

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

ROSA HARUMI UENISHI

AVALIAÇÃO E UTILIDADE DOS BIOMARCADORES NÃO INVASIVOS IFABP E REG1 α NO MONITORAMENTO DA DESTRUIÇÃO E DA REGENERAÇÃO DO EPITÉLIO INTESTINAL EM PACIENTES CELÍACOS ANTES E DEPOIS DA DIETA SEM GLÚTEN

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

Orientadora: Profa. Dra. Lenora Gandolfi

BRASÍLIA

2017

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

ROSA HARUMI UENISHI

AVALIAÇÃO E UTILIDADE DOS BIOMARCADORES NÃO INVASIVOS IFABP E REG1 α NO MONITORAMENTO DA DESTRUIÇÃO E DA REGENERAÇÃO DO EPITÉLIO INTESTINAL EM PACIENTES CELÍACOS ANTES E DEPOIS DA DIETA SEM GLÚTEN

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

Orientadora: Profa. Dra. Lenora Gandolfi

BRASÍLIA

2017

ROSA HARUMI UENISHI

AVALIAÇÃO E UTILIDADE DOS BIOMARCADORES NÃO INVASIVOS IFABP E REG1 α NO MONITORAMENTO DA DESTRUIÇÃO E DA REGENERAÇÃO DO EPITÉLIO INTESTINAL EM PACIENTES CELÍACOS ANTES E DEPOIS DA DIETA SEM GLÚTEN

Tese apresentada como requisito para a obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Aprovada em 21 de agosto de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lenora Gandolfi – Presidente
Instituição: Universidade de Brasília

Profa. Dra. Angélica Amorim Amato
Instituição: Universidade de Brasília

Profa. Dra. Renata Puppim Zandonadi
Instituição: Universidade de Brasília

Prof. Dr. Luiz Cláudio Gonçalves de Castro
Instituição: Universidade de Brasília

Prof. Dr. Paulo Sérgio Azeredo Henriques Filho
Instituição: Secretaria da Saúde do DF

*Dedico este trabalho aos que me inspiram a prosseguir, Luiz, Filipe, Júlia, Toyoji,
Yoshiko*

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo amor incondicional e permissão desta conquista;

Aos pacientes celíacos, o motivo mor deste trabalho, pela participação e incentivo;

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

À minha família amada: o esposo Luiz Antonio de Oliveira e os meus filhos preciosos Filipe Kyuji Oliveira e Júlia Emi Oliveira pelo amor, apoio, paciência, compreensão e incentivo permanente;

Aos meus pais Toyoji Uenishi (*in memoriam*) e Yoshiko Uenishi; e aos meus irmãos Marly Nozomi, Rogério Satoru, Eliza Kaori e Sílvia Ayumi por me ensinarem o valor da vida e não desistir diante dos desafios;

Ao Pr. Eduardo Toshiaki Yassui e esposa Hiroko Tanihira Yassui pelas orações, apoio e palavras de incentivo;

Ao Prof. Dr. Raul Yukihiro Matsushita pelo apoio e cálculos estatísticos;

Aos meus amigos do Laboratório de Pesquisa em Doença Celíaca e do Ambulatório de Doença Celíaca pelas aulas, apoio e carinho: Lucas Malta, Fernanda Coutinho, Patrícia Fritsch, Eduardo Lourenço, Nicole Selleski, Alessandra Domingues, Priscila Farage, Adriana e Claudia Pratesi, Zita Lopes, Isabella Márcia Nogueira, Aparecida Leite, Marilen Souza, Gabriel Ginani, Renata Simione, Cristina Simeone, Ana Carolina A. Rocha, Igle Paz Ribeiro e seu companheiro inseparável Álvaro, e a Laís Armán Jovita, quem realizou os experimentos da pesquisa.

À Universidade de Brasília e especialmente aos funcionários da secretaria de pós-graduação em Ciências da Saúde pela paciência e caloroso apoio;

À Capes pelo fundamental e decisivo fomento;

Á todos que me apoiaram direta ou indiretamente nesse processo contínuo de acumular conhecimento e saber.

“Existe entre vocês alguém que seja sábio e inteligente? Pois então que prove isso pelo seu bom comportamento e pelas suas ações, praticadas com humildade e sabedoria. Tiago 3:13”

RESUMO

CONTEXTO: A biópsia intestinal da atrofia vilositária provocada pelo glúten em pacientes com doença celíaca (DC) é solicitado para definir o diagnóstico, porém esse método invasivo pode até ser dispensado em crianças com os valores de IgA-tTG dez vezes acima do ponto de corte. Os biomarcadores não invasivos para constatar a lesão da mucosa intestinal denominados IFABP e Reg1 α podem ser úteis no diagnóstico, no monitoramento da DC e nos casos de IgA deficiente. Sendo a IFABP detectada na destruição dos enterócitos e a Reg1 α , regeneração desses.

OBJETIVO: Avaliar os níveis séricos de IFABP e Reg1 α em pacientes DC ao diagnóstico (DC-glúten) e os mesmos DC em tratamento (DC-GFD) e verificar o desempenho desses biomarcadores.

MÉTODO: Nível sérico de IFABP e Reg1 α foram testados em 55 pacientes DC coletados em épocas distintas, antes (DC-glúten) e depois do tratamento (DC-GFD). Os pacientes realizaram biópsia intestinal apenas na época do diagnóstico. A análise sorológica foi feita pelo teste ELISA para exames IFABP, Reg1 α e IgA-tTG e exame de imunofluorescência indireta para IgA-EMA. A análise estatística utilizada para determinar a diferença entre os grupos foram teste *t* com *posttest* de Wilcoxon e curva ROC. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADO: Detectou-se a nível sérico IFABP ($p < 0,001$; 2.112,2pg/mL \pm 1.035,9 versus 1.457,4pg/mL \pm 660,5) e Reg1 α ($p < 0,001$; 838,4ng/L \pm 687,9 versus 648,7ng/L \pm 558,4). O desempenho dos biomarcadores IFABP ($p < 0,001$) com AUC 0,70 (95% IC: 0,60 a 0,80) e Reg1 α ($p = 0,26$) com AUC 0,56 (95% IC: 0,45 a 0,66).

CONCLUSÃO: Houve diferença entre os grupos DC ao diagnóstico e DC em tratamento nos níveis séricos dos biomarcadores IFABP e Reg1 α . Entretanto ao verificar o desempenho dos exames a IFABP demonstrou ser regular e a Reg1 α , ineficiente.

PALAVRAS-CHAVE: Biomarcador, IFABP, Reg1 α , teste não invasivo, doença celíaca.

ABSTRACT

BACKGROUND: Intestinal biopsy of gluten-induced villous atrophy in patients with celiac disease (DC) is required to define diagnosis, but this invasive method may even be dispensed in children with IgA-tTG ten times over the cut off value. Noninvasive biomarkers for detecting intestinal mucosal lesion called IFABP and Reg1 α may be useful in diagnosis, monitoring of CD and in cases of IgA deficient. Since IFABP is detected in the destruction of enterocytes and Reg1 α , regeneration of these.

OBJECTIVE: To evaluate the serum levels of IFABP and Reg1 α in DC patients at diagnosis (DC-gluten) and the same DC in treatment (DC-GFD) and to verify the performance of these biomarkers.

METHOD: Serum level of IFABP and Reg1 α were tested in 55 DC patients collected at different times, before and after treatment. The patients underwent intestinal biopsy only at the time of diagnosis. Serological analysis was performed by ELISA test for IFABP, Reg1 α and IgA-tTG and indirect immunofluorescence test for IgA-EMA. The statistical analysis used to determine the difference between paired groups were *t*-test, followed by Wilcoxon posttest and ROC curve. Data were considered statistically significant when $p < 0,05$.

RESULTS: Serum levels of IFABP ($p < 0,001$; $2.112,2\text{pg/mL} \pm 1.035,9$ versus $1.457,4\text{pg/mL} \pm 660,5$) and Reg1 α ($p < 0,001$; $838,4\text{ng/L} \pm 687,9$ versus $648,7\text{ng/L} \pm 558,4$) were detected. The IFABP performance ($p < 0,001$) with AUC 0,70 (95% CI: 0,60 to 0,80) and Reg1 α ($p = 0,26$) with AUC 0,56 (95% CI: 0,45 to 0,66).

CONCLUSION: There was a difference between the DC groups at the diagnosis and the CD being treated in the serum levels of the biomarkers IFABP and Reg1 α . However, when checking the performance of the tests, the IFABP was regular and the Reg1 α was inefficient.

KEY WORDS: Biomarker, IFABP, Reg1 α , non-invasive test, celiac disease.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo do <i>iceberg</i> celíaco.....	22
Figura 2 – Fisiopatologia da DC..	24
Figura 3 – Sistema de classificação histológica de Marsh-Oberhuber.....	28
Figura 4 – Método imunofluorescência indireta para detecção de IgA-EMA.....	38
Figura 5 – IgA-EMA negativo (A) e positivo (B).....	39
Figura 6 – Método imunoenzimático ELISA indireto para IgA-tTG.....	40
Figura 7 – Método imunoenzimático ELISA competitivo para IFABP.....	42
Figura 8 – Método imunoenzimático ELISA sanduíche indireto para Reg1 α	43
Figura 9 – Comparação direta de pacientes DC-glúten e DC-GFD para os exames séricos IFABP (A) e Reg1 α (B).....	47
Figura 10 – Comparação em coluna entre pacientes celíacos ao diagnóstico e após tratamento de IFABP (A) e Reg1 α (B).....	48
Figura 11 – Coeficiente de correlação de IFABP (A) e Reg1 α (B) em relação ao tempo de tratamento.....	49
Figura 12 – Associação entre a biópsia intestinal Marsh-Oberhuber 3 e o exame sérico IFABP (A) e Reg1 α (B).....	49
Figura 13 – Curva ROC das proteínas IFABP(A) e Reg1 α (B).....	51
Figura 14 – Regressão linear entre DC-glúten e o DC-GFD do biomarcador IFABP (A) e Reg1 α (B).....	52
Figura 15 – Esquema das lesões intestinais da DC conforme classificação de Marsh-Oberhuber.....	55
Figura 16 – Fissura (seta amarela) e fusão das criptas de Lieberkühn.....	57
Figura 17 – Regulação entre a apoptose e regeneração dos enterócitos pelas ações da IL-6 no contexto inflamatório.....	59
Figura 18 – Coexistência de vários níveis de atrofia vilositária.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Pacientes participantes da pesquisa.....	37
Tabela 2 – Especificação da hipótese estatística.....	45
Tabela 3 – Resultados séricos dos pacientes DC.....	47
Tabela 4 – Níveis séricos conforme tempo de dieta sem glúten.....	48
Tabela 5 – Medidas resumo dos biomarcadores IFABP e Reg1 α segundo Marsh-Oberhuber 3 de atrofia vilositária em pacientes DC ao diagnóstico.....	50
Tabela 6 – Desempenho dos biomarcadores IFABP e Reg1 α	51
Tabela 7 – Estudos de referência dos biomarcadores IFABP e Reg1 α	53
Tabela 8 – Característica dos pacientes em tratamento há mais de dez anos.....	62
Tabela 9 – Desempenho dos biomarcadores IFABP e Reg1 α citado nos estudos de referencia.....	64

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AmbDC/HUB – Ambulatório de Doença Celíaca do Hospital Universitário de Brasília

AUC – *Area Under the Curve* ou área sob a curva

°C – Grau Celsius

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

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

Curva ROC – *Receiver Operator Characteristic Curve* ou característica operatória do receptor

DC – Doença celíaca

DC-glúten – Paciente portador de Doença Celíaca que consumia Glúten

DC-GFD – Paciente portador de Doença Celíaca que não consome Glúten

D.O – Densidade óptica

E – Especificidade

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* ou Ensaio Imunoenzimático

EMA – Antiendomísio

ESPGAN – *European Society for Paediatric Gastroenterology and Nutrition* ou sociedade europeia de gastroenterologia e nutrição pediátrica

ESPGHAN – *European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* ou sociedade europeia de gastroenterologia, hepatologia e nutrição pediátrica

F – Feminino

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

GFD – *Gluten Free Diet* ou dieta livre de glúten

HGNC – *HUGO Gene Nomenclature Committee*

HLA – *Human Leukocyte Antigen* ou antígeno leucocitário humano

h-IFABP – *Human Intestinal Fatty acid Binding Protein* ou anticorpo da proteína ligadora de ácidos graxos humano

HUB – Hospital Universitário de Brasília

IFABP – *Intestinal Fatty acid binding protein* ou proteína ligadora de ácidos graxos intestinal

IgA – Imunoglobulina

IgA-EMA – IgA-Antiendomísio

IgA-tTG – IgA-Antitransglutaminase

IFN- γ – Interferon gama

IL – Interleucina

ISC – *Intestinal Stem Cells* ou células tronco intestinal

LIE – Linfócitos Intra-epiteliais

LabDC/UnB – Laboratório de Pesquisas em Doença Celíaca

M – Masculino

mL – Mililitro

μ L – Microlitro

μ M – Micrometro

min – Minutos

ng/L – Nanograma por litro

nm – Nanometro

PBS – *Phosphate Buffered Saline* ou tampão fosfato-salino

PCR – *Polymerase Chain Reaction* ou reação de polimerase em cadeia

pg/mL – Picograma por mililitro

Reg – *Regenerating Gene* ou gene regenerador

Reg1 α – *Regenerating Islet-derived 1 alpha* ou regenerador derivado de ilhota 1 alfa

rpm – Rotações por minuto

RV – Razão de verossimilhança

S – Sensibilidade

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Th1 – Células Tauxiliares da imunidade celular tipo 1

Th2 – Células Tauxiliares da imunidade humoral tipo 2

Th17 – Células T auxiliares tipo 17

TG2 – Transglutaminase tecidual tipo 2

TGF- β – *Transforming Growth Factor Beta* ou fatores transformadores do crescimento beta

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor alpha* ou fator de necrose tumoral alfa

Treg – Células tipo T reguladoras

UnB – Universidade de Brasília

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	DOENÇA CELIAC.....	20
2.2	NOVOS BIOMARCADORES PROPOSTOS.....	30
2.2.1	<i>Intestinal Fatty Acid Binding Protein (IFABP)</i>	30
2.2.2	<i>Regenerating Islet-derived 1 alpha (Reg1α)</i>	31
3	OBJETIVO	33
3.1	PRINCIPAL.....	33
3.2	SECUNDÁRIOS.....	33
3.2.1	Correlacionar os níveis séricos de IFABP e Reg1α ao diagnóstico e conforme o tempo de dieta livre de glúten.....	33
3.2.2	Verificar a associação entre o exame sérico de IFABP e de Reg1α com os exames de biópsia intestinal pela classificação de Marsh-Oberhuber 3.....	33
3.2.3	Verificar o desempenho dos biomarcadores séricos IFABP e Reg1α como possível indicativo da lesão da mucosa intestinal em pacientes DC.....	33
3.2.4	Verificar o efeito do tratamento pela dieta livre de glúten nos pacientes DC ao diagnóstico pela análise de IFABP e de Reg1α.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODO	34
4.1	DELINEAMENTO.....	34
4.2	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	Erro! Indicador não definido.
4.3	AMOSTRAGEM.....	34
4.4	IMPLEMENTAÇÃO DA PESQUISA.....	34
4.4.1	Critérios de Inclusão.....	35
4.4.2	Critérios de Exclusão.....	38
4.5	FLUXOGRAMA DA PESQUISA.....	35
4.6	SUJEITOS DA PESQUISA.....	36

4.7	COLETA, ARMAZENAMENTO, BUSCA DE SORO ESTOCADO E PROCESSAMENTO DO MATERIAL.....	37
4.8	ANÁLISE SOROLÓGICA.....	38
4.8.1	Análise de Anticorpos IgA-EMA.....	38
4.8.2	Análise de Anticorpos IgA-tTg.....	40
4.8.3	Análise da Proteína IFABP.....	41
4.8.4	Análise da Proteína Reg1α.....	43
4.9	BIÓPSIA ENDOSCÓPICA DUODENAL.....	44
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5	RESULTADOS.....	47
6	DISCUSSÃO.....	53
7	CONCLUSÃO.....	66

1. INTRODUÇÃO

A atrofia vilositária intestinal consequente da doença celíaca (DC) pode ser visualizada pela técnica da endoscopia digestiva alta, que permite obtenção de pequenos fragmentos da mucosa intestinal (biópsia) destinados à análise histopatológica(1–4). A biópsia é recomendada na DC como método auxiliar de diagnóstico e, em alguns casos, como forma de acompanhamento/seguimento da doença. A realização da biópsia é considerada invasiva e, além disso, o paciente é submetido à sedação ou até mesmo à anestesia geral(5–9).

Os testes séricos específicos para a DC como IgA-Antitransglutaminase (IgA-tTG) e IgA-Antiendomísio (IgA-EMA), infelizmente, não são capazes de demonstrar o grau de atrofia vilositária ou o grau de regeneração tecidual após a realização do tratamento(10–13). Esses exames séricos são utilizados como parte primordial do diagnóstico e, também, utilizados na fase de seguimento de pacientes portadores de DC em tratamento (dieta sem glúten)(14–18). Além disso, o critério de diagnóstico da DC revisado no ano de 2012 pela Sociedade Européia de Gastroenterologia, Hepatologia e Nutrição Pediátrica (ESPGHAN) tornou facultativa a realização da biópsia intestinal em crianças nos casos em que apresentem valores de IgA-tTG dez vezes superior ao valor de corte (*cut off*) determinado pelo *kit* comercial de eleição(4).

Por isso, alguns estudos sugerem o uso de novos biomarcadores não invasivos para a DC no intuito de correlacionar o grau de lesão intestinal (atrofia vilositária) ou, até mesmo, a regeneração da mucosa por um simples exame sérico. Para constatação da destruição das vilosidades intestinais foi proposto a mensuração da proteína sérica IFABP (*Intestinal Fatty Acid Binding Protein* ou Proteína ligadora de ácidos graxos intestinal)(19–23) e para marcador da regeneração da mucosa intestinal, a proteína Reg1 α (*Regenerating Islet-derived 1 alpha* ou Regenerador derivados de ilhotas 1 alfa)(24).

Por causa dessa possibilidade de averiguar a atrofia da mucosa intestinal e a regeneração tecidual através de simples exame de sangue esta presente pesquisa pretende mensurar os biomarcadores IFABP e Reg1 α como biomarcador não

invasivo no intuito de auxiliar no diagnóstico da DC, especialmente nos casos de dispensa da biópsia intestinal, nos casos de pacientes com deficiência de IgA sérico, e , também, auxiliar os pacientes já diagnosticados como sendo DC para seguimento durante o curso do tratamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. DOENÇA CELIACA

A Doença Celíaca (DC) é uma enteropatia imunomediada elicitada pelo glúten presente nos cereais (trigo, centeio, cevada, aveia) causadores da inflamação crônica do intestino delgado (atrofia vilositária). Ocorre em indivíduos geneticamente predispostos, que podem apresentar espectros variados de manifestações clínicas(4,25).

A produção de cereais, principalmente o trigo, teve início no período Neolítico na região irrigada pelos rios Tigre, Eufrates e Nilo. A primeira descrição da DC é atribuída ao médico grego Arateus da Capadócia no Século II depois de Cristo que aponta a existência de diarreia e fezes com indício de má digestão e dor abdominal. Arateus ao descrever tais pacientes cita o termo *koiliakos*, derivado do grego *koelia* (abdômen). Porém a terminologia “afecção celíaca” foi então traduzida do grego para o inglês pelo médico Samuel Gee somente no final do Século IX(26,27). Apenas em meados do Século XX o pediatra holandês Willem Karel Dicke observou a melhora clínica significativa das crianças celíacas com exclusão de alimentos contendo esses cereais. Em 1953 Dicke com auxílio de Weijers e Van de Kamer identificaram a fração tóxica do glúten (gliadina) contida nos cereais(27–30).

