.

FIGURA 2. Valores de AGA IgA nos dois grupos

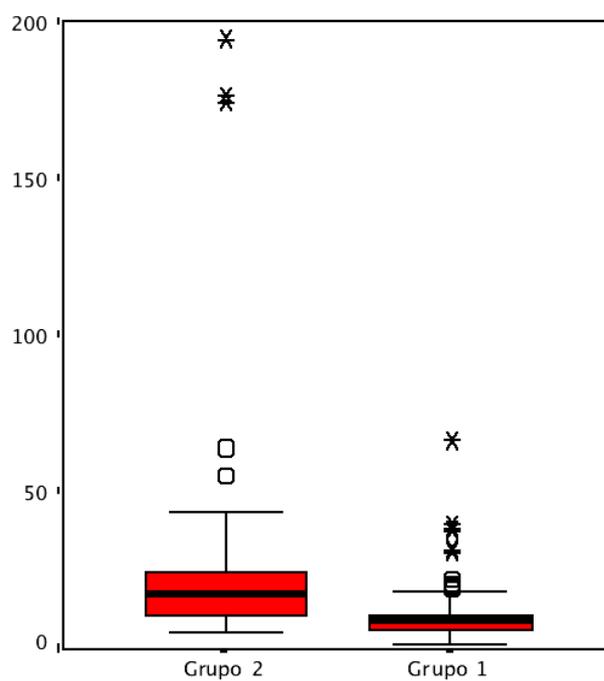
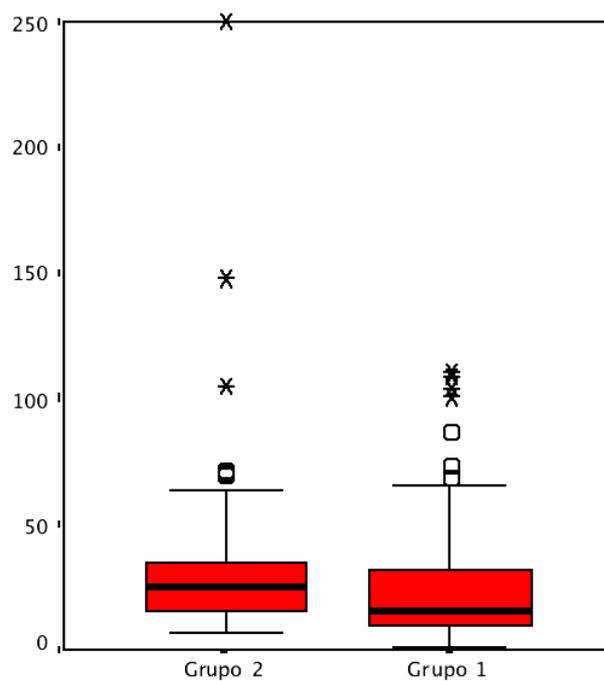


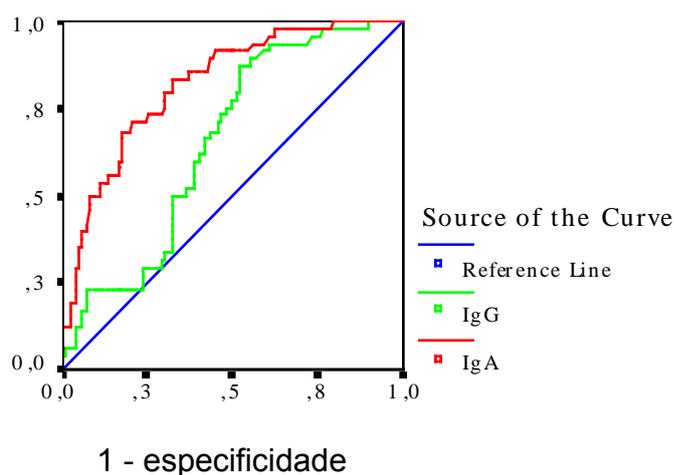
FIGURA 3. Valores de AGA IgG nos dois grupos



O teste de qui-quadrado foi utilizado para avaliar se existiu dependência entre IgA maior que 18 U/L e IgG maior que 24 U/L com o fato de o paciente ser celíaco. O p-valor foi de .000 para IgA e IgG, o que significa que existiu dependência entre IgA maior que 18 U/L e IgG maior que 24 U/L e o fato do paciente ser celíaco.

A curva ROC (*receiver operator characteristic curve*) também foi construída, utilizando os valores de positividade de 18 U/L para IgA e de 24 U/L para IgG AGA. Ela é capaz de avaliar a acurácia global de um teste. A sensibilidade do AGA nesta população foi semelhante para IgA e IgG, sendo de 47,9% e 50% respectivamente. No entanto, a quantidade de falso-positivos para a DC foi maior para IgG (36,9%) que para IgA (8,5%).