Na mesma época, o surgimento de técnicas de obtenção de biópsias intestinais *per oral* viabilizou a realização de análise histopatológica da mucosa intestinal(27,31,32). Posteriormente, em 1962, as lesões intestinais da DC foram classificadas por Marsh conforme alterações estruturais e arquiteturas dos componentes da mucosa intestinal, tais como, aumento dos LIE (linfócitos intraepiteliais), hiperplasia de criptas e atrofia das vilosidades intestinais(33). Em 1969, a Sociedade Européia de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica (ESPGAN) recomendou o critério de diagnóstico da DC pela realização de três biópsias: uma no momento da suspeita clínica, outra após um ano em dieta sem glúten e a última após reintrodução do glúten na dieta no intuito de verificar o reaparecimento das lesões na mucosa intestinal(27,31,34). A prevalência da enfermidade constatada nessa época no ocidente era aproximadamente 1:135000 sendo considerada

comum especialmente entre crianças(35,36). As suspeitas clínicas recaíam em indivíduos com sintomas gastrointestinais clássicos, a saber, diarreia crônica, distensão abdominal, dor abdominal, fraqueza, constipação, flatulência, anorexia, perda de massa muscular, nádegas planas, esteatorreia, edema por hipoalbuminemia, irritabilidade, anorexia. Os pacientes portadores de DC com manifestações clínicas gastrointestinais são classificados, atualmente, como típico ou clássico(37–39).

No final dos anos 90, houve advento dos exames sorológicos de alta sensibilidade e especificidade para a DC(40,41). Como exemplo, exame sérico proposto por Chorzelski em 1983 que investigou a presença do anticorpo antiendomíseo detectado pela técnica de Imunofluorescência Indireta(40). Já a presença do anticorpo antitransglutaminase foi proposto por Dieterich, o qual detectou-o pelo teste ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* ou Ensaio Imunoenzimático)(41,42). Por causa dessas novas descobertas os critérios de diagnóstico da DC foram modificados, em 1990, pelo ESPGAN, que incorporou os exames sorológicos específicos para a DC como o IgA-EMA e IgA-tTG. Mas a biópsia intestinal continuava sendo considerada como padrão-ouro de diagnóstico da DC(40–42). A introdução dos testes sorológicos na detecção da DC modificou o cenário de reconhecimento desta afecção.

A prevalência da DC na população em geral, atualmente, é de aproximadamente 1%(43,44) e diagnosticada em qualquer faixa etária(45–47). A predominância significativa ocorre entre caucasianos(48) e três vezes mais frequente entre mulheres(49,50). A maior prevalência de DC (5,6%) foi encontrada entre as crianças Saharawi provenientes Saara Ocidental(51). No Brasil, a prevalência varia entre 1:214 a 1:681(52–55).

Os exames séricos IgA-EMA e IgA-tTG propiciaram a detecção de pacientes portadores de DC com manifestação clínica variada além do tipo típico ou clássico, tais como, o tipo denominado atípico que pode envolver outros órgãos e sistemas e/ou estar associado a outras comorbidades; o tipo silencioso que não apresenta nenhuma suspeição da enfermidade; e o tipo potencial que não apresenta atrofia vilositária nem infiltrado inflamatório(56–59). Por causa do grande espectro das manifestações clínicas da DC ficou evidente que o diagnóstico da DC era maior em

alguns grupos do que em outros. Logo, a prevalência da DC foi estratificada e comparada a um *iceberg* celíaco (Figura 1)(37,60,61). Todas as camadas subdivididas e estratificadas representam os diferentes tipos de manifestações clínicas da DC. São, geralmente, detectados em rastreamentos sorológicos, apresentam sorologia positiva para a DC e alelos HLA predisponente (*Human Leukocyte Antigen* ou Antígeno Leucocitário Humano), mas nem todos apresentam atrofia vilositária como no caso da apresentação clínica tipo potencial (última camada do *iceberg* celíaco)(62–67).

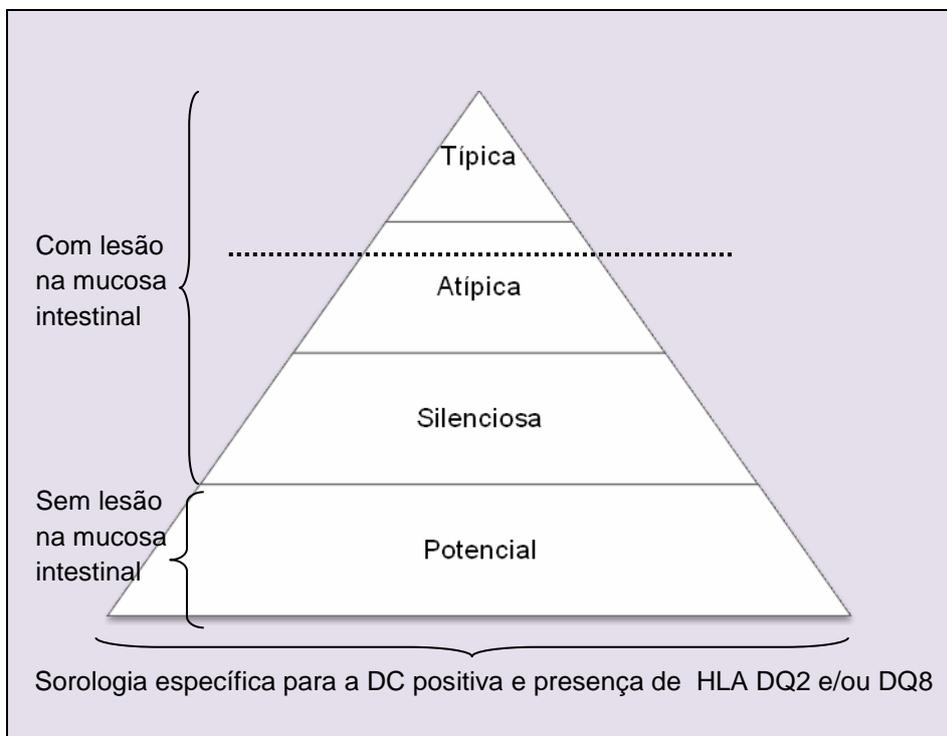


Figura 1 – Modelo do *iceberg* celíaco.

Fonte: adaptação de Lionetti & Catassi, 2011(61)

A porção do iceberg observada acima da linha d'água representa pacientes com a manifestação clínica conhecida como típica ou clássica em que sintomas gastrointestinais evidentes conduzem ao diagnóstico da DC. Já na segunda porção, situada próximo da linha d'água estão representados os pacientes com característica clínica do tipo atípico que apresentam algum indício que leve à suspeição da DC com presença ou não de distúrbios gastrointestinais(64,68–72).

No caso da apresentação clínica atípica, a DC pode estar associada a síndromes genéticas (Down, Williams, Turner)(73,74); a desordens autoimunes (Diabetes Mellitus tipo 1, tireoidite autoimune, hepatite autoimune, alopecia areata)(57,75); a deficiência de Imunoglobulina A(76,77); a dermatite herpetiforme(58,78), a ataxia(68,79), a anemia resistente ao tratamento(80,81), a epilepsia de difícil controle(82–84), a defeitos de desenvolvimento do esmalte dentário(85,86), osteoporose(87), infertilidade em mulheres e, também, em homens(88–91), abortos de repetição(92), atraso no desenvolvimento pondero-estatural(62,93), câncer intestinal(94,95), entre outros(96–98). Por conseguinte, notou-se maior prevalência entre esses grupos, que passaram a ser considerados grupos de risco para a DC(17,78,99–102).

A extensa base submersa abrange os casos complexos de serem reconhecidos como o tipo denominado silencioso, que representa pacientes assintomáticos ou quase sem indicativo de problema de saúde. São pacientes detectados, principalmente, por serem parentes de pacientes com DC e, geralmente, são solicitados exames séricos específicos para a DC por conta do risco genético(44,68,102–107).

A descoberta do envolvimento da susceptibilidade genética, no final da década de 1990, através dos alelos HLA predisponente do tipo DQ2 (DQA1*0501, DQB1*0201) e/ou DQ8 (DQA1*0301 e DQB1*0302)(39,102,108–110) evidenciou a necessidade de rastreamento entre parentes de primeiro grau, cuja prevalência varia de 4,8% a 20%(44,103,104,111). Entre gêmeos univitelínicos o risco aumenta para 75%(44,103,104,111). Apresentar gene predisponente não significa necessariamente apresentar a afecção, pois aproximadamente 40% da população mundial possui alelos HLA predisponentes, mas apenas 1% dos portadores dos genes são reconhecidos como DC(43,44,47,112). Entre os pacientes DC a maioria (entre 90 a 95%) possuem o heterodímero DQ2 e o restante (5 a 10%) o heterodímero DQ8 ou um dos alelos do DQ2(108,113–115).

Em meados de 1970, a DC foi associada à ação imunomediada pelos linfócitos T perante a presença do glúten na lâmina própria(116,117). O enigma imunológico, desde então, vem sendo desvendado através de pesquisas com as

frações tóxicas do glúten, mediadores químicos, permeabilidade intestinal, e aumento de linfócitos intraepiteliais (LIE)(61,118–120).

O glúten, segundo *Codex Alimentarius*(121), é o nome genérico dado a um complexo proteico formado pela união de duas frações: glutenina e prolamina presentes nos cereais como trigo (gliadina), cevada (hordeína), centeio (secalina) e aveia (avenina)(122–124), de modo que a interação estrutural forma uma malha proteica que confere propriedades viscoelásticas dos alimentos(125–127). Mas após ingestão do glúten alguns peptídeos ainda resistem à ação de enzimas digestivas e se tornam tóxicas para pacientes DC(124,128–130).

Na fisiopatologia da DC (Figura 2; linha tracejada), o glúten gera um desequilíbrio imunológico capaz de induzir o aumento da permeabilidade intestinal propiciando maior acesso das toxinas (glúten) para a lâmina própria(131).

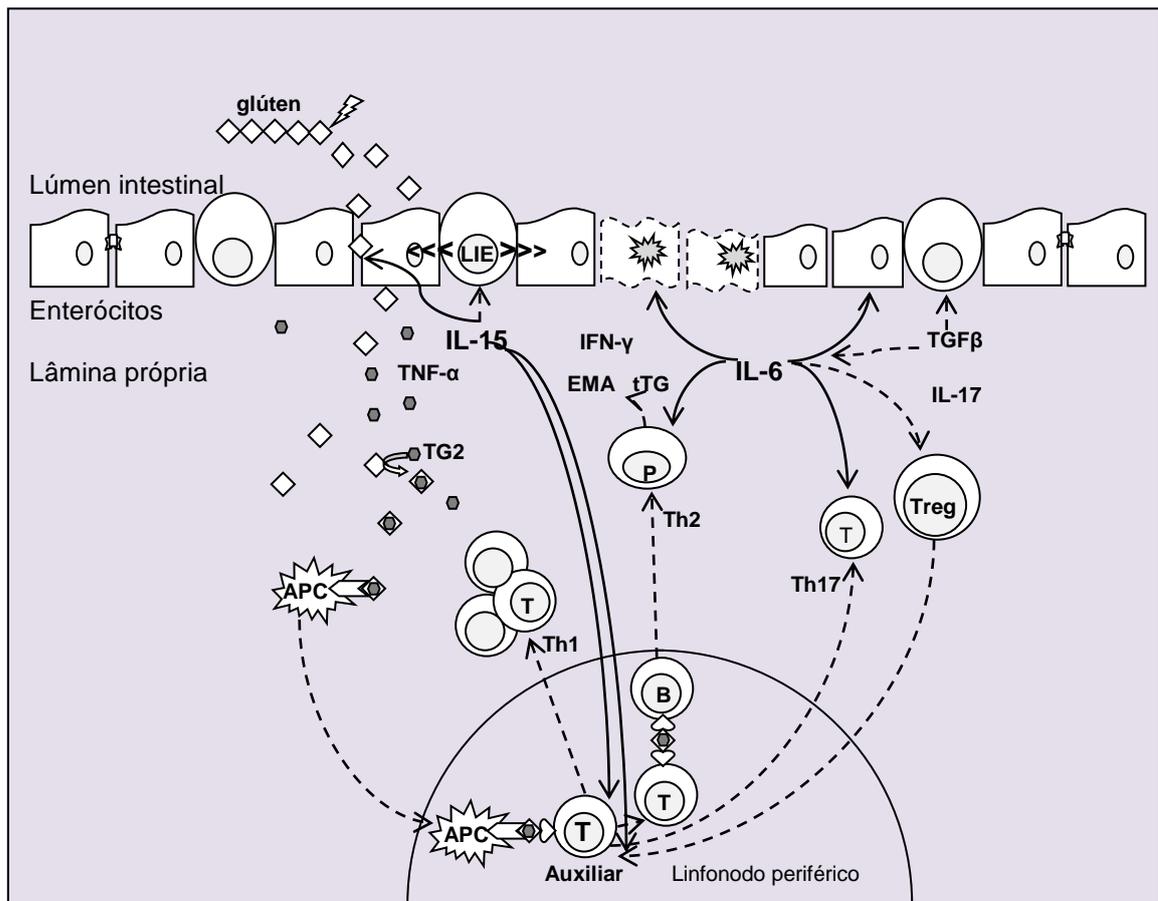


Figura 2 – Fisiopatologia da DC

Alguns fatores ambientais, além da presença do glúten, podem fomentar a permeabilidade intestinal como as infecções bacterianas, virais ou mesmo alergias alimentares(132,133). O aumento da permeabilidade pode contribuir para iniciar o estágio próinflamatório no epitélio intestinal, induzir a perda da integridade do epitélio juncional e facilitar a transposição do peptídeo do lúmen intestinal para a lâmina própria(120,134–140).

O glúten presente na lâmina própria sofre ação da enzima TG2 (Transglutaminase tecidual tipo 2)(130,141), a qual exerce um papel crucial no desencadeamento da DC. A TG2 catalisa o glúten pelo processo denominado desamidação formando o complexo glúten/TG2, um substrato antigênico reconhecido pelo sistema imune, que posteriormente é capturado por célula apresentadora de antígeno (APC) presente na lâmina própria(118,130,141–143).

Na verdade, essa apresentação do complexo capturado (glúten/TG2) ocorre em associação com as moléculas dos alelos HLA predisponente (DQ2 e/ou DQ8) formando assim um conjunto glúten/TG2/HLA(108,144–146). E, desta maneira, a cascata inflamatória citada até então desencadeia todo o processo inflamatório da DC(118,128,130,147–150) pela indução de algumas respostas inflamatórias como Th1 (Células Tauxiliares da imunidade celular tipo 1), Th2 (Células T auxiliares da imunidade humoral tipo 2), Th17 (Células T auxiliares tipo 17)(147,149,151–153).

Na via Th1 ou via efetora Th1 ocorre a migração dos linfócitos TCD4 efetores (linfócito TCD4 auxiliar ativado) para a lâmina própria, onde sofrem expansão clonal. E essas células TCD4 ativadas ao serem induzidas, principalmente, pela interleucina 15 produzem outras citocinas inflamatórias, tais como, citocina TNF- α (*Tumor Necrosis Factor alpha* ou Fator de necrose tumoral alfa), INF- γ (Interferon gama) e IL-17, as quais em conjunto desestabilizam a matriz de sustentação e intensificam a inflamação local(130,151–160).

A IL-17 auxilia a estimular a via efetora Th17 sendo que esta, quando específica contra o glúten, produz citocinas próinflamatórias INF- γ , IL-21 e a citocina reguladora TGF- β (*Transforming Growth Factor Beta* ou fatores transformadores do crescimento beta), que tem propriedade anti-inflamatória (152,153).

Na via efetora Th2 os linfócitos TCD4 induzem a ativação dos linfócitos B ou linfócitos TCD8 nos linfonodos mesentéricos, e esses uma vez ativados migram para lâmina própria diferenciando-se em plasmócitos secretores de anticorpos como o antiendomísio e também os autoanticorpos contra a enzima TG2 (Antitransglutaminase tecidual). Essa via promove a deposição de anticorpos na lâmina própria, que cooperam com a estimulação de células inflamatórias para secretarem citocinas próinflamatórias e perpetuando assim o dano tecidual intestinal(61,120,130,155,161).

Em contraste, a TGF- β é um dos responsáveis pela manutenção do equilíbrio homeostático dos LIEs. Nesse contexto, a IL-6 pode atuar junto com a TGF- β e induzir as células T reguladoras (Treg) a controlarem as vias Th1, Th2, Th17 para favorecerem de forma indireta a regeneração tecidual em busca da homeostase intestinal(38,61,118,120,137,141,153,162–166).

A produção de citocinas secretadas por várias células envolvidas com o infiltrado inflamatório crônico estimula a migração dos linfócitos das adjacências para a lamina própria, passando a ser denominados linfócitos intraepiteliais (LIE). Os LIE passam a entremear os enterócitos, desta maneira, estão estrategicamente localizados como sentinelas infiltradas na barreira epitelial com objetivo de manter a integridade epitelial e prevenir a invasão de patógenos(167). Na DC ativa, os LIE estão presentes em maior número: acima de 30 LIE a cada 100 enterócitos(3).

Os enterócitos também contribuem com a produção de citocina próinflamatória, a IL-15, que pode ser considerada como um dos principais mediadores químicos relacionados com a DC mesmo em cooperação com outras citocinas(162,168). Na verdade, a IL-15 é expressa em pequena quantidade pelo enterócito em condições normais, entretanto ocorre aumento significativo de produção conforme estímulo inflamatório crônico recebido. Como consequência, a IL-15 desencadeia a cascata imunológica que afeta outros tipos de células, tais como, célula apresentadora de antígenos (APC), célula T efetora e LIE. As citocinas atuam em conjunto e contribuem para incrementar a resposta imune adaptativa da DC(61,119,162,169,170).

A ação citotóxica da IL-15 não é exclusivamente e especificamente desencadeada pela presença do glúten. Na verdade, possui uma ação genérica de

reconhecimento dos estímulos de estresse imunológico local(120,168,171). Na DC avançada, a permanência constante da citocina IL-15 pode levar à ativação descontrolada dos LIE inclusive promovendo eventualmente complicações severas como a produção de células précancerígenas(25,155).

Na DC, os LIEs perante agressão constante do glúten e presença de IL-15, expressam os receptores de célula NKG2D e NKG2C, que reconhecem respectivamente os ligantes do enterócito o HLA-E e o MICA(167,172,173). A união dos receptores dos LIEs ao dos enterócitos habilita os LIEs a promoverem a morte celular programada dos enterócitos pela via apoptótica extrínseca (perforin-granzime)(163,167,172,173).

A persistência do estímulo nocivo favorece a instalação do quadro inflamatório crônico e, desta forma, corrobora para aumentar ainda mais a permeabilidade intestinal, fato que corrobora com maior acesso do glúten na lâmina própria. Estabelece-se desta forma um círculo vicioso que fomenta ainda mais a atrofia das vilosidades intestinais(167,174–180).

Na DC apenas a retirada total do glúten da dieta pode reinstaurar a completa homeostase imunológica. Sendo que no intestino saudável os LIEs expressam os receptores inibitórios CD94/NKG2A que se ligam a receptores MICB dos enterócitos(168,171,175,181).

Todos os mecanismos supra citados levam a uma maior ou menor destruição das vilosidades. Os diferentes níveis lesionais das vilosidades foram inicialmente classificadas por Marsh em 1992(33), sendo sua classificação posteriormente revisada em 2000 por Oberhuber(182).

Esse último autor subclassificou o estágio Marsh 3 em três novos estágios conforme o grau de atrofia das vilosidades da fase destrutiva da DC: Marsh-Oberhuber 3a com destruição incipiente das vilosidades; Marsh-Oberhuber 3b com destruição parcial; e Marsh-Oberhuber 3c com destruição total das vilosidades, mas tecido ainda hipertrófico e infiltrado por LIE.

E por último, Marsh-Oberhuber 4 com atrofia total das vilosidades, LIE em quantidade normal, criptas sem hiperplasia, e diferente da fase destrutiva o tecido apresenta-se, desta vez, hipotrófico (Figura 3).

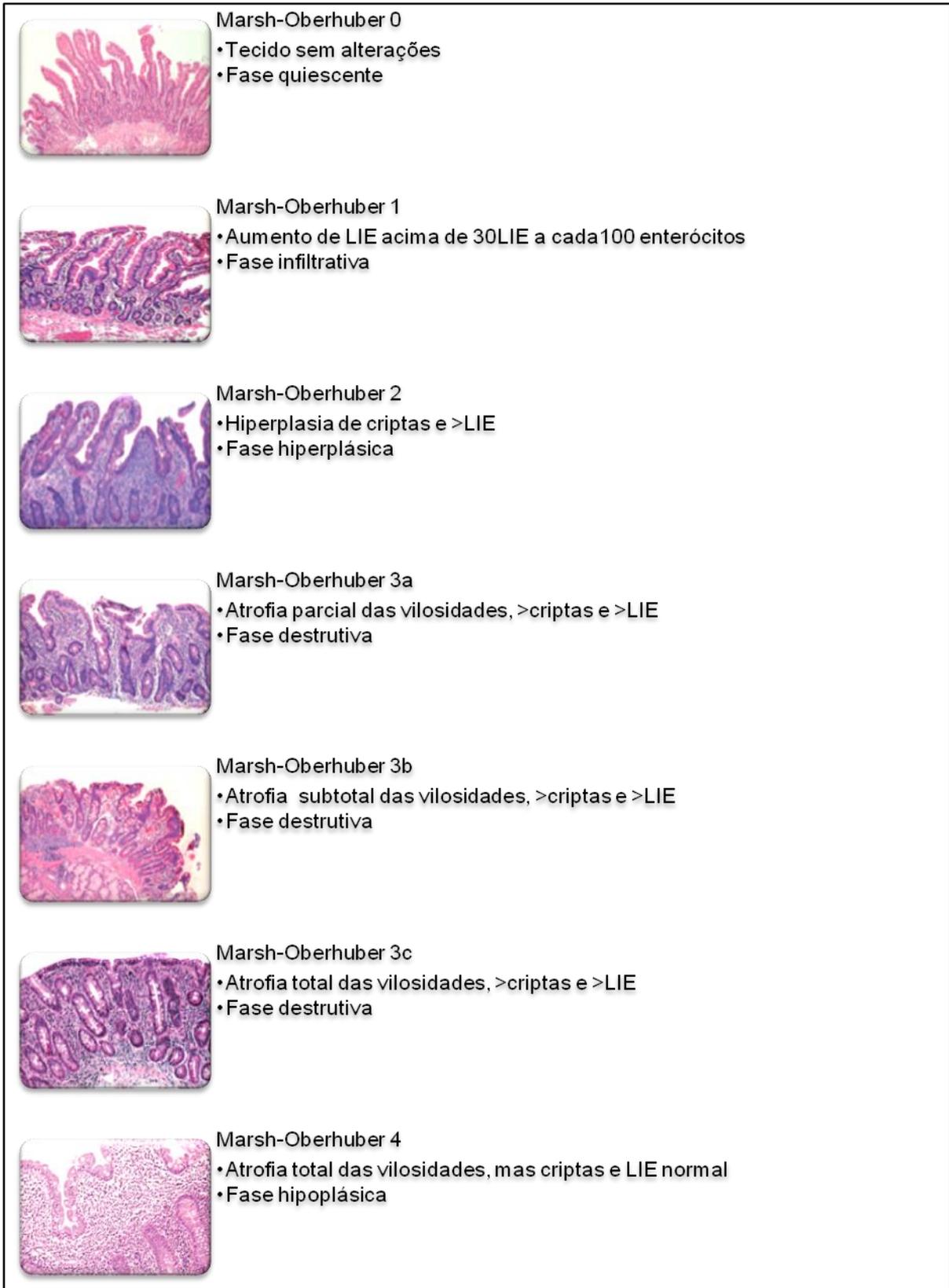


Figura 3 – Sistema de classificação histológica de Marsh-Oberhuber.

Fonte: Adaptação de (18,33,182–186)

A análise histológica do intestino delgado é geralmente considerada como padrão-ouro para o diagnóstico. No entanto, no último consenso da ESPGHAN em 2012(4) considera-se que caso crianças apresentem o nível de anticorpos IgA-Antitransglutaminase dez vezes superior ao *cut off* estabelecido pelo *kit* comercial utilizado pode-se ter a opção de dispensar a biópsia(4,8,118,187), pois a alteração da arquitetura intestinal não é exclusivo da DC(133) e outros fatores infecciosos ou quadros de alergia alimentar podem acarretar em atrofia vilositária(188,189).

O diagnóstico da DC é essencial para prevenir a morbidade e a possível mortalidade associada à exposição prolongada ante o glúten(190). De acordo com a diretriz proposta pela ESPGHAN de 2012(4) para o diagnóstico definitivo de DC é necessário preencher ao menos quatro critérios de cinco itens descritos a seguir:

- 1) Apresentar sinais e sintomas típicos da DC;
- 2) Exame sorológico positivo de anticorpos IgA-tTG e IgA-EMA,este último considerado Valor Preditivo Positivo(18,191);
- 3) Ter alelos predisponentes: tem Valor Preditivo Negativo(192,193), especialmente HLA-DQ2 e/ou DQ8;
- 4) Biópsia com atrofia vilositária;
- 5) Responder à dieta livre de glúten com melhora clínica.

Conseqüentemente, o diagnóstico definitivo para a DC pode demandar longo período de acompanhamento clínico, laboratorial e nutricional após o início do tratamento(194) até preencher os critérios de diagnóstico conforme critérios sugeridos pela ESPGHAN do ano de 2012(4).

O único tratamento efetivo para a DC é a exclusão do glúten de forma definitiva da dieta, que deverá ser mantida ao longo da vida(4,28). No caso do tratamento ser realizado de forma correta, o mesmo promove a cicatrização tecidual pela renovação das células epiteliais intestinais, a melhora dos sintomas e a normalização dos níveis séricos IgA-tTG e IgA-EMA(195).

A diretriz de diagnóstico e conduta clínica estipulada pela ESPGHAN em 2012(4) sugere monitoramento sorológico através de realização de exames como o IgA-tTG e IgA-EMA em seis meses a um ano após o início do tratamento(196). No entanto, esses marcadores séricos não indicam o grau e a qualidade da

regeneração do tecido intestinal. Em decorrência, disso frequentemente é efetuada nova biópsia de tecido intestinal, processo relativamente invasivo.

Como já anteriormente citado, existem vários estudos propondo a realização de testes laboratoriais para a detecção da expressão das proteínas séricas IFABP(19–22) e Reg1 α (24) como método não invasivo de monitoramento que permitiria fazer uma correlação entre o seu nível sorológico e o grau de atrofia vilositária. Também foi sugerida a sua possível utilização como meio de acompanhamento da efetividade do tratamento permitindo a eventual detecção de transgressões na dieta(19,24,197). Adicionalmente, esses testes também poderiam ser usados como meio auxiliar no diagnóstico e acompanhamento de pacientes com deficiência de IgA sérica(24,197), pois esses pacientes apresentam maior prevalência de DC, tornando-se dependentes de testes baseados na análise de anticorpos IgG, de menos sensibilidade, para seu diagnóstico(198,199).

2.2. NOVOS BIOMARCADORES PROPOSTOS

2.2.1. *Intestinal Fatty Acid Binding Protein (IFABP)*

A proteína IFABP (*Intestinal Fatty acid binding protein* ou proteína ligadora de ácidos graxos intestinal) é expressa pelo gene que se localiza no cromossomo 4q28-q31 e faz parte da família das proteínas ligadoras de ácidos graxos. Trata-se de uma proteína intracelular de baixo peso molecular (14-15 kilodaltons) confinada no citoplasma dos enterócitos das vilosidades intestinais(200–203). A nomenclatura foi registrada no HUGO *Gene Nomenclature Committee* (HGNC) e o símbolo oficial aprovado como Fatty Acid Binding Protein 2, Intestinal ou Proteína Ligadora de Ácidos Graxos 2, intestinal (HGNC_ID: 3556).

Ainda não está bem esclarecida a função das famílias de proteínas FABP, mas acredita-se que estas participem de diversos processos biológicos tais como: auxiliar o transporte de ácidos graxos para compartimentos intracelulares, promover a oxidação dos peroxissomos nas mitocôndrias, regular a atividade citosólica das enzimas e controlar a via de transcrição(204).

A IFABP foi inicialmente identificada por Ockner & Manning em 1974(205) que evidenciaram sua expressão em enterócitos do intestino delgado. A IFABP é abundante no citosol dos enterócitos(202) e participa no metabolismo do triacilglicerol oriundo da dieta, auxiliando tanto no transporte do triacilglicerol para interior da célula quanto na indução da sintetização do quilomícron(206,207).

A detecção sérica da proteína IFABP sugere injúria tecidual do epitélio intestinal(208–211). Consequentemente, níveis elevados dessa proteína poderiam ser utilizados como biomarcadores, antes de realizar exames invasivos, onerosos e morosos com intuito de facilitar a tomada de decisões clínicas(211–213).

Outra possível aplicação clínica é a avaliação da possível presença de anormalidades histológicas em pacientes já diagnosticados com doença celíaca, desde que os níveis de IFABP correlacionam-se com relativa precisão com o grau de maior ou menor atrofia vilositária(19–23,214,215).

2.2.2. *Regenerating Islet-derived 1 alpha (Reg1α)*

A proteína denominada *Reg1α (Regenerating Islet-derived 1 alpha* ou regenerador derivado de ilhotas 1 alfa) pertence à família das proteínas codificadas pelo gene REG regenerador (*Regenerating Gene* ou gene regenerador) codificada no cromossomo 2p12 e expressa no tecido pancreático e no intestino delgado(216,217). A sua participação na regeneração intestinal e na qualidade do tecido foi demonstrada em estudo feito em ratos geneticamente modificados(218). Trata-se de um membro do grupo da proteína lectina tipo-C denominado grupo REG ou grupo VII(219). A nomenclatura registrada no HGNC com o símbolo oficial aprovado *Regenerating Islet-derived 1 alpha* ou Regenerador derivado de ilhotas 1 alfa foi de REG1A ou Reg1α (HGNC_ID: 9951).

A proteína Reg1α foi identificada e teve seus amino ácidos sequenciados em vários estudos de observação do processo de reorganização tecidual nas ilhotas de Langerhans após uma injúria ocorrida tanto em humanos como em experimentos envolvendo ratos(220–226). A Reg1α é conhecida por vários outros sinônimos, tais

como *lithostatine-1-alpha protein-X*, *litostatine 1 alpha*, *pancreatic thread protein*, *pancreatic stone protein* e outros(227).

A participação da família da proteína REG na homeostase celular atua como um agente auxiliar anti-inflamatório, anti-apoptótico e mitogênico(217,228). Existem várias técnicas de detecção da proteína, tais como, *PCR (Polymerase Chain Reaction* ou reação de polimerase em cadeia), imunohistoquímica, ou teste ELISA. Essas técnicas permitem estudos principalmente focando a proliferação e diferenciação de diversos tipos celulares(223,229).

E sendo a Reg1 α expressa nos tecidos na vigência de diferentes patologias foi sugerido seu uso clínico como biomarcador em casos como tumor gástrico(230–232); da doença de Alzheimer(233); do diabetes mellitus tipo 1(234,235) e da síndrome de Sjögren(236).

A expressão da Reg1 α é aumentada no duodeno em indivíduos com a DC ativa, ou seja, pacientes com atrofia vilositária como consequência de consumo frequente de glúten(197). A proteína Reg1 α é expressa na lâmina própria no intuito de reduzir a apoptose celular e contribuir com a regeneração da mucosa intestinal(237), pois o aumento de citocinas resultantes do processo inflamatório (apoptose) induz a regeneração tecidual e expressão de Reg1 α (238).

Por este motivo a análise sérica da Reg1 α tem sido indicada como biomarcador não invasivo para avaliação da atrofia vilositária característica da DC, substituindo eventualmente a realização de endoscopia digestiva alta (4,24,197).

Observou-se a correlação entre o nível sérico da proteína Reg1 α com o grau de atrofia vilositária nas biópsias duodenais entre pacientes DC ativos (consomem glúten) e a redução de expressão da proteína após estabelecimento do tratamento e normalização dos anticorpos séricos da DC (IgA-tTG e IgA-EMA)(24).

3. OBJETIVO

3.1. PRINCIPAL

Avaliar os níveis séricos de IFABP e Reg1 α em pacientes DC ao diagnóstico e após a obtenção de resultados negativos nos testes sorológicos IgA-tTG e IgA-EMA com a dieta isenta de glúten.

3.2. SECUNDÁRIOS

- 3.2.1. Correlacionar os níveis séricos de IFABP e Reg1 α ao diagnóstico e conforme o tempo de dieta livre de glúten.**
- 3.2.2. Verificar a associação entre o exame sérico de IFABP e de Reg1 α dos pacientes DC ao diagnóstico com os exames de biópsia intestinal pela classificação de Marsh-Oberhuber 3 estratificados.**
- 3.2.3. Verificar o desempenho dos biomarcadores séricos IFABP e Reg1 α como possível indicativo da lesão da mucosa intestinal em pacientes DC.**
- 3.2.4. Verificar o efeito do tratamento pela dieta livre de glúten nos pacientes DC ao diagnóstico pela análise de IFABP e de Reg1 α .**

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1. DELINEAMENTO

Este é um estudo observacional analítico de coorte retrospectivo e visa determinar níveis séricos dos biomarcadores IFABP e Reg1 α em pacientes DC em diferentes estágios da doença: nas ocasiões do diagnóstico (consumiam glúten) e do seguimento da DC em pacientes em tratamento (não consomem glúten), esse último na condição de apresentar sorologia negativa para marcadores IgA-tTG e IgA-EMA.

4.2. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi respaldado pelo parecer emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (CEP/UnB) sob o registro de 552.566 de 05/02/14 em conformidade com a lei federal 466/12 (Anexo I) e de acordo com os princípios éticos acordados na declaração de Helsinque de 2013(239). Todos os pacientes participantes da pesquisa assinaram o Termo Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Apêndice I) e responderam ao formulário de interesse da pesquisa (Apêndice II).

4.3. AMOSTRAGEM

A amostragem estatisticamente representativa com 95% de confiança foi determinada em $n=55$ para cada grupo de estudo formado por pacientes DC atendidos no Ambulatório de Doença Celíaca do Hospital Universitário de Brasília (AmbDC/HUB).

4.4. IMPLEMENTAÇÃO DA PESQUISA

Pela análise de dados secundários registrados no Laboratório de Pesquisas em Doença Celíaca na Faculdade de Medicina na Universidade de Brasília (LabDC/UnB) foram identificados os pacientes DC com mais de um ano de diagnóstico. Apesar da orientação dada aos pacientes e/ou seus responsáveis de retornarem ao AmbDC/HUB ao menos uma vez ao ano para acompanhamento clínico nem todos comparecem. Por este motivo os pacientes DC considerados ausentes foram contados e convidados a comparecer no AmbDC/HUB.

Os pacientes DC frequentadores habituais do AmbDC/HUB e os que atenderam ao chamado foram inicialmente encaminhados para atendimento clínico multidisciplinar. Mas apenas os pacientes DC aos quais foram requisitados os exames sorológicos de seguimento da DC (análise de anticorpos IgA-tTG ou IgA-EMA) foram abordados e convidados a participar da pesquisa.

Na sequência, após esclarecimento acerca da pesquisa, o paciente consentia o uso das amostras de sangue colhidos em duas ocasiões distintas. Consentia o uso da amostra de sangue colhida para avaliação do seguimento da DC, sendo o paciente denominado neste estudo como “DC-GFD” (não consome glúten). Consentia, também, o uso da amostra de sangue colhida na época em que foi diagnosticado para DC armazenada no biorepositório do LabDC/UnB, sendo o paciente referenciado como “DC-glúten” (consumia glúten). Desta forma, foi possível obter informações quanto à sua adesão ao tratamento e, também, quanto ao histórico acerca do diagnóstico. Os pacientes participantes foram triados de acordo com os critérios de inclusão e de exclusão estabelecidos pelo estudo.

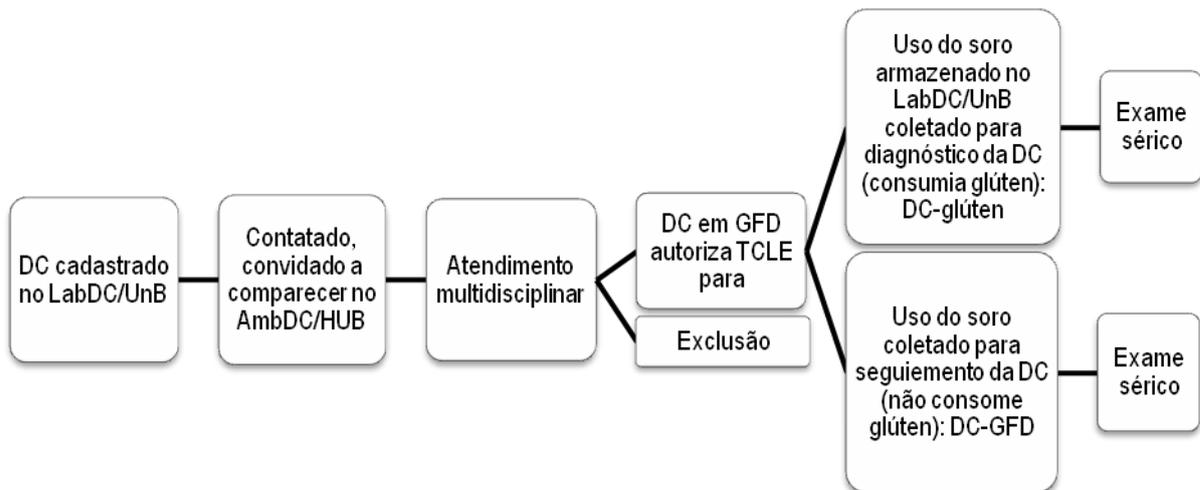
4.4.1. Critérios de Inclusão

Foram convidados a participar da pesquisa os pacientes de DC do AmbDC/HUB que tenham realizado biópsia intestinal na ocasião do diagnóstico da DC e estejam em tratamento há mais de um ano de atendidos desde dezembro 1998 a dezembro de 2015.

4.4.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídos os indivíduos que apresentaram outras doenças autoimunes, sepse, degeneração neural, câncer, doença inflamatória intestinal, usuários de medicações contendo princípios ativos como a tiazolidionas, a olmesartana.

4.5. FLUXOGRAMA DA PESQUISA



DC: Doença celíaca; GFD: *gluten free diet* ou dieta livre de glúten; TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido.