FIGURA 4. Curva ROC (*receiver operator characteristic curve*)



Para o grupo de celíacos constatamos que pelo menos 31,3% dos exames eram falso-negativos para IgA, 27,1% falso-negativos para IgG e 18,8% eram falso-negativos para IgA e IgG ao mesmo tempo. Estes números poderiam ser até maiores se não tivéssemos os valores indeterminados do teste.

Todos os pacientes celíacos apresentaram tTG positivo, que foi realizado na época do diagnóstico destes pacientes.

## **6. DISCUSSÃO**

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Caracterização da casuística

A DC tem sido cada vez mais diagnosticada nos últimos anos e isto se deve, em grande parte, ao avanço dos métodos de diagnóstico, que tem permitido a identificação de casos de DC inclusive em suas formas atípicas e assintomáticas, através de rastreamentos sorológicos (Catassi, 2005).

Atualmente, sabe-se que a prevalência dos casos assintomáticos ou atípicos de DC supera em muito as formas clássicas sintomáticas da doença. Assim, pode-se confirmar a idéia do iceberg celíaco descrita anteriormente, de maneira que a razão de casos sintomáticos/assintomáticos em crianças é da ordem de 1 para 5 a 7 (Book, 2002; Catassi, 2005). Isto exige dos métodos sorológicos de rastreamento uma acurácia cada vez maior, pois a sorologia positiva é pré-requisito para a indicação da biópsia, método ainda hoje considerado padrão ouro para o diagnóstico da DC (Walker-Smith et al., 1990).

A biópsia intestinal não é procedimento isento de risco, é desagradável para os pacientes, devendo então ser indicada apenas quando realmente necessária. Neste sentido, é conveniente que o resultado da sorologia apresente poucos falso-positivos, evitando submeter o paciente aos riscos de um exame desnecessário. Além disso, nos países em desenvolvimento como o nosso, a alta prevalência de outras enteropatias

torna difícil a diferenciação diagnóstica baseada apenas na histologia. Isto porque as lesões da mucosa jejunal freqüentemente apresentam aspecto similar entre a DC e outras enteropatias. Assim, o teste sorológico é de grande auxílio na definição diagnóstica (Gandolfi et al., 2001).

A necessidade da utilização de um exame sorológico com poucos falso-positivos torna-se ainda mais premente, se considerarmos que, de forma equivocada, ainda hoje há profissionais de saúde que indicam a dieta isenta de glúten tendo apenas o exame sorológico positivo em mãos.

Entre os métodos sorológicos para o rastreamento da DC, a dosagem de AGA foi um dos primeiros métodos desenvolvidos, sendo utilizada desde a década de 70 (Catassi et al., 2002). Até hoje é o mais difundido em nosso meio, por ser conhecido há mais tempo, ser de fácil realização, permitir que grande número de exames sejam feitos de uma só vez e ser de baixo custo.

No entanto, a sorologia positiva para anticorpos AGA também é encontrada em diversas doenças gastrointestinais que não a DC e em outras doenças auto-imunes (Bonamico et al., 1997; Rensch et al., 2001; Akcay e Akcay, 2003; Bahia et al., 2001). Até mesmo indivíduos normais podem apresentar valores aumentados de AGA. Grodzinsky (1996) demonstrou que 1 em 256 indivíduos doadores de sangue apresentava AGA positivo, porém o valor preditivo positivo (VPP) deste exame foi de apenas 20% para IgA e 0% para IgG.

Nas doenças auto-imunes, a produção de auto-anticorpos não é necessariamente limitada ao órgão alvo e o aumento de AGA nesses pacientes é decorrente da ativação policlonal das células B com geração de

auto-anticorpos usualmente indicativos de outras doenças auto-imunes (Sjoberg et al., 2000). Os anticorpos AGA não são essenciais para a patogênese da DC, e podem estar presentes em outras doenças auto-imunes, isto é, podem refletir resposta não específica à passagem de glúten incompletamente digerido pelo epitélio intestinal (Farrel e Kelly, 2002).

O achado de AGA positivo parece estar relacionado a diversos fatores como a dieta dos pacientes, a idade e até mesmo o ambiente em que se vive (McMillan, 1998; Fälth-Magnusson, 1994; Menzies et al., 1999). Alguns destes fatores, por sua vez, poderiam estar relacionados a alterações de permeabilidade intestinal, que tem sido sugerida por alguns autores como o ponto mais relevante na determinação dos resultados falso-positivos do AGA (Bonamico et al., 1997; Bottaro et al., 1993).