4.6. SUJEITOS DA PESQUISA

Ao todo 55 pacientes participaram da pesquisa (Tabela 1). Sendo 55 pacientes DC ao diagnóstico (DC-glúten) (14 masculino e 41 feminino; idade entre 1 a 65 anos, média de idade: $24,7 \pm 17,6$), e outro grupo emparelhado formado pelos mesmos 55 pacientes DC na ocasião em que se encontravam com um ano ou mais em tratamento com a dieta livre de glúten (DC-GFD) (14 masculinos e 41 femininos; idade entre 6 a 68 anos, média de idade: $29,5 \pm 16,3$). Os pacientes em dieta sem glúten não realizaram biópsia intestinal.

Tabela 1 – Pacientes participantes da pesquisa.

Pacientes	N	Sexo (M/F)	Idade (anos)
DC-glúten	55	14/41	24,7±17,6
DC-GFD	55	14/41	29,5±16,3
Total de amostras	110	28/82	

DC: doença celíaca; GFD *gluten free diet* ou dieta livre de glúten; M: masculino; F: feminino.

4.7. COLETA, ARMAZENAMENTO, BUSCA DE SORO ESTOCADO E PROCESSAMENTO DO MATERIAL

Foram feitas as coletas de aproximadamente 3 mL (mililitros) de sangue venoso em tubo com gel separador realizadas pela equipe de técnicos de laboratório do próprio HUB (Hospital Universitário de Brasília) em ambiente hospitalar com materiais descartáveis conforme a resolução da norma técnica de RDC/ANVISA Nº302/2005, que trata sobre coleta, transporte e processamento laboratorial de amostras de sangue.

Foi efetuada a coleta de amostragem dos pacientes participantes da pesquisa no período entre março de 2014 a dezembro de 2015 atendidos no AmbDC/HUB. Após a coleta, foram processados no LabDC/UnB e o soro obtido pela centrifugação a 4500 rotações por minuto (rpm) durante 5 minutos (min) foi estocado a aproximadamente 2°C (graus Celsius) no LabDC/UnB para posterior realização dos testes sorológicos.

Os soros dos respectivos pacientes colhidos na época em que diagnosticaram a DC e apresentaram IgA-EMA positivos estavam armazenados, devidamente aliquotados, estocados, congelados, e identificados no biorepositório do LabDC/UnB à temperatura média de 34°C negativos de modo a permitir o manuseio e utilização posterior para análise suplementar.

4.8. ANÁLISE SOROLÓGICA

4.8.1. Análise de Anticorpos IgA-EMA

Utilizou-se o teste de imunofluorescência indireta para detectar a presença de anticorpos da classe IgA-antiendomísio seguindo as recomendações do fabricante usando o *kit* comercial QUANTA Lite® Endomysial (primate distal Esophageous) Slide, INOVA Diagnostics, Inc. San Diego, CA, USA. As lâminas histológicas utilizavam substratos com secções criostáticas com 4 micrômetros (μM) de espessura da porção distal do terço inferior do esôfago de primata (*Cebus Apella*) sensibilizadas com antígeno endomísio específico para a DC (Figura 4).

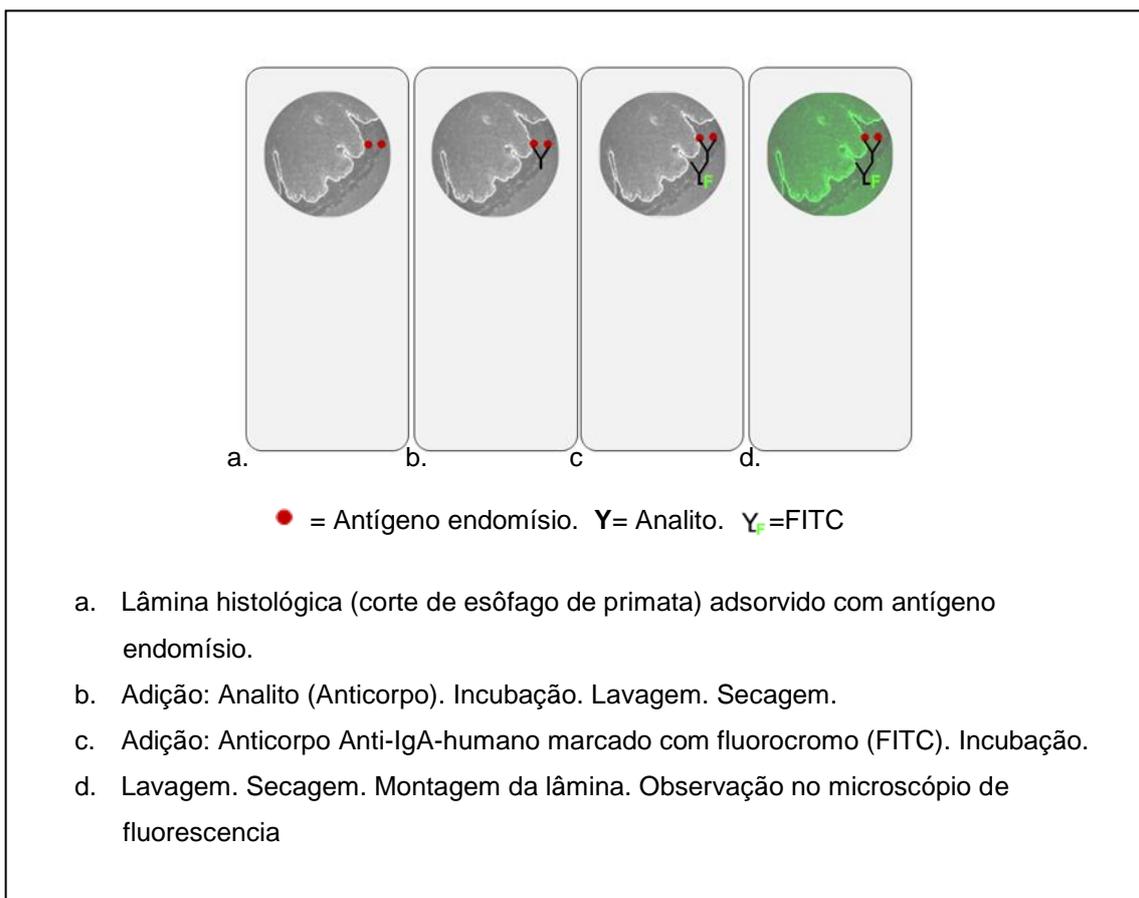


Figura 4 – Método imunofluorescência indireta para detecção de IgA-EMA.

Utilizou-se amostras de 40 microlitros (μL) de soro diluído a 1:5 em solução de PBS (*Phosphate Buffered Saline* ou Tampão fosfato-salino) com pH 7,2 e incubado em lâmina por 30 min em câmara úmida à temperatura ambiente (15 a 30°C). Lavou-se posteriormente por 3 vezes com tampão PBS por meio de esguichos utilizando pipeta Pasteur e incubadas no mesmo tampão por 5 min. Imergindo-as numa cuvete, seguido de uma repetição de lavagem em nova solução tampão.

A seguir pipetou-se 30 μL do anticorpo de detecção anti-IgA humano marcado com fluorocromo Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) usando *kit* comercial (Biosystems, Barcelona, Spain) adicionado a cada poço previamente incubado com soro humano, e novamente incubava-se em câmara úmida por 30 min. Seguido de lavagem com tampão PBS como descrito anteriormente.

Após a secagem e montagem com lamínula analisou-se em microscopia de fluorescência no microscópio Zeiss Axiophot 2 com filtro de excitação de 450nm a 490nm e emissão de 520nm (Aumento: 400x).

A análise foi feita por dois observadores de forma independente. Considerou-se o resultado como negativo (Figura 5A) a ausência de fluorescência nos espaços do tecido conjuntivo e a reação positiva (Figura 5B) quando a fluorescência de cor verde brilhante em forma de rendilhado ou favo de mel fosse observada entre as miofibrilas da musculatura lisa (endomísio) em diluições $\geq 1:5$.

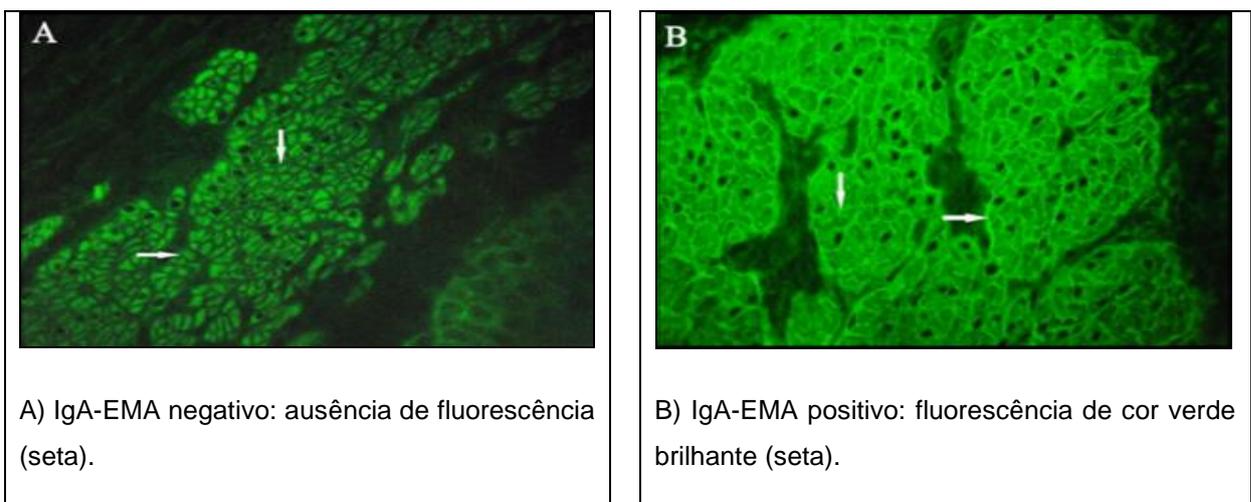


Figura 5 – IgA-EMA negativo (A) e positivo (B).

Fonte:Figura gentilmente cedida pelo LabDC/UnB

4.8.2. Análise de Anticorpos IgA-tTg

A presença de anticorpos IgA-tTG no soro dos participantes foi mensurada pelo método ELISA indireto usando *kit* comercial (QUANTA Lite® h-tTG IgA ELISA, INOVA Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA). A análise foi feita seguindo recomendações do fabricante e em temperatura ambiente (20 a 26°C) como descrito na sequência (Figura 6).

Utilizou-se as amostras de soro dos pacientes em diluição 1:100 em PBS com o pH 7,2 e homogeneizados em agitador mecânico. Colocou-se 100 µL de soro diluído no seu respectivo poço, dentre os 96, na placa de poliestireno sensibilizado com transglutaminase tecidual humano e incubou-se por 30 min. Após este procedimento, realizou-se o ciclo de três lavagens automatizadas da placa com 300µl de tampão de lavagem (tampão fosfato com 0,05% de Tween 20). Na sequência, 100µL de anticorpo de detecção do IgA anti-humano, anti-anticorpo conjugado HRP (de cabra) marcado com uma peroxidase, foi adicionado a cada orifício, incubados por 30 min e lavados como descrito anteriormente.

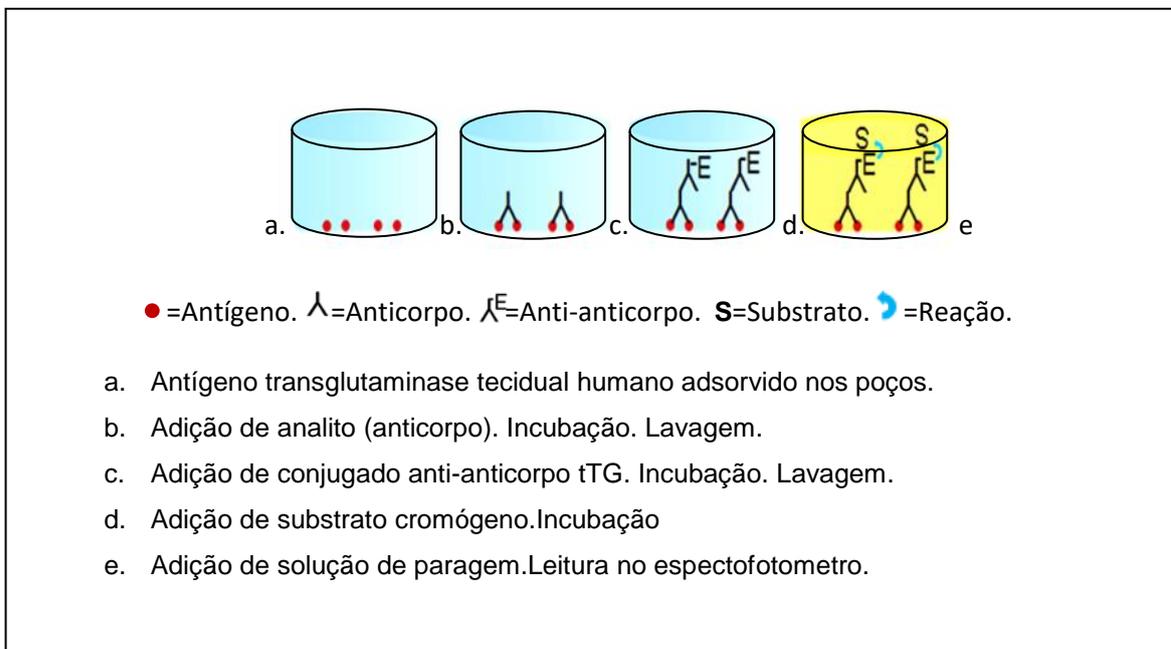


Figura 6 – Método imunoenzimático ELISA indireto para IgA-tTG.

Para a revelação da reação, adicionou-se 100 µl da solução de substrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB 3,3,5,5') com peróxido de hidrogênio a cada poço e incubados por 30 min no escuro e em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico 0,334 molar (H₂SO₄) e a leitura realizada no espectrofotômetro por meio de filtro de 450 nanômetros (nm).

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

4.8.3. Análise da Proteína IFABP

A presença da expressão da proteína IFABP no soro dos participantes foi mensurada em triplicata pelo método ELISA competitivo usando *kit* comercial (MyBioSource® Human Intestinal Fatty Acid Binding Protein – IFABP) ELISA *kit*, MyBioSource Inc., San Diego, CA, USA) descrita na Figura 7.

A análise foi feita seguindo recomendações do fabricante como descrito a seguir: Adicionou-se 100µL de PBS no Branco. Nos demais poços da placa de poliestireno sensibilizado com anticorpo h-IFABP (*Human Intestinal Fatty Acid Binding Protein Antibody* ou anticorpo anti-IFABP humano) adicionou-se 100µL de seis soluções destinadas como calibradores de curva com valores de: 0pg/mL, 100pg/mL, 250pg/mL, 500pg/mL, 1000pg/mL e 2500pg/mL nos poços indicados pelo *kit*. Após essa etapa, acrescentou-se 100µL de amostra de soro do paciente nos poços subsequentes.

Ao findar a primeira etapa, acrescentou-se 50µL de anti-anticorpo conjugado marcado com uma enzima peroxidase em seu respectivo poço com exceção do Branco. A placa foi vedada e posta num agitador mecânico em baixa rotação apenas para misturar a solução formada e, posteriormente, foi incubada por 60 min a 37°C.

Após este procedimento, realizou-se o ciclo de cinco lavagens automatizada da placa com 350µL a 400µL de tampão de lavagem (tampão fosfato com 0,05% de Tween 20).

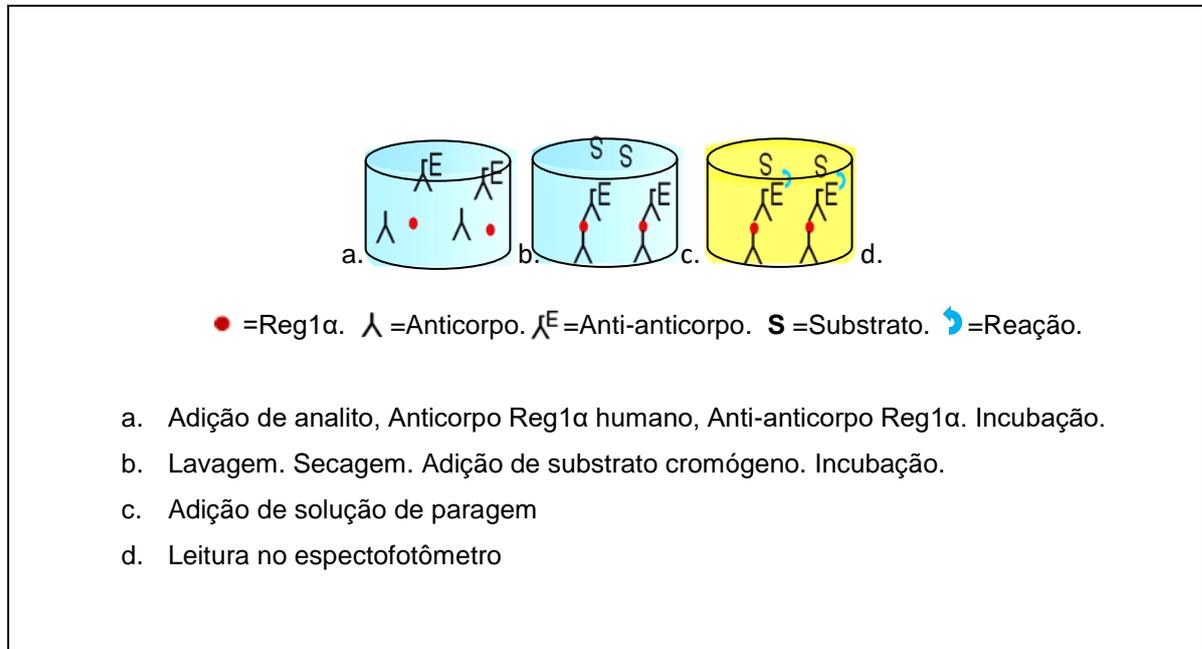


Figura 7 – Método imunoenzimático ELISA competitivo para IFABP.

Para a revelação da reação, adicionou-se 50µL da solução de substrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB 3,3',5,5') com peróxido de hidrogênio do tipo A e 50 µL do tipo B a cada poço e incubados por 10 a 15 min no escuro a 37°C. A reação foi interrompida com adição de 50µL de solução de paragem composta por ácido sulfúrico 0,334 molar (H₂SO₄) e a leitura realizada no espectrofotômetro por meio de filtro de 450nm.

As D.Os das amostras foram determinadas das por meio de um espectrofotômetro com filtro de 450 nm. A análise quantitativa da IFABP foi calculada pelas D.Os das amostras, sendo inicialmente ajustado os valores de cada amostra subtraindo o valor definido pelo componente Branco. A curva de função logarítmica de quatro parâmetros foi plotada conforme a absorbância das amostras *Standart* e por fim cada amostra teve o seu respectivo valor numérico ajustado por análise de regressão calculado em picograma por mililitro (pg/mL).

4.8.4. Análise da Proteína Reg1 α

A presença da expressão das proteínas Reg1 α no soro dos participantes foi mensurada em triplicata por meio do teste ELISA pelo método ELISA sanduíche indireto usando *kit* comercial (MyBioSource® Human Regenerating Islet Derived Protein 1 Alpha (Reg1 α) ELISA, MyBioSource Inc., San Diego, CA, USA) descrita na Figura 8.

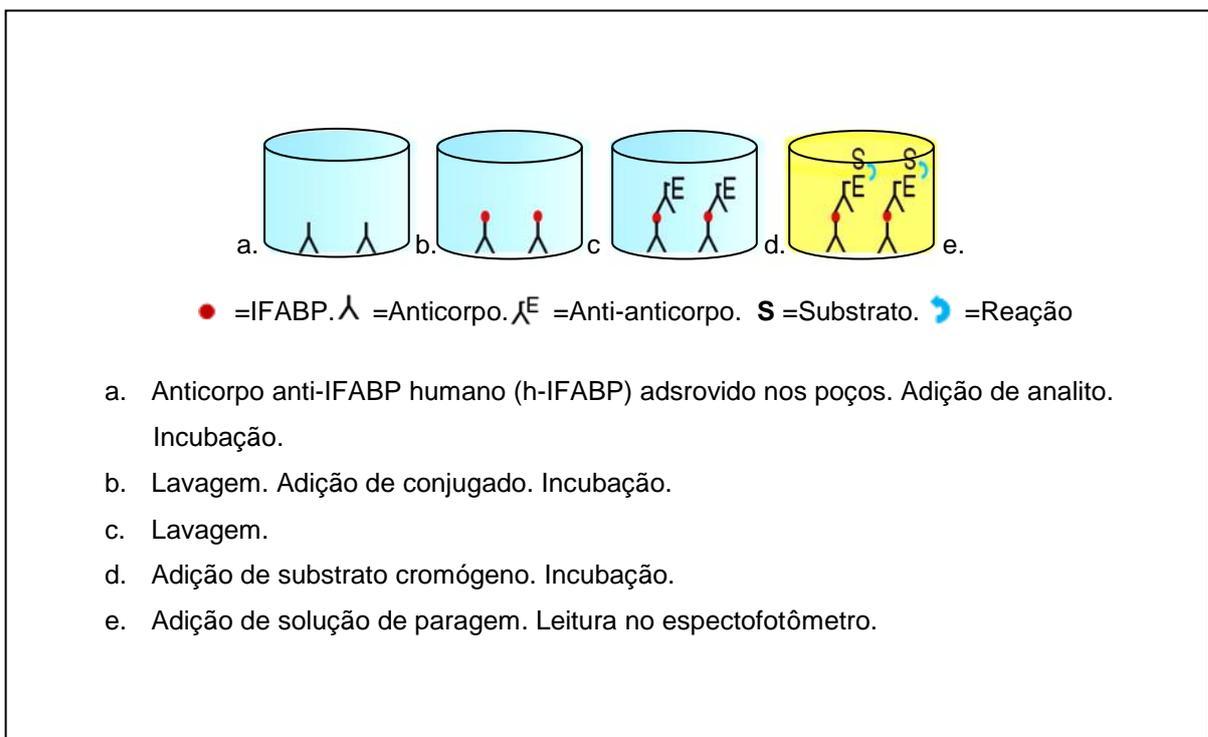


Figura 8 – Método imunoenzimático ELISA sanduíche indireto para Reg1 α .

A análise foi feita seguindo recomendações do fabricante sendo as soluções usadas como calibrador de curva com cinco diferentes concentrações de Reg1 α (250ng/L, 500ng/L, 1000ng/L, 2000ng/L, 4000ng/L) que foram previamente tituladas em série.

Na placa de poliestireno com 96 poços o primeiro poço foi destinado ao Branco seguida das cinco concentrações das amostras destinadas para calibrar a curva do leitor óptico. Utilizou-se então 50 μ L de cada solução das amostras do

calibrador iniciando com a menor concentração; e nos demais poços foi acrescido 40µl de amostra de soro do paciente (analito). Em seguida, adicionou-se 10µL dos anticorpos Reg1α humano e 50µL de anti-anticorpo conjugado HRP marcados com uma peroxidase, procedeu-se desta forma em cada poço com exceção do Branco. Selou-se a placa com selador próprio e manteve-se em incubação durante 1 hora e em temperatura a 37°C.

Após este procedimento, removeu-se a película seladora e realizou-se o ciclo de cinco lavagens automatizadas da placa com a 350µL de tampão de lavagem (tampão fosfato com 0.05% de Tween 20). Na sequência, adicionou-se 50µL de cada substrato cromógeno TMB tetrametilbenzidina (TMB 3,3,5,5') do frasco A e B para a revelação da reação, incubou-se por 10 min em local protegido e escuro também a 37°C.

A reação foi interrompida com uma solução de paragem composta por ácido sulfúrico 0.334 molar (H₂SO₄). A leitura da placa foi realizada no espectrofotômetro por meio de filtro de 450nm e gerada a D.O de cada amostra. Para quantificar o resultado da Reg1α foi inicialmente subtraído o valor da D.O do Branco de cada amostra. Os resultados foram quantificados por meio da curva de regressão linear delineada para comparar a D.O do padrão pré-estabelecido com a D.O das amostras analisadas e seu respectivo valor numérico gerado em nanograma por litro (ng/L).

4.9. BIÓPSIA ENDOSCÓPICA DUODENAL

A biópsia intestinal confirmatória da DC foi solicitada pela equipe médica responsável do AmbDC/HUB destinada a pacientes com a sorologia positiva IgA-EMA colhidos na época dos seus respectivos diagnósticos. Desta forma, foram analisados os dados secundários registrados no prontuário do paciente para utilização no presente estudo. A variação entre a data da coleta da amostra de sangue para o diagnóstico até a data da realização da biópsia foi de aproximadamente três meses. A biópsia não foi solicitada para os pacientes que se encontravam em dieta livre de glúten.

Para obtenção de amostras dos fragmentos em crianças menores de 3 anos foi usada cápsula pediátrica per oral de Watson e nos demais, por endoscopia digestiva alta. Desta forma, as amostras dos fragmentos (de 4 a 6) foram retiradas da porção distal ou próximo do ligamento de Treitz seguindo a técnica de Toccalino. As amostras obtidas foram fixadas em formol a 10% e, logo em seguida, encaminhadas para o CAP/HUB (Centro de Anatomia Patológica do HUB) responsável pelo preparo e análise histopatológico das mesmas.

Os fragmentos encaminhados ao CAP/HUB foram em seguida embebidos em parafina, seccionadas com aproximadamente 5 μ M (micromolar) de espessura e, em seguida, fixadas em lâminas. As lâminas histológicas são preparadas para serem coradas com hematoxilina-eosina e encaminhadas para posterior análise histopatológica feita por médico patologista do CAP/HUB, com o auxílio do microscópio Zeiss Axiophot 2 plus com objetivas entre 12,5 vezes a 1.000 vezes de aumento e acoplado com aparelho JVC TK-C1380 para documentação fotográfica. Foi considerada neste estudo a classificação histológica para Doença Celíaca conforme Marsh-Oberhuber(182).

4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis numéricas resultantes dos exames sorológicos obtidos pelo estudo foram analisadas estatisticamente sob a possibilidade da hipótese nula (H_0) ser diferente da hipótese alternativa (H_1) (Tabela 2).

Tabela 2 – Especificação da hipótese estatística.

Hipótese	Interpretação
$H_0: \mu_0 = \mu_1$	Os valores de Reg1 α e IFABP do grupo DC-glúten são similares aos do DC-GFD
$H_1: \mu_0 \neq \mu_1$	Os valores de Reg1 α e IFABP do grupo DC-glúten são diferentes que os do DC-GFD

Foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism 5.04 (Graph Pad Software Inc, San Diego CA) compatível com o sistema operacional Windows para análise estatística dos resultados.

Os cálculos estatísticos utilizados para determinar a diferença entre os grupos foram conduzidos pelo Teste *t* de Student com *posttest* de Wilcoxon para amostras emparelhadas.

A análise de associação entre diferentes tipos de variáveis foi conduzida por meio de diagrama de caixa ou *box plot* e o referente grau de associação calculado pela fórmula abaixo. Sendo que a sigla R^2 significa grau de associação; a sigla $\overline{var(S)}$, a média da variância da amostra; e a $var(S)$ a variância do grupo de interesse.

$$R^2 = 1 - \frac{\overline{var(S)}}{var(S)}$$

Os cálculos estatísticos empregados para verificação da intensidade da correlação entre as variáveis numéricas foram o coeficiente de correlação dos postos de Spearman, coeficiente de correlação linear de Pearson e regressão linear simples.

O desempenho do teste foi determinado por regressão logística binária na forma de curva ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve* ou característica operatória do receptor) e AUC (*Area Under the Curve* ou área sob a curva) plotada considerando a Sensibilidade versus 1-Especificidade para todos os possíveis pontos de corte (*cut off*) localizados entre zero e um. O melhor limiar do ponto de corte ou *cut off* foi definida pelo ponto com maior índice de Youden. Os dados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$.

5. RESULTADOS

Os níveis séricos de IFABP e Reg1 α encontrados em pacientes ao diagnóstico (DC-glúten) e em pacientes depois de estabelecido o tratamento (DC-GFD) com sorologia negativa para os exames específicos para DC IgA-tTG e IgA-EMA estão representados na Tabela 3. Na sequência, comparações entre pacientes DC-glúten e DC-GFD em relação direta entre os pares (Figura 9) e em forma de coluna (Figura 10).

Tabela 3 – Resultados séricos dos pacientes DC.

Pacientes	IgA-tTG (U)	IgA-EMA	Biópsia	IFABP (pg/mL)	Reg1 α (ng/L)
DC-glúten	129,9 \pm 61,5	Positivo	Sim	2112,2 \pm 1035,9	838,4 \pm 687,9
DC-GFD	10,8 \pm 6,2	Negativo	Não	1457,4 \pm 660,5	648,7 \pm 558,4
<i>p</i> -valor				<0,001	<0,001

GFD-*gluten free diet* ou dieta livre de glúten

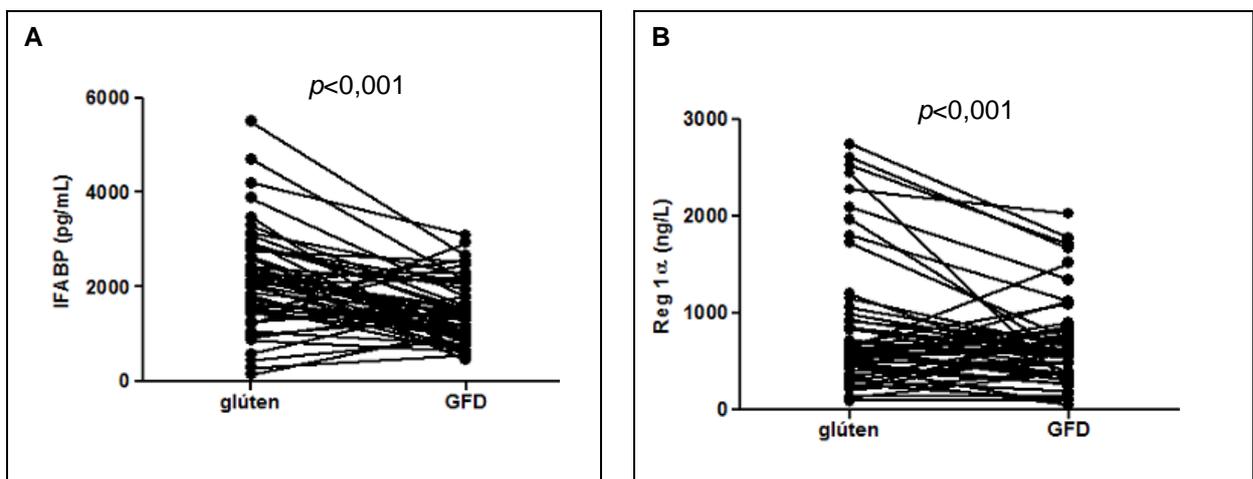


Figura 9 – Comparação direta de pacientes DC-glúten e DC-GFD para os exames séricos IFABP (A) e Reg1 α (B).

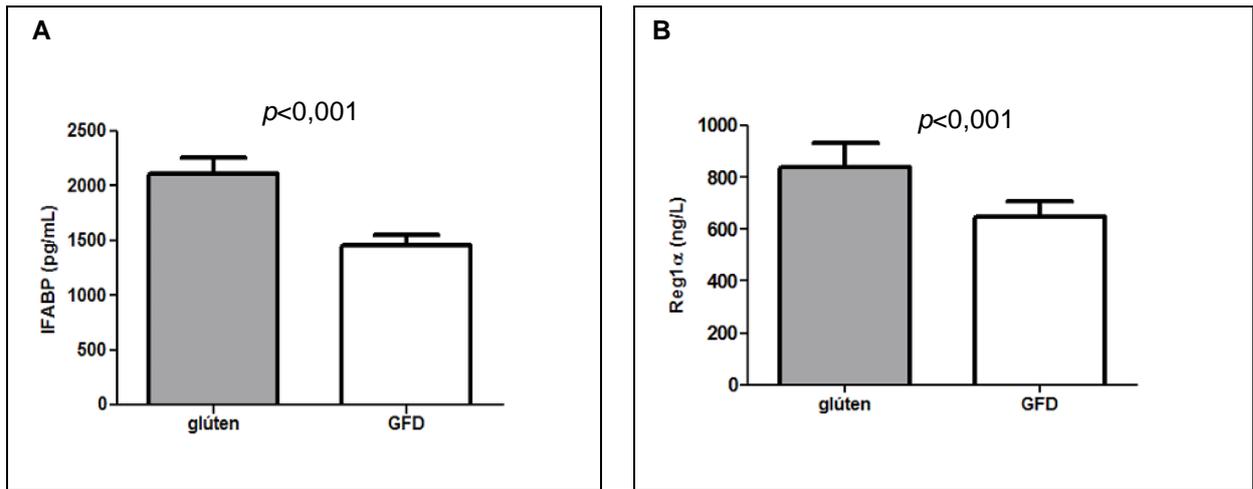


Figura 10 – Comparação em coluna entre pacientes celíacos ao diagnóstico e após tratamento de IFABP (A) e Reg1α (B).

A Tabela 4 representa os níveis séricos detectados de IFABP e Reg1α em pacientes celíacos em tratamento (DC-GFD) na condição de apresentarem exames específicos para a DC negativos (IgA-tTG e IgA-EMA) estratificados conforme o tempo de tratamento (GFD).

Tabela 4 – Níveis séricos conforme tempo de dieta sem glúten.

Tempo de GFD	n (M/F)	IgA-tTG (U)	IgA-EMA	IFABP (pg/mL)	Reg1α (ng/L)
1 ano	10 (2/8)	13,3±7	Negativo	1953,2±543,5	507,2±431,5
2 anos	8 (1/7)	13,9±6,7	Negativo	1502,6±628,4	820,8±499,1
3 anos	10 (2/8)	10,7±5,3	Negativo	1031,8±759,7	716,3±211,9
4 anos	4 (2/2)	8,9±5,3	Negativo	1566,2±443,5	441,4±162,3
>5 anos	22 (7/15)	8,6±5,1	Negativo	1367,2±721,6	664,4±772,5

M: masculino; F: feminino; GFD: gluten free diet ou dieta livre de glúten

Na sequência, a Figura 11 representa a correlação de tempo de tratamento em que se encontram os pacientes DC-GFD e detecção do biomarcador IFABP e da Reg1α.

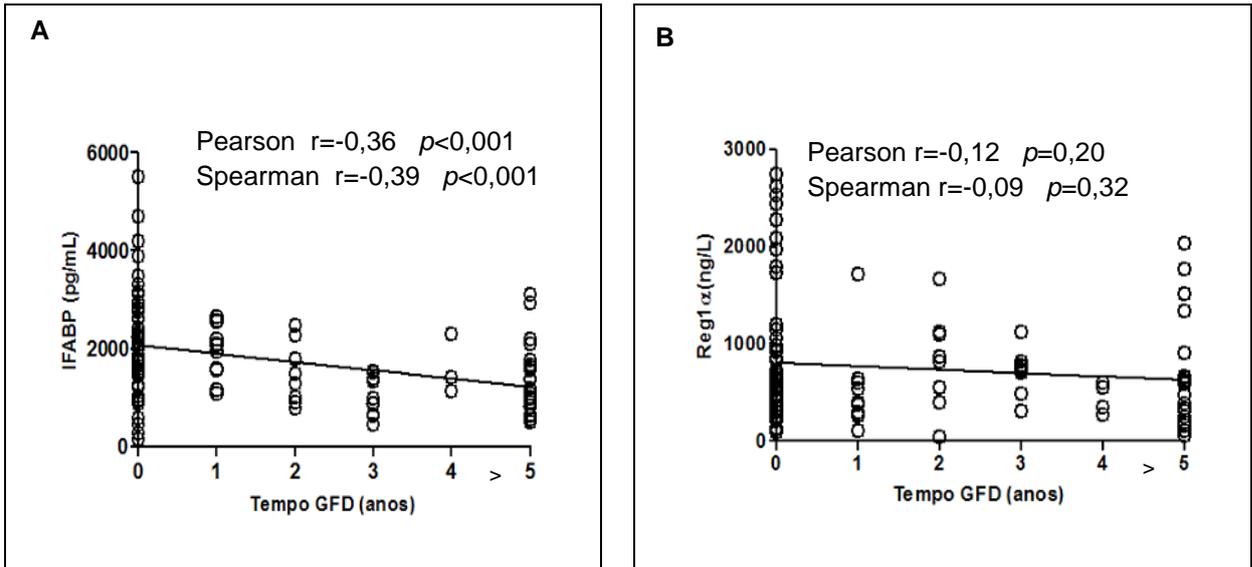


Figura 11 – Coeficiente de correlação de IFABP (A) e Reg1α (B) em relação ao tempo de tratamento.

A análise da associação entre a biópsia intestinal conforme classificação de Marsh-Oberhuber 3 estratificados com os exames séricos IFABP e Reg1α dos pacientes ao diagnóstico (DC-glúten) está representada na Figura 12.

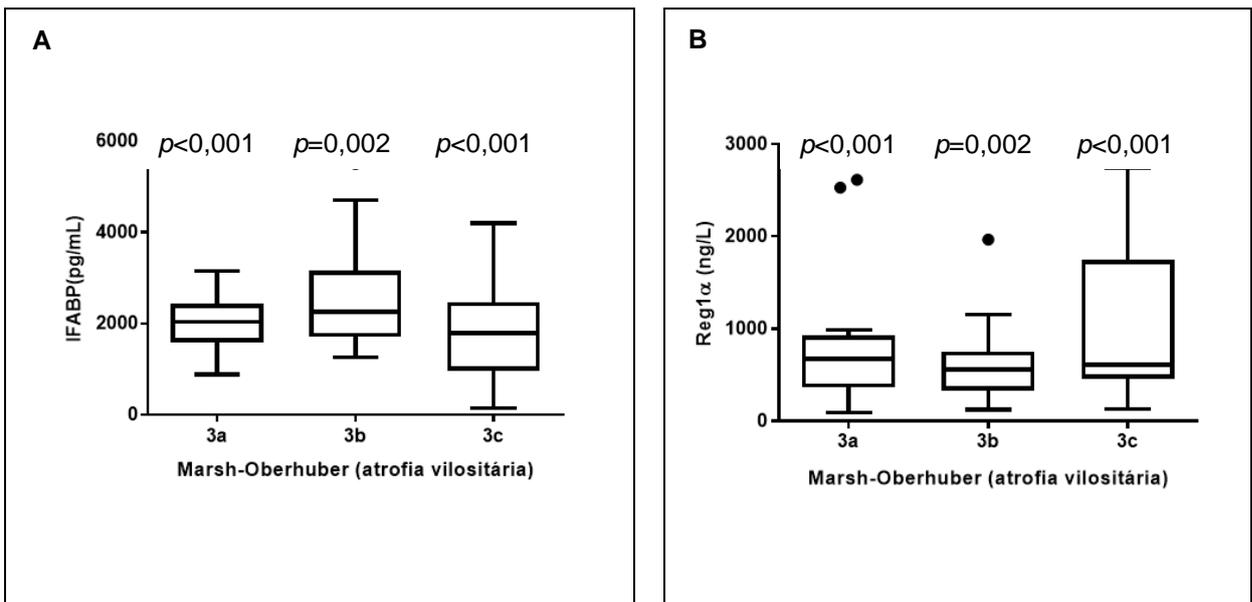


Figura 12 – Associação entre a classificação de Marsh-Oberhuber 3 e os biomarcadores IFABP (A) e Reg1α (B).