A positividade do AGA não apresentaria relação direta com a presença de DC, mas poderia representar apenas uma resposta imunológica inespecífica frente ao contato de antígenos alimentares com a mucosa intestinal. Assim, um soro positivo para AGA também tenderia a mostrar, por exemplo, positividade para outros antígenos alimentares como lactoglobulina e ovoalbumina (Unsworth, 1996).

O contato de antígenos alimentares com a mucosa intestinal poderia ser facilitado em algumas situações através de um aumento muitas vezes transitório da permeabilidade intestinal. Seria o caso, por exemplo, de indivíduos com diarreia ou outras doenças gastrointestinais, que podem levar a uma alteração da barreira mucosa. Este argumento foi utilizado por Bottaro et al. (1993), quando os autores sugeriram que a presença do AGA

em doenças gastrointestinais como diarreia aguda, parasitoses e intolerância à proteína do leite de vaca seria explicada, pois áreas espalhadas de lesão da mucosa intestinal permitiriam a permeabilidade de macromoléculas como a gliadina, levando à estimulação da produção de anticorpos pelo sistema imune.

Já foi demonstrado que até mesmo indivíduos assintomáticos, que moram em países tropicais, comparados àqueles que vivem em regiões de clima temperado e áreas subtropicais, apresentam aumento da permeabilidade intestinal e menor capacidade absorptiva (Menzies et al., 1999). Esta condição é conhecida como enteropatia ambiental, doença freqüentemente encontrada em nosso meio.

Enteropatia ambiental é definida como um conjunto de alterações inespecíficas do intestino delgado, funcionais e morfológicas, com ou sem exteriorização clínica, reversíveis espontaneamente com a mudança para um ambiente com boas condições de salubridade (Morais e Fagundes Neto, 2003). O reconhecimento inicial destas anormalidades no Brasil foi feito por Fagundes Neto et al. (1981), na forma sintomática, quando da avaliação de um grupo de crianças cuja manifestação clínica predominante foi a diarreia crônica. Neste grupo de crianças, condições inadequadas de saneamento básico, baixa renda e baixa escolaridade dos pais estavam sempre presentes.

No Brasil, apenas dois estudos documentaram o comportamento da dosagem de antigliadina numa população de crianças não celíacas e com outras queixas gastrointestinais (Bahia et al., 2001; Medeiros et al., 1994).

No estudo de Bahia et al. (2001), os autores levantam a questão da validade do exame em países em desenvolvimento, argumentando que a alta frequência de enteropatia ambiental poderia levar a resultados falso-positivos para os anticorpos AGA. Bahia et al encontraram 18% de AGA IgG positivo e 11% de AGA IgA positivo. No estudo de Medeiros et al. (1994), entre pacientes com diarreia crônica, 9,8% dos pacientes apresentaram AGA IgG positivo e 8,8%, AGA IgA positivo.

No nosso estudo, dos 131 pacientes presumivelmente não celíacos avaliados, 36,6% apresentaram AGA IgG positivo e 9,2% tiveram AGA IgA positivo. A positividade para AGA IgG, no grupo estudado, foi maior que a relatada em trabalhos da literatura, enquanto a positividade de AGA IgA foi semelhante (Bottaro et al., 1993; Medeiros et al., 1994; Bonamico et al., 1997; Bahia et al., 2001). Com relação aos estudos internacionais isto talvez possa ser explicado pelas características da nossa população, já que a prevalência aumentada de enteropatia ambiental em nosso meio favorece o aumento de permeabilidade intestinal e em consequência, maior positividade do AGA.

Os resultados acima demonstram que na nossa casuística foi grande o número de pacientes com exames falso-positivos para DC, especialmente para AGA IgG. Isto tornaria este exame insuficiente para inferir o diagnóstico de DC ou direcionar quais casos seriam submetidos à biópsia, já que grande número de biópsias seria feito desnecessariamente. Utilizando apenas o AGA como método sorológico de rastreamento, ainda que não fosse

indicada a biópsia, o próximo passo seria a realização de outro exame sorológico mais acurado, o que onera os custos da investigação diagnóstica.

Uma das limitações do nosso estudo foi a impossibilidade de calcular o VPP do teste. A literatura, porém, demonstra que o VPP do AGA IgG chega a evidenciar valores tão baixos quanto 44% (Rich e Christie, 1990), enquanto os valores mais baixos de VPP do AGA IgA, na literatura pesquisada, foi de 67% (Chartrand et al., 1997).