As medidas resumo do diagrama de caixa ou *box plot* dos biomarcadores IFABP e Reg1 α e o grau de associação estão representados na Tabela 5.

Tabela 5 – Medidas resumo dos biomarcadores IFABP e Reg1 α segundo classificação de Marsh-Oberhuber 3 em pacientes DC ao diagnóstico.

Indicadores	IFABP (pg/mL)			Reg1 α (ng/L)		
	3a	3b	3c	3a	3b	3c
Marsh-Oberhuber						
<i>n</i>	15	18	22	15	18	22
Mínimo	878,2	1.260,5	147,4	90,3	121,1	129,2
Quartil 1	1.581,5	1.703,7	962,3	364,4	330,6	45,8
Mediana	2.031,6	225,2	1.786,4	675,2	558,7	608,1
Quartil 3	2.434,3	3.155,5	2.474,2	927,8	753,9	1.744,3
Máximo	3.150,1	5.497,2	4.195,3	2.615,6	1.967,4	2.747,1
Média	2.046,5	2.599,3	1.759,9	866,3	639,5	983,6
Desvio padrão	668,9	1.141,5	1.035,4	741,6	427,3	804,7
Grau de associação (%)	96	85	96	94	86	97
<i>p</i> -valor	<0,001	0,002	<0,001	<0,001	0,002	<0,001

Os valores do desempenho dos biomarcadores IFABP e Reg1 α como possível indicativo da lesão da mucosa intestinal determinada pela curva ROC e a AUC estão representados na Tabela 6 e na Figura 13.

Tabela 6 – Desempenho dos biomarcadores IFABP e Reg1 α .

Indicadores	IFABP	Reg1 α
<i>Cut off</i>	1.687,3pg/mL	405,9ng/L
Intervalo do teste	0 a 2.500pg/mL	250 a 4.000ng/L
Razão de verossimilhança	1,07	0,65
Especificidade	0,22	0,35
Sensibilidade	0,84	0,71
Acurácia	0,58	0,67
VPP	0,60	0,70
VPN	0,50	0,37

VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo

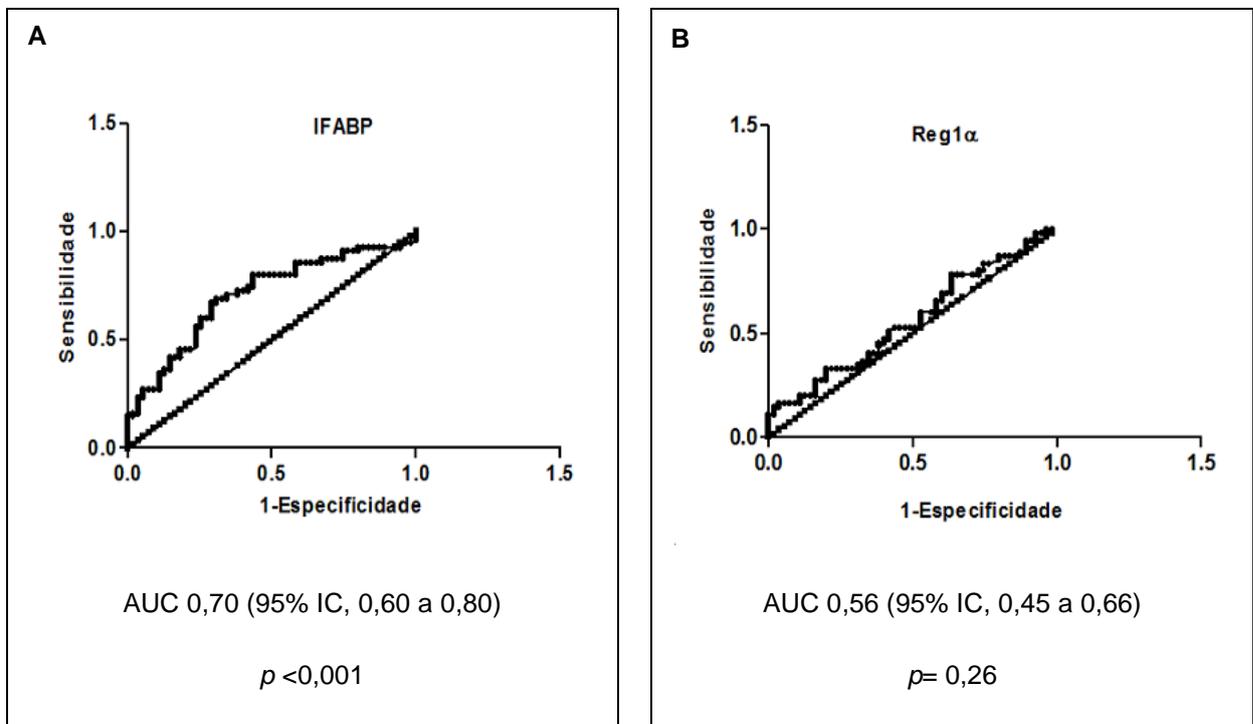


Figura 13 – Curva ROC dos biomarcadores IFABP(A) e Reg1 α (B).

A regressão linear entre pacientes celíacos antes do tratamento (DC-glúten) e depois do tratamento (DC-GFD) permite descrever o efeito do tratamento nos indivíduos representados na Figura 14.

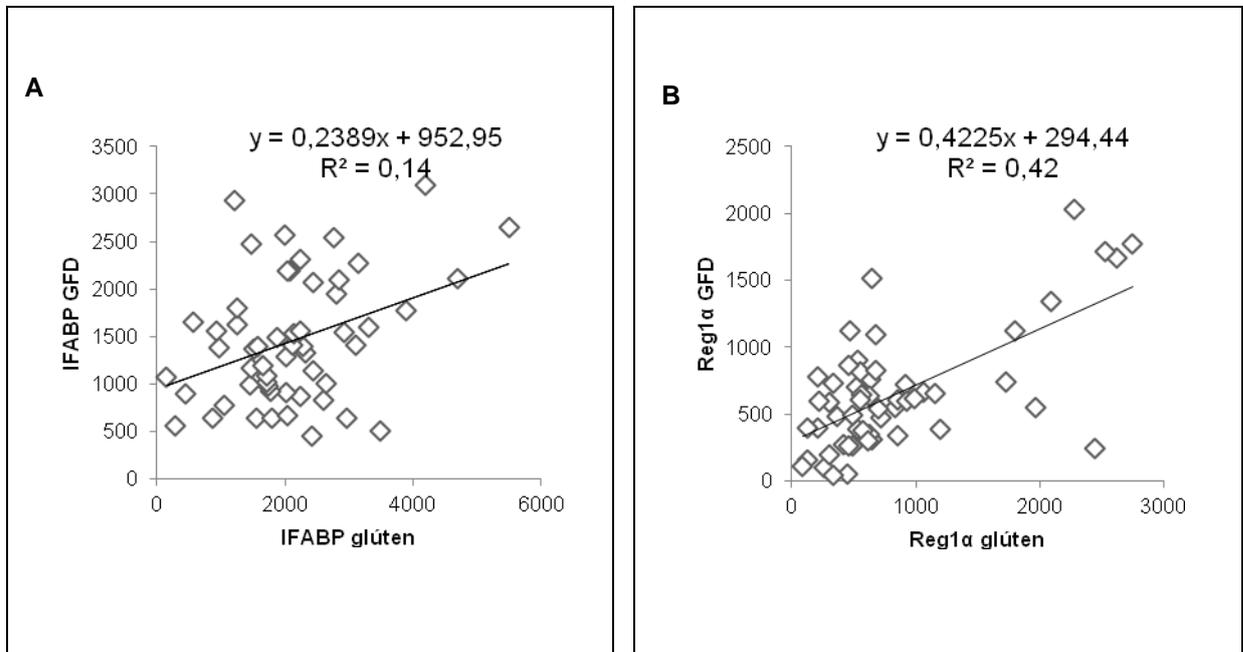


Figura 14 – Regressão linear entre DC-glúten e o DC-GFD do biomarcador IFABP (A) e Reg1α (B).

6. DISCUSSÃO

A marca histopatológica da DC é a atrofia vilositária intestinal, decorrente do desequilíbrio imunológico crônico instalado na lâmina própria como resposta contra o glúten (118). Nesse cenário ocorre uma frequente destruição dos enterócitos (apoptose), contudo ao mesmo tempo ocorre reposição das células epiteliais (regeneração) em busca constante de equilíbrio homeostático no intuito de garantir absorção de nutrientes pelo organismo. Baseado neste mecanismo fisiopatológico contínuo e simultâneo de destruição/regeneração tecidual foram mensurados dois biomarcadores séricos nos pacientes celíacos: a IFABP e a Reg1 α .

Assim, o presente estudo com confiança de 95% apresentou diferença estatisticamente significativa nos níveis séricos da proteína IFABP ($p < 0,001$) e Reg1 α ($p < 0,001$) ao comparar os pacientes portadores de DC ao diagnóstico (DC-glúten) com os pacientes DC após um ano ou mais de dieta sem glúten e negativo nas taxas de monitoramento da DC IgA-tTG e IgA-EMA (DC-GFD). Resultado similar foi constatado pela maioria dos estudos de referência(19,22–24) (Tabela 7). Os pacientes portadores de DC com variada faixa etária (adultos e crianças) foram incluídos no mesmo grupo de estudo assim como observada em estudos de referência(19,22–24).

Tabela 7 – Estudos de referência dos biomarcadores IFABP e Reg1 α .

Referência	Biomarcador	n DC-glúten	n DC-GFD	p -valor
(19)	IFABP	10	10	0,002
(21)	IFABP	69	69	0,07
(22)	IFABP	12	12	0,01
(23)	IFABP	9	9	0,002
(24)	Reg1 α	19	19	0,002

O trabalho de Adriaanse et al., 2013 refere resultado estatisticamente não significativo ($p=0,07$) para a IFABP ao comparar os grupos antes e depois de ter

realizado até um ano de tratamento, porém esse estudo não revela a proporção dos pacientes com a sorologia para a DC com resultado ainda positivo, apenas refere que 77% dos pacientes apresentaram IgA-Antitransglutaminase negativo após dois anos de tratamento(21).

No que diz respeito ao efeito do tratamento nos pacientes DC (Figura 11) do presente estudo foi projetada sob regressão linear em que a reta ajustada sugere presença de uma tendência estatisticamente significativa $p < 0,001$ para IFABP e também $p < 0,001$ para Reg1 α . Entretanto os exames de IFABP e Reg1 α não têm boa capacidade preditiva, ou seja, não permitem fazer predição para um indivíduo em particular, mas descreve uma resposta média proporcionada pelo tratamento. Os autores estudados como sendo de referencia(19–24) para o estudo também demonstraram a existência da possibilidade de utilização como biomarcador sérico de correlação com a biópsia intestinal, mas não descrevem o desempenho individual.

A associação entre a atrofia vilositária típica da DC (biópsia intestinal) e o exame sérico feito em dois biomarcadores IFABP e Reg1 α pela análise do diagrama de caixa ou *box plot* demonstrou associação estatisticamente significativa com $p < 0,001$ para IFABP e $p = 0,002$ para Reg1 α . O grau de associação entre os exames foi maior que 85% para IFABP e maior que 86% para Reg1 α (Tabela 4). Os resultados encontram-se em concordância com estudos de referencia(20,21,23).

Ao analisar os diagramas (Figura 12) nota-se que o biomarcador IFABP, que representa a destruição do tecido, apresenta uma leve queda no nível Marsh-Oberhuber 3c. Em contrapartida, o biomarcador Reg1 α , que representa a regeneração tecidual, apresenta elevação nesse mesmo nível (Figura 12B).

A discrepância apresentada pelo biomarcador IFABP com o nível Marsh-Oberhuber 3c menor que os níveis 3a e 3b não foi observado nos estudos de referencia(20,21). A camada formada pelos enterócitos faz parte da barreira intestinal, sendo esse responsável pela proteção local de forma física e imunológica. O mecanismo de proteção da barreira intestinal almeja a homeostase intestinal, que pode ocorrer a apoptose dos enterócitos e sua reposição conforme o estímulo imunológico local. O desequilíbrio desse balanço acarreta em lesão da mucosa intestinal (163,195,238,240).

A lesão da mucosa intestinal na DC apresenta vários estágios de evolução promovidos pela presença do glúten na dieta (182,241), que foram classificados por Marsh e posteriormente modificados por Oberhuber (Figura 3 e suplementados pela Figura 15).

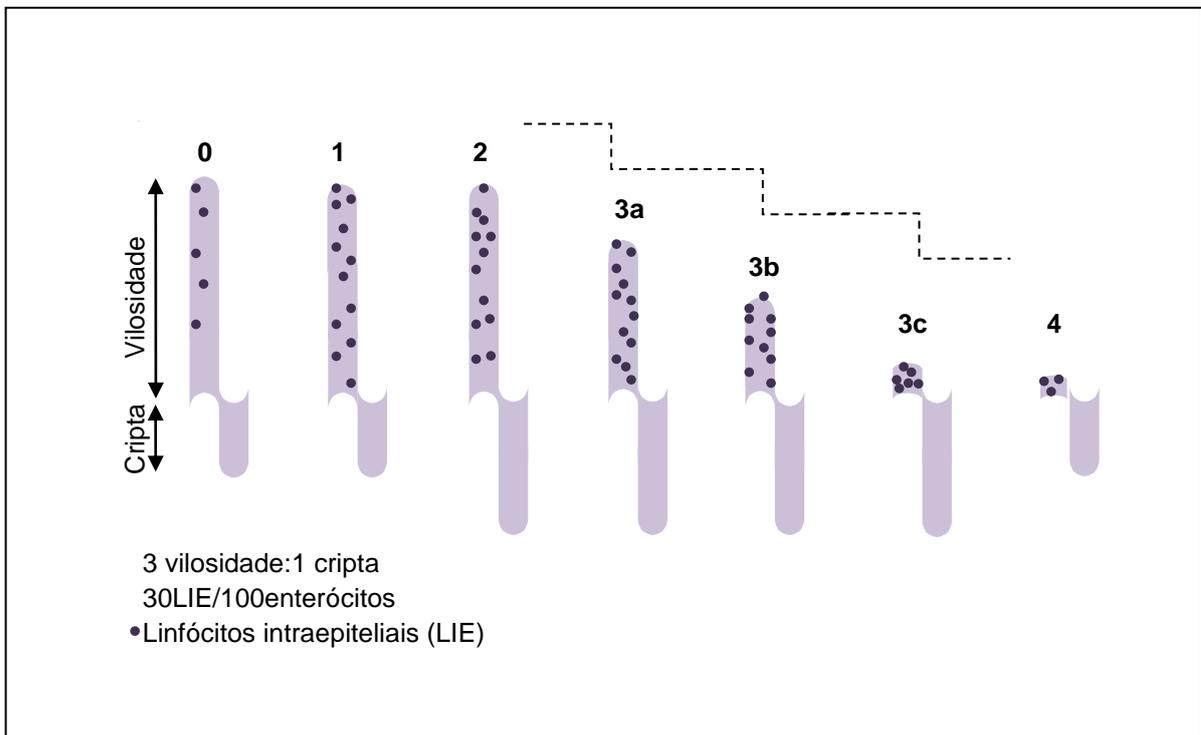


Figura 15 – Esquema das lesões intestinais da DC conforme classificação de Marsh-Oberhuber.

Fonte: (16,33,182)

Conforme a Figura 15, a lesão intestinal na DC pode apresentar várias fases. A fase pré-infiltrativa (Marsh-Oberhuber 0) considera-se a ausência de alterações celulares (menos de 30 linfócitos intraepiteliais a cada 100 enterócitos) e morfológicos (as vilosidades com o triplo da altura das criptas)(33).

A fase infiltrativa da lesão da mucosa intestinal (Marsh-Oberhuber 1) apresenta discreto aumento dos LIE(3). O próximo nível é a fase de intensa tentativa de renovação celular e inflamação persistente(245), a fase hiperplásica (Marsh-Oberhuber 2) caracterizada pelo alongamento das criptas e aumento dos LIE. Na

sequência, a lesão evolui para a fase destrutiva com progressivo achatamento das vilosidades intestinais até chegar a atrofia total das vilosidades intestinais. A fase destrutiva é considerada a lesão característica da DC (Marsh-Oberhuber 3), mas nessa fase ainda conserva concomitante o aumento dos LIE e o alongamento das criptas. Ao passo que persiste o quadro inflamatório no epitélio intestinal progride para a fase hipoplásica (Marsh-Oberhuber 4), que apresenta redução na capacidade de renovação celular, ou seja, tem presença de infiltrado inflamatório, mas sem alteração no número de LIE e criptas sem alongamento(33,182).

No presente estudo, a expressão da proteína IFABP apresentou-se reduzida no nível Marsh-Oberhuber 3c (Figura 12A). Conforme a inflamação na mucosa intestinal na DC persiste, pode evoluir para a perda total das vilosidades intestinais. A perda total das vilosidades caracteriza o quadro da lesão de Marsh-Oberhuber 3c. A distribuição da proteína IFABP é mais concentrada no topo das vilosidades intestinais, por consequência disso os enterócitos passam a expressarem menos IFABP quando a lesão intestinal se apresenta no nível de atrofia total(23,200–202).

O estudo conduzido por Simula em 2010 comparou dois grupos de pacientes celíacos conforme o tipo de atrofia vilositária e expressão de proteínas relacionadas com dano lesão intestinal, dentre elas a IFABP. Os indivíduos do primeiro grupo apresentavam Marsh-Oberhuber 0 a 1; e do segundo grupo, Marsh-Oberhuber 2 a 3c. Nesse estudo, inclusive, cita a IFABP com expressão reduzida nos indivíduos com maior lesão tecidual (atrofia vilositária)(242).

Na presente pesquisa, a Reg1 α apresentou-se aumentada na representação gráfica referente a Marsh-Oberhuber 3c (Figura 12B). Esta elevação pode estar atrelada ao fato de que quanto maior a lesão intestinal provocada pelo glúten maior a tentativa de reparação tecidual na busca pela homeostase intestinal(237,243). O epitélio intestinal tem um alto poder de renovação celular que ocorre a cada três a cinco dias, pois o trato gastrointestinal é a superfície mais exposta a micro-organismos e alimentos diversos ao longo da vida do indivíduo(244).

A renovação tecidual ocorre por mecanismo de autoreposição tecidual do intestino delgado pela ação das células tronco intestinais (*Intestinal Stem Cells* - ISC) presentes na base das criptas de Lieberkühn(245). Segundo a “*Unitarian Hypothesis*” ocorre uma renovação das células epiteliais por uma origem em comum:

as células ISC(244). As ISC são capazes de se diferenciarem e migrarem em direção das criptas para as vilosidades.

E as células ISC apresentam diversas características à medida em que migram em direção às vilosidades. Inicialmente ocorre a diferenciação celular das ISC, depois a maturação celular e, por fim, perdem a capacidade proliferativa e estabilizam formando uma fina camada laminar composta principalmente por enterócitos contornando as vilosidades intestinais (195,245–247).