No grupo de pacientes celíacos, tivemos apenas 52,1% de positividade para IgG e 47,9% de positividade para IgA. Além disso, constatamos que boa parte dos pacientes deste grupo não teria sido diagnosticada se apenas o AGA tivesse sido realizado, já que em 31,3% dos pacientes o IgA foi negativo, em 27,1% dos casos o IgG foi negativo e em 18,8% tanto IgA quanto IgG foram negativos. Isto poderia acarretar conseqüências danosas para os pacientes uma vez que o atraso diagnóstico está associado com o aumento da prevalência de outras doenças autoimunes, da mortalidade e do risco de doenças malignas (Horvath e Hill, 2002).

Na população estudada, a prevalência de resultados negativos de AGA nos pacientes celíacos foi maior que a encontrada na literatura (Bottaro et al., 1993; Chartrand et al., 1997).

Os resultados acima refletem a baixa sensibilidade do teste na população avaliada, que foi de apenas 47,9% para IgA e de 50% para IgG.

A baixa sensibilidade do AGA é demonstrada na literatura, chegando a apenas 53% para IgA (Rich e Christie, 1990) e 54% para IgG (Savilahti et al., 1983).

No grupo 2, os resultados de AGA IgA e IgG foram maiores quando comparados ao grupo 1, havendo diferença estatisticamente significativa. Estes achados estão de acordo com dados da literatura (Fälth-Magnusson et al., 1994; Tucker et al., 1988; Medeiros et al., 1994).

Diferentemente do AGA, quando avaliamos a dosagem do tTG, em todos os pacientes do grupo 1 o resultado foi negativo, enquanto em todos os pacientes do grupo 2 o resultado foi positivo, o que espelha a alta especificidade e sensibilidade do exame na nossa população. Diversos trabalhos na literatura evidenciaram que a dosagem de tTG apresenta alta especificidade e sensibilidade, apresentando forte correlação com os resultados do EMA e conseqüentemente com os resultados da biópsia intestinal (Rostom et al., 2005; Vitoria et al., 2001).

O teste anti-tTG está facilmente disponível em nosso meio com dosagem de IgA anti-tTG, cuja técnica de realização utiliza a mesma metodologia da dosagem do AGA, sendo então de fácil execução, baixo custo e independente do observador.

Este exame tem a vantagem de apresentar VPP para DC mais alto, se comparado à antigliadina. Enquanto o VPP para AGA IgA pode ser de 67% como citado acima, o VPP para IgA anti-tTG chega a 98% (Troncone et al., 1999).

A dosagem de tTG tem se mostrado uma boa alternativa para o rastreamento sorológico de pacientes celíacos, pois estaríamos diminuindo as chances de errar o diagnóstico, uma vez que um resultado positivo, diferente do AGA, representa forte indicativo da presença de DC.

Além disso, um resultado falso-negativo do teste é pouco freqüente. O exame alcança valores preditivos negativos próximos de 100%, diminuindo a possibilidade de deixarmos de diagnosticar a DC (Baudon et al., 2004; Barker et al., 2005). Esta característica do exame parece se manter mesmo em crianças desnutridas, com parasitose intestinal, diarréia persistente ou crônica. Em um trabalho realizado por Gandolfi et al. (2001), que avaliou crianças de 6 meses a 13 anos, também atendidas no serviço de Gastroenterologia Pediátrica do HUB, 31 crianças com forte suspeita clínica de DC, mas que posteriormente tiveram este diagnóstico descartado, foram submetidas à dosagem de tTG. Todas apresentaram resultados negativos do tTG e do EMA. Assim, contrapondo-se ao AGA, este exame parece não sofrer alterações secundárias a fatores ambientais como a enteropatia ambiental.

Desta forma, devido às vantagens demonstradas pelo tTG, sua utilização deve ser difundida e estimulada em detrimento de exames como a dosagem de AGA, que embora já tenha sido muito útil no diagnóstico da DC, vem perdendo espaço para testes mais precisos e atualmente de fácil acesso como o tTG. Como foi visto através dos dados apresentados neste estudo é alta a positividade do AGA IgG em indivíduos que muito

provavelmente não são celíacos, especialmente numa população como a brasileira, sujeita aos agravos da enteropatia ambiental.

## 6.2. Considerações finais

Com o avanço dos métodos sorológicos de diagnóstico da DC, a dosagem de AGA tornou-se um exame de qualidade inferior, se comparado ao tTG e ao EMA. O grande número de exames falso-positivos e a sensibilidade variável fazem dele um método inadequado de diagnóstico sorológico da DC.

No entanto, como a dosagem de AGA é conhecida há mais tempo em nosso meio, sua positividade ainda é muito valorizada. Assim, dados da literatura somados aos achados deste estudo poderiam alertar a classe médica, especialmente pediatras e gastroenterologistas, para a utilização de métodos sorológicos mais precisos de diagnóstico como o tTG e o EMA.

## **7. CONCLUSÕES**

## **7. CONCLUSÕES**

**7.1.** A prevalência de positividade do AGA em crianças presumivelmente não celíacas e com outras patologias gastrointestinais foi de 36,6% para IgG e de 9,2% para IgA na população estudada.

**7.2.** A prevalência de positividade do AGA nas crianças celíacas foi de 52,1% para IgG e de 47,9% para IgA.

**7.3.** A quantidade de exames falso-positivos foi alta para o AGA IgG enquanto a sensibilidade do exame foi baixa tanto para IgA quanto para IgG, na população estudada, o que compromete o seu uso como método de diagnóstico sorológico da DC pela chance considerável de erro de diagnóstico.

## **8. ANEXO**

**8. ANEXO**

Nome:

Responsável:

Data de nascimento:

Idade:

Registro:

Sexo:

Naturalidade:

Endereço:

Telefone:

História da doença atual:

Diarréia

Colite

Dor abdominal recorrente

Distensão abdominal

Vômitos

Refluxo gastroesofágico

Flatulência

P:

A:

Antecedentes de interesse:

Introdução de alimentos sólidos:

Trigo:

Prematuridade:

Exame físico (dados positivos)

Exames laboratoriais:

IgG AGA:

IgA AGA:

IgA tTG:

IgA sérica total:

## **9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akçay MN, Akçay G. The presence of the antigliadin antibodies in autoimmune thyroid diseases. *Hepatogastroenterology* 2003 (2): 279-80.

Auricchio S, Troncone R. History of coeliac disease. *Eur J Pediatr* 1996; 155: 427-8.

Bahia M, Rabello A, Brasileiro Filho G, Penna FJ. Serum antigliadin antibody levels as a screening criterion before jejunal biopsy indication for celiac disease in a developing country. *Braz J Med Biol Res* 2001; 34: 1415-20.

Barker CC, Mitton C, Jevon G, Mock T. Can tissue transglutaminase antibody titers replace small-bowel biopsy to diagnose celiac disease in select pediatric populations? *Pediatrics* 2005; 115: 1341-6.

Baudon JJ, Johanet C, Absalon YB, Morgant G, Cabrol S, Mougnot JF. A comparison of human tissue transglutaminase antibodies with antigliadin and antiendomysium antibodies. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2004; 158: 584-88.

Bodé S, Weile B, Krasilnikoff PA, Gudman-Hoyer E. The diagnostic value of gliadin antibody test in celiac disease in children: a prospective study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 17: 260-4.

Bonamico M, Ballati G, Mariani P, Latini M, Triglione P, Rana I et al. Screening for coeliac disease: the meaning of low titers of anti-gliadin antibodies in non-coeliac children. *Eur J Epidemiol* 1997; 13:55-9.

Bonamico M, Tiberti C, Picarelli A, Mariani P, Rossi D, Cipolletta E et al. Radioimmunoassay to detect antitransglutaminase autoantibodies is the most sensitive and specific screening method for celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(5): 1536-40.

Book KL. Diagnosing celiac disease in 2002: who, why, how? *Pediatrics* 2002; 109: 952-3.

Bottaro G, Failla P, Rotolo N, Azzaro F, Spina M, Castiglione N et al. Valore predittivo degli anticorpi gliadina (AGA) nella diagnosi di malattia gastrointestinale non celíaca del bambino. *Minerva Pediatr* 1993; 45:93-8.

Bottaro G, Rotolo N, Spina M, Sciuto C, Castiglione S, Sanfilippo G et al. Evaluation of sensitivity and specificity of antigliadin antibodies for the diagnosis of celiac disease in childhood. *Minerva Pediatr* 1995; 47(12): 505-10.

Campos JV. A biópsia peroral do intestino delgado na criança. Bases para o estudo da mucosa entérica. *Arq Gastroenterol* 1970; 7:107.

Catassi C, Rättsch IM, Fabiani 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. The coeliac iceberg in Italy. A multicentre antigliadin antibodies screening for celiac disease in school-age subjects. *Acta Paediatr Suppl* 1996; 412: 29-35.

Catassi C, Ratsch IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Ast R et al. Why is coeliac disease endemic in the people of Sahara? *Lancet* 1999; 354(9): 647.

Catassi C, Fornaroli F, Fasano A. Celiac disease: from basic immunology to bedside practice. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2002; 3: 61-71.