Durante a indução de reparação tecidual, as criptas podem aumentar o seu número dividindo-se em forma de fissuras e/ou fusão (Figura 16) com outras criptas adjacentes para atender à demanda aumentada de reposição celular ao amplificar a área de regeneração (243,248–253). Em estudos realizados em roedores adultos, a multiplicação e reposição celular da lâmina intestinal com presença de fissuras representam aproximadamente 3,5% e fusão 4%(251).

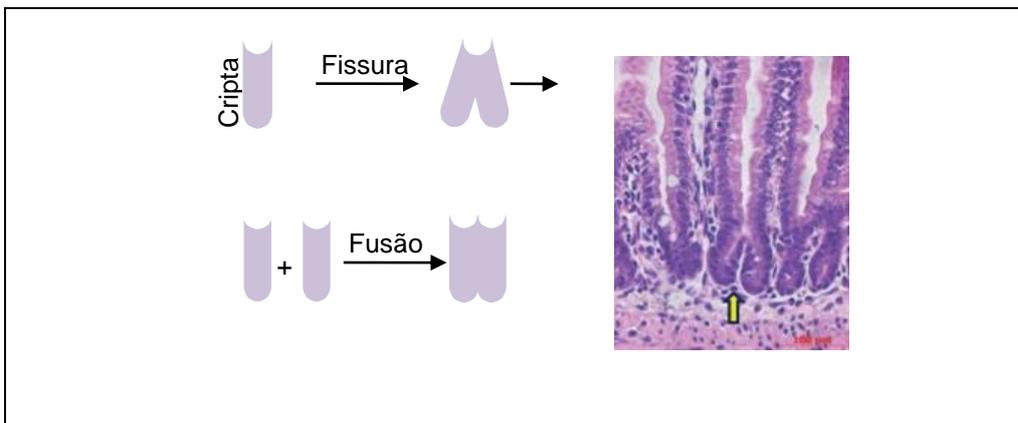


Figura 16 – Fissura (seta amarela) e fusão das criptas de Lieberkühn.

Fonte: (253)

Além disso, diversas citocinas e interleucinas secretadas pelas células adjacentes fazem parte do infiltrado inflamatório crônico e influenciam na regulação do processo de perda/ganho de enterócitos. A IL-15 e IL-6 são coadjuvantes no que se refere à indução e à manutenção da enteropatia provocada pelo glúten, e desta maneira são capazes de influenciar a destruição/apoptose dos enterócitos ou a reorganização/regeneração tecidual (254).

A IL-15, por exemplo, é expressa na normalidade fisiológica em pequena quantidade pelos enterócitos e também por outras células das imediações (158,168,255,256), mas na DC (ver Figura 2; linha contínua) pode ocorrer o aumento de expressão desta citocina devido constante estímulo contra a presença de glúten na dieta(25,149). Na DC, a IL-15 orchestra juntamente a outras citocinas inflamatórias algumas ações pontuais para o desencadeamento da DC. Como por exemplo, a IL-15 desestabiliza a tolerância específica contra o glúten e causa a ruptura da homeostase imunológica como a supressão das células do tipo Treg (Células tipo T reguladoras)(165). A Treg exerce função de controlar a resposta excessiva das células TCD4 efectoras e conseqüentemente modera a ação das vias inflamatórias Th1, Th2 e Th17(166,257,258).

A IL-15 atua também como ativador da resposta efetiva das células TCD4 desencadeando toda resposta inflamatória Th1, Th2 e Th17 da DC(118,149,164,259,260). Apesar da função citotóxica da IL-15 não ser exclusiva e específica contra o glúten corrobora sobremaneira com o desequilíbrio da homeostase intestinal e habilita o LIE para promover a apoptose ou morte celular programada dos enterócitos (120,161,162,168,261,262). A IL-15 ainda aporta o aumento da permeabilidade intestinal, fato que fomenta o agravamento dos danos na mucosa intestinal típicos da DC observados em forma de atrofia das vilosidades intestinais e responsável pela má absorção dos nutrientes e colaboram com o surgimento diversas formas de apresentação clínica da DC(61,63,118,162,169).

Não apenas a IL-15, mas também a IL-6 foi detectada em quantidade considerável no tecido intestinal em pacientes com a DC ativa (dieta com glúten) pois contribui para induzir a citotoxicidade dos LIE e estimula os plasmócitos a produzirem anticorpos (263–267). A IL-6 assim como a IL-15 quando expressos de forma desenfreada, podem induzir o desenvolvimento de doenças crônicas e até mesmo da autoimunidade(166,169,255). A IL-6 é produzida por quase todas as células estromais e células do sistema imune(268–270). A IL-6 expressa em condições de homeostase imunológica ao ser combinado com a citocina TGF- β controla o balanço entre as vias Th17 e Treg no intuito de manter o equilíbrio homeostático(166).

Fato paradoxal é a possibilidade da IL-6 gerar respostas imunes antagônicas (Figura 17) quando inserida num contexto inflamatório atua com propriedades pró-inflamatório e anti-inflamatório (268,269). Geram portanto respostas denominadas Via Clássica (*Classic signaling*) e Via Trans-sinal (*Trans-signaling*)(271–275). As duas respostas resultam em efeitos biológicos distintos e também atuam nas criptas intestinais(276).

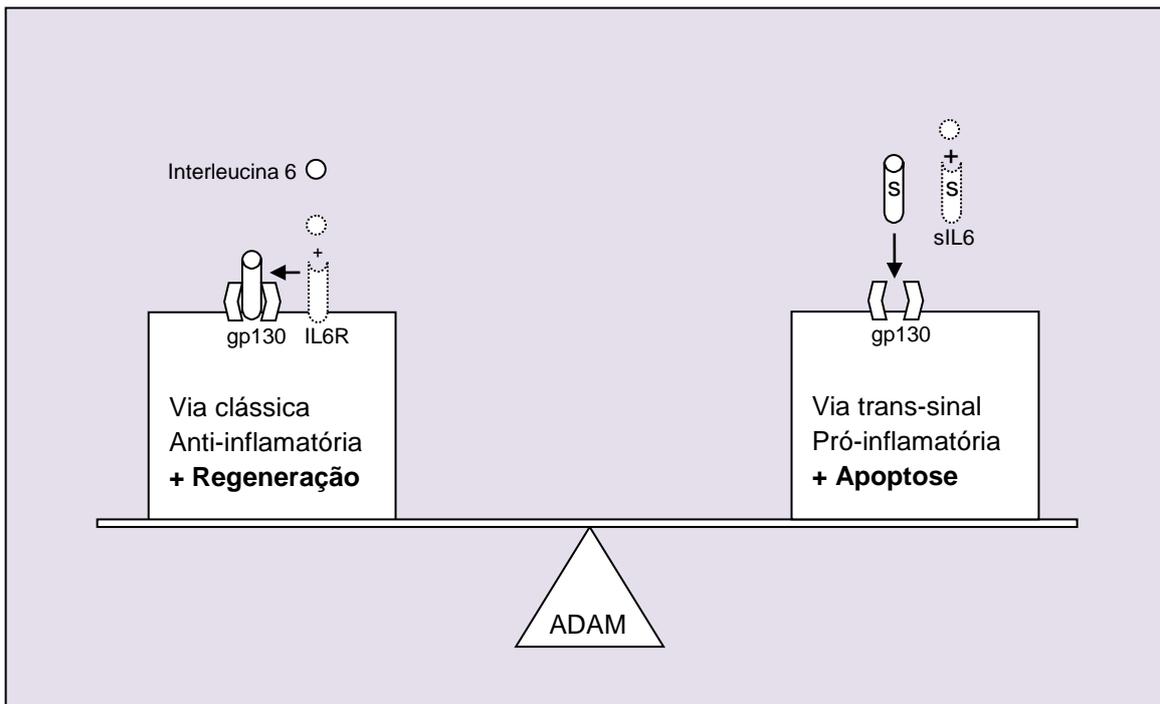


Figura 17 – Regulação entre a apoptose e regeneração dos enterócitos pelas ações da IL-6 no contexto inflamatório.

A indução feita pela via clássica é proveniente da ligação entre a IL-6 com os receptores de membrana IL6R e gp130 formando um complexo capaz de gerar resposta com característica anti-inflamatória e anti-apoptótica que beneficia o processo de regeneração tecidual (271–275). Outra possibilidade de resposta da IL-6 é a via trans-sinal que transcorre em duas etapas distintas. A primeira etapa é caracterizada pela união entre a IL-6 com o receptor solúvel da IL-6 (sIL6) presente no meio extracelular. Na etapa seguinte, o complexo IL-6/sIL6 é acoplado ao receptor de membrana gp130 e assim induz a resposta da via trans-sinal(271–

273,277–280). Na DC por exemplo, a IL-6 pode induzir a resposta Th2 a amplificar a produção de anticorpos específicos da DC (264,281,282).

A inflamação crônica do processo inflamatório da DC induz produção de citocinas capazes de regular a expressão da Reg1 α . Nesse contexto a IL-6 tem papel relevante para potencializar a expressão de Reg1 α (218,228,283–286). A IL-6 também pode regular a expressão da proteína IFABP, fato observado em pacientes com trauma intestinal severo(287,288). Assim, a expressão das proteínas Reg1 α e IFABP podem sofrer influencia das interleucinas presentes no infiltrado inflamatório, inclusive da IL-6(218,228,283–288).

A regulação imunológica pode apresentar variadas formas de resposta pelo mesmo indivíduo e isso reflete também na estruturação final dos tecidos envolvidos na inflamação. Desta forma, pela análise histopatológica da lesão de atrofia vilositária do paciente DC observou-se a possibilidade da coexistência de níveis diversos de lesão da mucosa intestinal no mesmo indivíduo (289–292) como representados na Figura 18. A atrofia vilositária não é exclusiva da DC (120,132–135,293).



Figura 18 – Coexistência de vários níveis de atrofia vilositária.

Fonte: (289).

Ao correlacionar os níveis séricos de IFABP e Reg1 α ao diagnóstico e conforme o tempo de dieta livre de glúten (Figura 13) observa-se que houve correlação

negativa e fraca para IFABP e correlação negativa ínfima e desprezível para Reg1 α . Esse resultado demonstra que os biomarcadores não tem boa capacidade preditiva ao longo do tratamento. O estudo de Adriaanse et al., 2013 refere correlação entre o biomarcador IFABP conforme o tempo de tratamento como correlação fraca a desprezível (21).

O tratamento da DC depende da estrita adesão à dieta livre de glúten ao longo da vida do paciente que impacta no ganho de qualidade de vida do paciente(294–296). A expectativa ao realizar o tratamento é a completa remissão dos anticorpos IgA-tTG, IgA-EMA e a restituição das vilosidades intesinais(297). Mas quase a metade dos pacientes tem dificuldade em aderir ao tratamento (298–301) com exceção dos pacientes residentes na Finlândia com 93% de adesão(302).

Há inúmeras dificuldades para aderir corretamente ao tratamento, tais como, problemas sócio-econômicos, desinformação, risco de contaminação cruzada em ambientes onde são preparados pratos diversos(303,304). O tratamento envolve correta orientação dietética feita por nutricionistas, o encorajamento do paciente, apoio de sua família e afins para melhor compreensão da doença e adaptação à nova dieta proposta(4,305–307).

Na presente pesquisa, dentre os pacientes em tratamento (DC-GFD) seis pessoas se encontravam em dieta livre de glúten entre 12 e 15 anos (Tabela 8). A maioria dos pacientes admitiu o consumo de alimentos contendo glúten de forma esporádica (até duas vezes ao mês) de forma voluntária ou involuntária. Todos são pacientes adolescentes e adultos jovens que tiveram o seu diagnóstico de DC firmado quando ainda eram crianças, e a maioria apresentavam, na época, sintomas gastrointestinais típicos (forma clássica).

Apenas o paciente masculino de 21 anos refere estar com distensão abdominal e gases ao consumir glúten esporadicamente, e os demais encontram-se assintomáticos. O resultado coincide com estudos que referem a idade de maior transgressão da dieta sem glúten de forma intencional ou não intencional que compreende da adolescência até a fase de adulto jovem (308,309).

Tabela 8 – Característica dos pacientes em tratamento há mais de dez anos.

Dados do Paciente	1	2	3	4	5	6
sexo	masculino	feminino	masculino	masculino	feminino	feminino
manifestação clínica	clássico	clássico	atípico	clássico	clássico	clássico
IgA-EMA	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
HLA	DQ2	DQ2	DQ2	DQ2	DQ2	DQ2
Biópsia (Marsh-Oberhuber)	3b	3c	3c	3c	3c	3c
Idade glúten (anos)	6	13	3	1	3	2
IgA-tTG	152,3	141,1	153,2	134,5	208,4	179,1
IFABP	4.705,2	147,5	1.209,6	1.246,1	2.604,3	3.480,5
Reg1 α	1.152,8	2.091,7	2.279,3	2.447,5	2.747	452,1
*IgA-EMA	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
*Biópsia	não	não	não	não	não	não
*Forma de GFD	CFV	CFV	CFI	CFV	CFI	estrito
*Idade (anos)	21	27	17	14	16	14
*Tempo de GFD (anos)	15	14	14	13	13	12
*IgA-tTG	20,2	3,5	4,4	7,5	6,7	8,6
*IFABP	2.105,5	1.077,1	2.939,6	1.620,7	824,6	511,8
*Reg1 α	652,4	1.338,9	2.029,6	246,8	1.770,2	51,1

*: pacientes DC em tratamento há mais de um ano; CFV: dieta com contaminação com glúten de forma esporádica e voluntária (até 2 vezes ao mes); CFI: dieta com contaminação com glúten esporádica e involuntária.

Em relação à recuperação histológica, os autores são divergentes. Como exemplo, em pesquisa feita em pacientes DC adultos referem a cicatrização incompleta em cerca de 10% mesmo após 5 anos de tratamento(310–312). Outras pesquisas referem resultados discordantes como a recuperação histológica com aproximadamente 2 a 3.8 anos de tratamento em adultos (313–320). Em crianças a cicatrização alcança 95% nos primeiros dois anos de tratamento e 100% com maior demanda de tempo (310,321).

O prognóstico da DC depende da adesão estrita ao tratamento mesmo que a biópsia feita no primeiro ano de tratamento revele cicatrização tecidual incompleta(313). A causa mais comum de atrofia vilositária persistente é atribuída à exposição constante ao glúten por contaminação dos alimentos de forma voluntária ou involuntária(301,320,322).

O presente estudo não realizou biópsias complementares em pacientes em tratamento (DC-GFD), sendo assim o resultado dos biomarcadores IFABP e Reg1 α pode não refletir real associação com a lesão histológica ou com a recuperação dessa. Nenhum estudo de referencia(19–24) refere realização de biópsias intestinais em pacientes DC em tratamento. O consenso da ESPGHAN feita no ano de 2012 sugere a realização de nova biópsia nos pacientes DC em tratamento nas seguintes condições: persistência dos sintomas, sorologia IgA-tTG e IgA-EMA negativos, e descartada qualquer possibilidade de contaminação por glúten de forma intencional ou não(4).

Outro fator de viés poderia ser a temperatura (-34°C) e período de armazenamento do soro dos pacientes ao diagnóstico (1989 a 2015). Porém, Adriaanse e colaboradores(21) utilizaram amostras armazenadas há mais de 15 anos a -20°C e refere não ter tido alteração significativa na análise do biomarcador IFABP, assim como Planas e colaboradores(24) para Reg1 α .

O exame sérico IgA-tTG é indicado para monitorar DC em crianças e adultos em tratamento(4,12,323–326). Mas seu uso como parâmetro de recuperação histológica foi contestado por alguns autores(327,328), inclusive o exame IgA-EMA(329,330). Devido discrepância entre a sorologia de monitoramento com a biópsia, alguns autores ainda recomendam a realização de biópsia após o diagnóstico mesmo na ausência de sintomas(13,331–333).

O desempenho dos biomarcadores IFABP e Reg1 α representada sob forma de curva ROC e AUC está associada ao poder discriminante de um teste diagnóstico e auxilia na decisão estatística do possível uso dos biomarcadores. O presente estudo apresentou AUC de 70% para IFABP ($p < 0,001$), que demonstra poder discriminatório regular mas aceitável (Figura 14A), e a AUC de 56% para Reg1 α ($p=0,26$) mostrou-se ineficiente (Figura 14B). Nos estudos de referencia para a proteína IFABP os autores encontraram AUC maior que 88% atingindo até 92% (19–21,23).

A sensibilidade do biomarcador IFABP variou de 67%(19) a 80%(21) sendo o valor encontrado nessa presente pesquisa de 84% próximo dos estudos de referencia com valores de 67%(19) a 80%(21). A especificidade encontrada foi de 22% para IFABP, mas valores encontrados nos estudos de referência (Tabela 9)

varia entre 29%(19) a 87,2%(21). O biomarcador Reg1 α demonstrou sensibilidade de 71% muito próximo do valor obtido pelo estudo de referencia(24) que encontrou 60%, mas a especificidade do biomarcador de 35% está discrepante e muito menor que 96%(197).

Tabela 9 – Desempenho dos biomarcadores IFABP e Reg1 α citado nos estudos de referencia.

Referencia	Proteína	Grupos	S	E	VPP	VPN	RV	AUC
(19)	IFABP	glúten vs controle	67	29	83	71	-	90
(20)	IFABP	glúten vs potencial	-	-	98	-	-	92
(21)	IFABP	glúten vs SC	80	87,2	78	88,5	-	88
(23)	IFABP	glúten vs controle	-	-	89	81	-	91
(24)	Reg1 α	glúten vs controle	60	96	89	81	-	91

S: sensibilidade; E: especificidade; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; RV: razão de verossimilhança; AUC: *area under de ROC curve* ou área abaixo da curva; SC: suspeita clínica e IgA-tTG negativo.

O Valor Preditivo Positivo (VPP) encontrado para a IFABP foi de 60% menor que os estudos de referencia que encontraram entre 78%(21) a 98%(20). O Valor Preditivo Negativo (VPN) encontrado de 50% ficou muito aquém do resultado obtido por outros autores: 71%(19) a 88,5%(21). O resultado obtido de VPP e VPN indicam baixa probabilidade discriminar entre os sujeitos realmente positivos (com lesão intestinal) e realmente negativos (sem lesão intestinal).

A razão de verossimilhança, que é a razão entre duas probabilidades, encontrada de 1,07 para a IFABP e 0,65 para a Reg1 α . Ambos os biomarcadores indicam baixa probabilidade de distinguir entre os indivíduos com e sem a doença. Nenhum estudo de referencia(19–24) cita a razão de verossimilhança para nível de comparação.

O desempenho dos biomarcadores foi realizada para averiguar a real necessidade de arrolar o presente estudo para próximo estudo de validação dos

biomarcadores IFABP e Reg1 α . Para o estudo de validação do teste é recomendado comparar os pacientes ao diagnóstico com grupo controle formada apenas por pessoas saudáveis sem a doença.

Nem todos os estudos de referencia compararam os grupos com controles considerados saudáveis. Como por exemplo, o estudo feito por Adriaanse e colaboradores em 2013, comparou o grupo de DC sem tratamento com grupo que apresentava suspeita clínica e IgA-tTG em nível dentro da normalidade(21). Outro estudo, conduzido por Vreugdenhil e colaboradores em 2011 fez uso de indivíduos que apresentaram IgA-EMA positivos mas com biópsia Marsh-Oberhuber 0 (tipo potencial) como grupo controle(20).