Catassi C. El mapa mundial de la enfermedad celíaca. *Acta Gastroenterol Latinoam* 2005; 35: 46-55.

Chan KN, Phillips AD, Mirakian R, Walker-Smith JA. Endomysial antibody screening in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994; 18(3): 316-20.

Chand N, Mihas AA. Celiac disease: current concepts in diagnosis and treatment. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 3-14.

Chartrand LJ, Agulnick J, Vanounou T, Russo PA, Baehler P, Seidman EG. Effectiveness of antigliadin antibodies as a screening test for celiac disease in children. *Can Med Assoc J* 1997; 157: 527-33.

Chorzelski TP. IgA anti-endomysium antibody. A new immunological marker of dermatitis herpetiformis and celiac disease. *Br J Dermatol* 1984; 111(4): 395- 402.

Ciclitira PJ, Moodie SJ. Coeliac disease. Best practice and research. *Clinical Gastroenterology* 2003; 17(2): 181-95.

Collin P, Kaukinen K, Vogelsang H, Korponay-Szabó I, Sommer R, Schreier E et al. Antiendomysial and antihuman recombinant tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis of celiac disease: a biopsy-proven european multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17(1): 85-91.

Davidson LSP, Fountain JR. Incidence of sprue syndrome with some observation on the natural history. *BMJ* 1950; 1:1157-1161. Citado por: Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001; 120: 636-51.

Dietrich W, Ehnis T, Bauer M. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3: 797-01.

Fagundes-Neto U, Viaro T, Wehba J, Machado NL, Patrício FR, Michalany J. Enteropatia tropical: alterações morfológicas e funcionais do intestino delgado e suas repercussões sobre o estado nutricional. *Arq Gastroenterol* 1981; 18(4): 177-82.

Fälth-Magnusson K, Jansson G, Stenhammar L, Magnusson KE. Serum food antibodies analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and diffusion-in-gel (DIG)-ELISA methods in children with and without celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994; 18: 56-62.

Farrell RJ, Kelly CP. Diagnosis of celiac sprue. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 3237-46.

Farrell RJ, Kelly CP. Celiac sprue. *N Engl J Med* 2002; 346(3): 180-8.

Fasano A. Celiac disease: the past, the present, the future. *Pediatrics* 2000; 107: 768-70.

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

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

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

Gandolfi L, Pratesi R, Cordoba JCM, Tauil PL, Gasparin M, Catassi C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol* 2000; 95(3): 689-92.

Gandolfi L, Catassi C, Garcia S, Modelli IC, Campos Júnior D, Pratesi R. Antiendomysial antibody test reliability in children with frequent diarrhea and malnutrition: is it celiac disease? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33: 483-7.

Gomez JC, Selvaggio GS, Viola M, Pizarro B, La Motta GB. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol* 2001; 96 (9): 2700-4.

Gomez JC, Selvaggio G, Pizarro B, Viola MJ, La Motta G, Smecuol E et al. Value of a screening algorithm for celiac disease using tissue transglutaminase antibodies as first level in a population-based study. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(11): 2785-90.

Green PHR, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet* 2003; 362: 383-91.

Grodzinsky E. Screening for coeliac disease in apparently healthy blood donors. *Acta Paediatr Suppl* 1996; 412: 36-8.

Guandalini S, Gupta P. Celiac disease: a diagnostic challenge with many facets. *Clinical and Applied Immunology Reviews* 2002; 2: 293-305.

Hansson T, Dahlbom I, Hall J, Holtz A, Elfman L, Dannaeus A et al. Antibody reactivity against human and guinea pig tissue transglutaminase in children with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 30(4): 379-84.

Hill ID, Bhatnager S, Cameron JS. Working group on Celiac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000a; 34:31-44.

Hill I, Fasano A, Schwartz R, Counts D, Glock M, Horvath K. The prevalence of celiac disease in at-risk groups of children in the United States. *Journal of Pediatrics* 2000b; 136(1): 86-90.

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

Holm K, Mäki M, Savilahti E, Lipsanen V, Laippala P, Koskimies S. Intraepithelial gama-delta T cell receptor lymphocytes and genetic susceptibility to celiac disease. *Lancet* 1992; 339: 1500-3.

Holmes GK, Prior P, Lane MR, Pope D, Allan RN. Malignancy in celiac disease: effect on a gluten free diet. *Gut* 1989; 30: 333-8.

Horvath K, Hill ID. Anti-tissue transglutaminase antibody as the first line screening for celiac disease: good-bye antigliadin tests? *Am J Gastroenterol* 2002; 97(11): 2702-3.

James SP. Prototypic disorders of gastrointestinal mucosal immune function: celiac disease and Crohn's disease. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115(1): 25-30.

Jennings JSR, Howdle PD. New developments in celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2003; 19:118-29.

Johnston SD. A comparison of antibody to tissue transglutaminase with conventional serological tests in the diagnosis of celiac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15(9): 1001-4.

Jones RB, Robins GG, Howdle PD. Advances in celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2006; 22: 117-23.

Kagnoff MF. Overview and pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology* 2005; 128(4): S10-S 8.

Korponay-Szabó R, Ilma R, Kovacs JB, Czinner A, Goracz G, Vamos A et al. High prevalence of silent celiac disease in preschool children screened with IgA/IgG antiendomysium antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 26-30.

Kumar V, Lerner A, Valeski JE, Beutner EH, Chorzelski TP, Rossi T. Endomysial antibodies in the diagnosis of celiac disease and the effect of gluten on antibody titers. *Immunol Invest* 1989; 18(1-4): 533-44.

Macdonald TT. The biochemical basis of immune enteropathy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002; 34: 537- 40.

McMillan SA. Dietary intake, smoking and transient anti-gliadin. *Scand J Gastroenterol* 1998; 33(5): 499-503.

Maiuri L, Picarelli A, Boirivant M, Coletta S, Mazzilli MC, De Vicenzi M et al. Definition of initial immunologic modifications upon in vitro gliadin challenge in the small intestine of celiac patients. *Gastroenterology* 1996; 110(5):1368-78.

Mäki M, Holm K, Collin P, Savilahti E. Increase in gama/delta T cell receptor bearing lymphocytes in normal small bowel mucosa in latent celiac disease. *Gut* 1991; 32: 1412-14.

Mäki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet* 1997; 349: 1755-9.

Mäki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T et al. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med* 2003; 348 (25): 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.

Mcmanus R, Kelleher D. Celiac Disease - The villain unmasked? *N Engl J Med* 2003; 348: 2573-4.

Medeiros EHGR, Patrício FRS, Morais MB, Leser PG, Wehba J. Anticorpo sérico antigliadina no diagnóstico e seguimento da doença celíaca. *Gastroenterologia Pediátrica* 1994; 31: 154-8.

Meloni G, Dore A, Fanciulli G, Tanda F, Bottazzo GF. Subclinical celiac disease in schoolchildren from northern Sardinia. *Lancet* 1999; 353 (9146): 37.

Mention JJ, Ben Ahmed M, Bègue B, Barbe U, Verkarre V, Asnafi V et al. Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* 2003; 125: 730-45.

Menzies IS, Zuckerman MJ, Nukajam WS, Somasundaram SG, Murphy B, Jenkins AP et al. Geography of intestinal permeability and absorption. *Gut* 1999; 44: 483-89.

Meuwisse GW. Diagnostic criteria for coeliac disease. Report of a round table discussion. *Acta Paediatr Scand* 1970; 59: 461-63.

Morais MB e Fagundes Neto U. Enteropatia ambiental. *Estudos Avançados* 2003; 17(48): 137-48.

Mowat AM. Coeliac disease - a meeting point for genetics, immunology and protein chemistry. *Lancet* 2003; 361: 1290-2.

Murray JA. Serologic testing for celiac disease in the United States: results of a multilaboratory comparison study. *Clin Diagn Lab Immunol* 2000; 7(4): 584-7.

Mylotte M, Egan-Mitchell B, McCarthy CF, McNicholl B. Incidence of celiac disease in the west of Ireland. *BMJ* 1973; 1: 703-5. Citado por: Fasano A. Celiac disease: the past, the present, the future. *Pediatrics* 2000a; 107: 768-70.

Partanen J. Major Histocompatibility Complex and Coeliac Disease. In: Markku M, Collin P, Visakorpi JK, editors. *Coeliac disease. Proceedings of the seventh international symposium*. Finland: Tampere; 1996. p. 253-64.

Paveley WF. From Arateus to Crosby: a history of celiac disease. *Br Med J* 1988; 297: 24-31.

Perticarari S, Not T, Cauci S, Luchesi A, Presani G. ELISA method for quantitative measurement of IgA and IgG specific anti-gliadin antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1992; 15: 302-9.

Pratesi R, Gandolfi L, Garcia SG, Modelli IC, Almeida PL, Bocca AL et al. Prevalence of celiac disease: unexplained age- related variation in the same population. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38(7): 747-50.

Rensch MJ, Szykowski R, Shaffer RT, Fink S, Kopecky C, Grissmer L et al. The prevalence of celiac disease autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(4): 1113-5.

Rich EJ, Christie DL. Anti-gliadin antibody panel and xylose absorption test in screening for celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990; 10:174-8.

Riestra S, Fernandez E, Rodrigo L, Garcia S, Ocio G. Prevalence of coeliac disease in the general population of northern Spain. Strategies of serologic screening. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35(4): 398-402.

Robins G, Howdle PD. Advances in celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol*, 2005; 21(2): 152-61.

Rossi TM, Kumar V, Lerner A, Heitlinger LA, Tucker N, Fisher J. Relationship of endomysial antibodies to jejunal mucosal pathology: specificity towards both symptomatic and asymptomatic celiacs. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1988; 7(6): 858-63.

Rostom A, Dubé C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C et al. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology* 2005; 128: S38-S46.

Savilahti E, Perkkiö M, Kalimo K, Viander M, Vainio E, Reunala T. IgA antigliadin antibodies: a marker of mucosal damage in childhood coeliac disease. *Lancet* 1983; 12: 320-2.

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

Shamir R. Advances in celiac disease. *Gastroenterology Clinics* 2003; 32(3): 931-47.

Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM et al. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002; 297: 2275-79.

Shidrawi RG, Przemioslo R, Davies DR, Tighe MR, Ciclitira PJ. Pitfalls in diagnosing celiac disease. *J Clin Pathol* 1994; 47: 693-4.

Sjoberg K, Wassmuth R, Reichstetter S, Eriksson KF, Ericsson UB, Eriksson S. Gliadin antibodies in adult insulin-dependent diabetes-autoimmune and immunogenetic correlates. *Autoimmunity* 2000; 32(4): 217-28.

Sollid LM. Is celiac disease an autoimmune disorder? *Curr Opin Immunol* 2005; 17(6): 595-600.

Sollid ML. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. Nature Publishing Group 2002; 2: 647-55.

Stern M. Serological screening for celiac disease: methodological standards and quality control. Acta Paediatr 1996; 412: 49-51.

Stern M; Working group on serologic screening for celiac disease. Comparative evaluation of serologic tests for celiac disease: a European initiative toward standardization. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2000; 31(5): 513-9.

Trevisiol C, Not T, Berti I, Burt E, Citta A, Neri E et al. Screening para la enfermedad celíaca en dadores de sangre sanos en dos centros de inmunotrasfusión en el noreste de Itália. J Gastroenterol Hepatol 1999; 31: 584-6.

Troncone R, Greco L, Aurichio S. Gluten sensitive enteropathy. Pediatr Clin North Am 1996; 43(2):355-74.

Troncone R, Maurano F, Rossi M, Micillo M, Greco L, Auricchio R et al. IgA antibodies to tissue transglutaminase: an effective diagnostic test for celiac disease. J Pediatr 1999; 134(2): 166-71.

Tucker NT, Barbhuthy FS, Prihoda TJ, Kumar V, Lerner A, Lebenthal E. Antigliadin antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay as a marker of childhood celiac disease. J Pediatr 1988; 113: 286-9.

Unsworth DJ, Manuel PD, Walker-Smith JA, Campbell CA, Johnson GD, Holborow J. New immunofluorescent blood test for gluten sensitivity. *Arch Dis Child* 1981; 56: 864-8.

Unsworth DJ. Serological diagnosis of gluten sensitive enteropathy. *J Clin Pathol* 1996; 49: 704-11.

Vader W, Kooy Y, Veelen P, Ru A, Harris D, Benckhuijsen W et al. The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* 2002; 122: 1729-37.

Valdimarsson T, Franzen L, Grodzinsky E, Skogh T, Strom M. Is small bowel biopsy necessary in adults with suspected celiac disease and IgA anti-endomysium antibodies? 100% positive predictive value for celiac disease in adults. *Diagnosis Disease Science* 1996; 41(1): 83-7.

Van Stirum J, Baerlocher K, Fanconi A, Gugler E, Shmerling DH. The incidence of coeliac disease in children of Switzerland. *Helv Paediatr Acta* 1972; 37: 421-30. Citado por: Fasano A. Celiac disease: the past, the present, the future. *Pediatrics* 2000a; 107: 768-70.

Vitoria JC, Arrieta A, Ortiz L, Ayesta A. Antibodies to human tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33(3): 349-50.

Vogten AJM. Coeliac disease: one century after Samuel Gee. *Neth J Med* 1987; 31: 253-55.

Walker-Smith JA. Coeliac disease. In: Pediatric Gastrointestinal disease. 3<sup>th</sup> ed. 2000. p. 727-45.

Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J. Revised criteria for diagnosis of celiac disease. Archives of disease in childhood 1990; 65: 909-11.