O presente estudo comparou dados de pacientes emparelhados obtidos em duas fases distintas em relação à DC: antes e depois do tratamento. A comparação, nesse caso, é considerada homogênea, pois outros fatores de variabilidade não influenciam no resultado final.

Outros possíveis fatores de interferência nos resultados também foram levados em consideração ao selecionar a amostragem. Nos critérios de exclusão do presente estudo indivíduos com doenças autoimunes não participaram, pois a Reg1 α pode estar aumentada nos casos que apresentem síndrome de Sjögren(236), diabetes *mellitus* tipo 1(235), e também nos casos de outras doenças como degeneração de neurológica por Alzheimer(233), adenocarcinoma pulmonar(334), câncer gástrico(230,335), e doença inflamatória intestinal(237). A IFABP pode se apresentar elevada a nível sérico em casos de hisquemia mesentérica (211–213) e sepse(336)

Pacientes DC que fazem uso contínuo de medicamento contendo tiazolidionas pode inibir a transcrição da proteína Reg1 α (337); já o princípio ativo olmesartana pode causar dano na mucosa intestinal e interferir nos resultados(338,339).

7. CONCLUSÃO

Ao determinar os níveis séricos de IFABP e Reg1 α em pacientes portadores de DC ao diagnóstico e após a obtenção de resultados negativos nos testes sorológicos IgA-tTG e IgA-EMA com a dieta isenta de glúten conclui-se que houve diferença entre os grupos pesquisados para IFABP e para Reg1 α .

Ao correlacionar os níveis séricos de IFABP e Reg1 α ao diagnóstico e conforme o tempo de dieta livre de glúten conclui-se que IFABP apresentou correlação fraca e Reg1 α , desprezível.

Ao verificar a associação entre o exame sérico de IFABP e de Reg1 α dos pacientes DC ao diagnóstico com os exames de biópsia intestinal pela classificação de Marsh-Oberhuber 3 estratificados conclui-se que houve associação entre as variáveis para IFABP e para Reg1 α .

Ao verificar o desempenho dos biomarcadores séricos IFABP e Reg1 α como possível indicativo da lesão da mucosa intestinal em pacientes portadores de DC conclui-se que IFABP apresentou desempenho regular e Reg1 α , ineficiente.

Ao verificar o efeito do tratamento pela dieta livre de glúten nos pacientes portadores de DC ao diagnóstico pela análise de IFABP e de Reg1 α conclui-se que o modelo não tem boa capacidade preditiva para um indivíduo em particular.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Hopper AD, Hadjivassiliou M, Hurlstone DP, Lobo AJ, McAlindon ME, Egnér W, et al. What Is the Role of Serologic Testing in Celiac Disease? A Prospective, Biopsy-Confirmed Study With Economic Analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2008 Mar;6(3):314–20
2. Bürgin-Wolff A, Mauro B, Faruk H. Intestinal biopsy is not always required to diagnose celiac disease: a retrospective analysis of combined antibody tests. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2013 Dec 23;13(1):19.
3. Taavela J, Koskinen O, Huhtala H, Lähdeaho M-L, Popp A, Laurila K, et al. Validation of Morphometric Analyses of Small-Intestinal Biopsy Readouts in Celiac Disease. Sestak K, editor. *PLoS One* [Internet]. 2013 Oct 11;8(10):e76163.
4. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2012 Jan;54(1):136–60.
5. Stoven SA, Choung RS, Rubio-Tapia A, Absah I, Lam-Himlin DM, Harris LA, et al. Analysis of Biopsies From Duodenal Bulbs of All Endoscopy Patients Increases Detection of Abnormalities but has a Minimal Effect on Diagnosis of Celiac Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2016 Nov;14(11):1582–8.
6. Barada K, Habib R, Malli A, Hashash J, Halawi H, Maasri K, et al. Prediction of celiac disease at endoscopy. *Endoscopy* [Internet]. 2014 Jan 29;46(2):110–9.
7. Luján-Sanchis M, Pérez-Cuadrado-Robles E, García-Lledó J, Juanmartiñena Fernández J-F, Elli L, Jiménez-García V-A, et al. Role of capsule endoscopy in suspected celiac disease: A European multi-centre study. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2017;23(4):703.
8. Goenka MK. Capsule endoscopy: Present status and future expectation. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2014;20(29):10024.

9. Hayat JO, Sirohi R, Gorard DA, JO H, Sirohi R, DA G. Paediatric endoscopy performed by adult-service gastroenterologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2008;20(7):648–52.
10. Sharkey LM, Corbett G, Currie E, Lee J, Sweeney N, Woodward JM. Optimising delivery of care in coeliac disease - comparison of the benefits of repeat biopsy and serological follow-up. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2013 Nov;38(10):1278–91.
11. Duerksen DR, Wilhelm-Boyles C, Veitch R, Kryszak D, Parry DM. A comparison of antibody testing, permeability testing, and zonulin levels with small-bowel biopsy in celiac disease patients on a gluten-free diet. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2010 Apr 28;55(4):1026–31.
12. Vécsei E, Steinwendner S, Kogler H, Innerhofer A, Hammer K, Haas O a, et al. Follow-up of pediatric celiac disease: value of antibodies in predicting mucosal healing, a prospective cohort study. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2014;14(28)Vécsei, E. et 2014. Follow-up of pediatric celiac disease: value of antibodies in predicting mucosal healing, a prospective cohort study. *BMC gastroenterology*, 14(28), p.1–20.):1–20.
13. Bannister EG, Cameron DJ, Ng J, Chow CW, Oliver MR, Alex G, et al. Can celiac serology alone be used as a marker of duodenal mucosal recovery in children with celiac disease on a gluten-free diet? Vol. 109, *The American journal of gastroenterology*. 2014. p. 1478–83.
14. Parizade M, Bujanover Y, Weiss B, Nachmias V, Shainberg B. Performance of serology assays for diagnosing celiac disease in a clinical setting. *Clin Vaccine Immunol* [Internet]. 2009;16(11):1576–82.
15. Vermeersch P, Geboes K, Mariën G, Hoffman I, Hiele M, Bossuyt X. Serological diagnosis of celiac disease: Comparative analysis of different strategies. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2012;413(21–23):1761–7.
16. Ludvigsson JF, Bai JC, Biagi F, Card TR, Ciacci C, Ciclitira PJ, et al. Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. *Gut* [Internet]. 2014 Aug;63(8):1210–28.

17. Gujral N, Freeman HJ, Thomson ABR. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. Vol. 18, World Journal of Gastroenterology. 2012. p. 6036–59.
18. Husby S, Murray JA. Diagnosing coeliac disease and the potential for serological markers. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2014 Sep 30;11(11):655–63.
19. Derikx JPM, Vreugdenhil ACE, Van den Neucker AM, Grootjans J, van Bijnen A a, Damoiseaux JGMC, et al. A pilot study on the noninvasive evaluation of intestinal damage in celiac disease using I-FABP and L-FABP. *J Clin Gastroenterol* [Internet]. 2009 Sep;43(8):727–33.
20. Vreugdenhil AC, Wolters VM, Adriaanse MP, Van den Neucker AM, van Bijnen AA, Houwen R, et al. Additional value of serum I-FABP levels for evaluating celiac disease activity in children. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2011;46(12):1435–41.
21. Adriaanse MPM, Tack GJ, Passos VL, Damoiseaux JGMC, Schreurs MWJ, van Wijck K, et al. Serum I-FABP as marker for enterocyte damage in coeliac disease and its relation to villous atrophy and circulating autoantibodies. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2013 Feb;37(4):482–90.
22. Hoffmanová I, Sánchez D, Hábová V, Anděl M, Tučková L, Tlaskalová-Hogenová H. Serological markers of enterocyte damage and apoptosis in patients with celiac disease, autoimmune diabetes mellitus and diabetes mellitus type 2. *Physiol Res Sci Bohemoslov* [Internet]. 2014;8408(64):537–46.
23. Bottasso Arias NM, García M, Bondar C, Guzman L, Redondo A, Chopita N, et al. Expression Pattern of Fatty Acid Binding Proteins in Celiac Disease Enteropathy. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2015;2015:1–11.
24. Planas R, Pujol-Autonell I, Ruiz E, Montraveta M, Cabre E, Lucas-Martin A, et al. Regenerating gene α is a biomarker for diagnosis and monitoring of celiac disease: a preliminary study. *Transl Res* [Internet]. 2011 Sep;158(3):140–5.
25. Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac disease. *Lancet* [Internet]. 2009;373(9673):1480–93.

26. Dowd B, Walker-Smith J. Samuel Gee, Aretaeus, and the coeliac affection. *Br Med J* [Internet]. 1974;2(5909):45–7.
27. Losowsky MS. A history of coeliac disease. *Digestive Diseases*. 2008.
28. van Berge-Henegouwen GP, Mulder CJ. Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten free diet. *Gut* [Internet]. 1993 Nov 1;34(11):1473–5.
29. ALVEY C, ANDERSON CM, FREEMAN M. Wheat gluten and coeliac disease. *Arch Dis Child* [Internet]. 1957 Oct;32(165):434–7.
30. Goh VL, Werlin SL. Discovery of gluten as the injurious component in celiac disease. *Nutr Clin Pract* [Internet]. 2011;26(2):160–2.
31. Auricchio S, Troncone R. History of coeliac disease. *Eur J Pediatr* [Internet]. 1996 Jun;155(6):427–8.
32. Paulley JW. Observations on the Aetiology of Idiopathic Steatorrhoea. *BMJ* [Internet]. 1954 Dec 4;2(4900):1318–21.
33. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology* [Internet]. 1992 Jan;102(1):330–54.
34. Paveley WF. From Aretaeus to Crosby: a history of coeliac disease. *Bmj* [Internet]. 1988;297(6664):1646–9.
35. Davidson LSP, Fountain JR. Incidence of the sprue syndrome. *Br Med J*. 1950;1(4663):1157.
36. Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, Laurila K, Collin P, Rissanen H, et al. Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(9):1217–25.
37. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology*. 2001;120(3):636–51.
38. Reilly NR, Fasano A, Green PHR. Presentation of Celiac Disease. *Gastrointest Endosc Clin N Am* [Internet]. 2012;22(4):613–21.

39. Fasano A, Catassi C. Celiac Disease. *N Engl J Med*. 2012;25367(20):2419–26.
40. Chorzelski TP, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonska S, Beutner EH, Kumar V. IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Ann N Y Acad Sci [Internet]*. 1983 Dec;420(1 Defined Immun):325–34.
41. Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho K-L, Korponay-Szabó IR, Sarnesto A, et al. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology*. 1998;115(6):1322–8.
42. Dieterich W, Laag E, Schopper H, Volta U, Ferguson A, Gillett H, et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology*. 1998;115(6):1317–21.
43. West J. Seroprevalence, correlates, and characteristics of undetected coeliac disease in England. *Gut [Internet]*. 2003 Jul 1;52(7):960–5.
44. Dubé C, Rostom A, Sy R, Cranney A, Saloojee N, Garritty C, et al. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: A systematic review [Internet]. Vol. 128, *Gastroenterology*. 2005. p. S57–67.
45. Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekelä I, Patrikainen H, Valve R, et al. Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in elderly people: a population-based study. *BMC Gastroenterol [Internet]*. 2009;9(1):49.
46. Almeida LM, Castro LC, Uenishi RH, de Almeida FC, Fritsch PM, Gandolfi L, et al. Decreased prevalence of celiac disease among Brazilian elderly. *World J Gastroenterol [Internet]*. 2013 Mar 28;19(12):1930–5.
47. 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.
48. Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, Mcmillan S, et al. The prevalence of celiac disease in Europe: Results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med*. 2010;42(8):587–95.

49. Ludvigsson JF, Card TR, Kaukinen K, Bai J, Zingone F, Sanders DS, et al. Screening for celiac disease in the general population and in high-risk groups. *United Eur Gastroenterol J* [Internet]. 2015;3(2):106–20.
50. Bai D, Brar P, Holleran S, Ramakrishnan R, Green PHR. Effect of gender on the manifestations of celiac disease: Evidence for greater malabsorption in men. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2005 Feb 8;40(2):183–7.
51. Catassi C, Rättsch IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Asmar R, et al. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet*. 1999;354(9179):647–8.
52. 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.
53. Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA, Cortez AJP, Carvalho FO, Bordin JO, et al. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2007 Jan;19(1):43–9.
54. Melo SBC, Fernandes MIM, Peres LC, Troncon LEA, Galvão LC. Prevalence and demographic characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. *Dig Dis Sci*. 2006;51(5):1020–5.
55. Pereira MAG, Ortiz-Agostinho CL, Nishitokukado I, Sato M-N, Damião AOMC, Alencar ML, et al. Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2006 Oct 28;12(40):6546–50.
56. Vaquero L, Caminero A, Nuñez A, Hernando M, Iglesias C, Casqueiro J, et al. Coeliac disease screening in first-degree relatives on the basis of biopsy and genetic risk. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2014;26(3):263–7.
57. Kahaly GJ, Schuppan D. Celiac Disease: Clinical Perspective Celiac Disease and Endocrine Autoimmunity. *Dig Dis* [Internet]. 2015 Apr 22;33(2):155–61.

58. Reunala T, Salmi TT, Hervonen K. Dermatitis herpetiformis: pathognomonic transglutaminase IgA deposits in the skin and excellent prognosis on a gluten-free diet. *Acta Derm Venereol* [Internet]. 2015 Nov;95(8):917–22.
59. Ludvigsson JF. Mortality and Malignancy in Celiac Disease. Vol. 22, *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*. 2012. p. 705–22.
60. Mäki M, Collin P. Coeliac disease. *Lancet* (London, England) [Internet]. 1997 Jun 14;349(9067):1755–9.
61. Lionetti E, Catassi C. New Clues in Celiac Disease Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Manifestations, and Treatment. *Int Rev Immunol* [Internet]. 2011 Jul 29;30(4):219–31.
62. Pinto-Sanchez MI, Bercik P, Verdu EF, Bai JC, Leffler DA, Green PHR, et al. Extraintestinal manifestations of coeliac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2015;12(10):561–71.
63. Leffler DA, Green PHR, Fasano A. Extraintestinal manifestations of coeliac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2015;12(10):561–71.
64. Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PHR, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*. 2013;62(1):43–52.
65. Sapone A, Bai JC, Ciacci C, Dolinsek J, Green PH, Hadjivassiliou M, et al. Spectrum of gluten-related disorders: consensus on new nomenclature and classification. *BMC Med* [Internet]. 2012;10(1):13.
66. Tosco A, Aitoro R, Auricchio R, Ponticelli D, Miele E, Paparo F, et al. Intestinal anti-tissue transglutaminase antibodies in potential coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. 2013;171(1):69–75.
67. Tosco A, Salvati VM, Auricchio R, Maglio M, Borrelli M, Coruzzo A, et al. Natural History of Potential Celiac Disease in Children. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2011;9(4):320–5.
68. Hadjivassiliou M. Gluten ataxia in perspective: epidemiology, genetic susceptibility and clinical characteristics. *Brain* [Internet]. 2003 Mar 1;126(3):685–91.

69. Kakleas K, Soldatou A, Karachaliou F, Karavanaki K. Associated autoimmune diseases in children and adolescents with type 1 diabetes mellitus (T1DM). *Autoimmun Rev* [Internet]. 2015 Sep;14(9):781–97.
70. Gerven van NMF, Bakker SF, Boer de YS, Witte BI, Bontkes H, Nieuwkerk van CMJ, et al. Seroprevalence of celiac disease in patients with autoimmune hepatitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2014;26(10):1104–7.
71. Hadjivassiliou M, Sanders DD, Aeschlimann DP. Gluten-Related Disorders: Gluten Ataxia. *Dig Dis* [Internet]. 2015;33(2):264–8.
72. Akirov A. Co-occurrence of type 1 diabetes mellitus and celiac disease. *World J Diabetes* [Internet]. 2015 Jun 10;6(5):707.
73. Goldacre MJ, Seminog OO. Turner syndrome and autoimmune diseases: record-linkage study. *Arch Dis Child* [Internet]. 2014 Jan 1;99(1):71–3.
74. Depince-Berger A, Cremilleux C, Rinaudo-Gaujous M, Genin C, de Freminville B, Lambert C, et al. A Difficult and Rare Diagnosis of Autoimmune Enteropathy in a Patient Affected by Down Syndrome. *J Clin Immunol* [Internet]. 2016;36(5):423–8.
75. Collin P, Kaukinen K, Välimäki M, Salmi J. Endocrinological disorders and celiac disease. *Endocr Rev*. 2002;23(4):464–83.
76. Della Libera I, Martelossi S, Tommasini A. Selective IgA deficiency: Ruling out coeliac disease and selective antibody deficiency to polysaccharides. Vol. 33, *Journal of Clinical Immunology*. 2013. p. 1149.
77. McGowan KE, Lyon ME, Butzner JD. Celiac disease and IgA deficiency: Complications of serological testing approaches encountered in the clinic. Vol. 54, *Clinical Chemistry*. 2008. p. 1203–9.
78. Salmi TT, Hervonen K, Kautiainen H, Collin P, Reunala T. Prevalence and incidence of dermatitis herpetiformis: a 40-year prospective study from Finland. *Br J Dermatol* [Internet]. 2011 Aug;165(2):354–9.
79. Rashtak S, Rashtak S, Snyder MR, Pittcock SJ, Wu TT, Gandhi MJ, et al. Serology of celiac disease in gluten-sensitive ataxia or neuropathy: Role of deamidated gliadin antibody. *J Neuroimmunol*. 2011;230(1–2):130–4.

80. Green PHR, Krishnareddy S, Lebwohl B. Clinical Manifestations of Celiac Disease. *Dig Dis* [Internet]. 2015 Apr 22;33(2):137–40.
81. Singh P, Arora S, Makharia GK. Presence of anemia in patients with celiac disease suggests more severe disease. *Indian J Gastroenterol* [Internet]. 2014 Mar 19;33(2):161–4.
82. Hijaz NM, Bracken JM, Chandratre SR. Celiac crisis presenting with status epilepticus and encephalopathy. *European Journal of Pediatrics* [Internet]. 2013 Dec 31;1–4.
83. Licchetta L, Bisulli F, Di Vito L, La Morgia C, Naldi I, Volta U, et al. Epilepsy in coeliac disease: Not just a matter of calcifications. *Neurol Sci*. 2011;32(6):1069–74.
84. Pratesi R, Modelli IC, Martins RC, Almeida PL, Gandolfi L. Celiac disease and epilepsy: favorable outcome in a child with difficult to control seizures. *Acta Neurol Scand* [Internet]. 2003 Oct;108(4):290–3.
85. Mäki M, Aine L, Lipsanen V, Koskimies S. Dental enamel defects in first-degree relatives of coeliac disease patients. *Lancet (London, England)* [Internet]. 1991 Mar 30;337(8744):763–4.
86. Cheng J, Malahias T, Brar P, Minaya MT, Green PHR. The association between celiac disease, dental enamel defects, and aphthous ulcers in a United States cohort. *J Clin Gastroenterol*. 2010;44(3):191–4.
87. Katz S, Weirnerman S. Osteoporosis and gastrointestinal disease. *Gastroenterol Hepatol*. 2010;6(8):506–17.
88. Singh P, Arora S, Lal S, Strand TA, Makharia GK. Celiac Disease in Women With Infertility. *J Clin Gastroenterol* [Internet]. 2016;50(1):33–9.
89. Dhalwani NN, West J, Sultan AA, Ban L, Tata LJ. Women with celiac disease present with fertility problems no more often than women in the general population. *Gastroenterology*. 2014;147(6):1267–1274.e1.
90. Zugna D, Richiardi L, Akre O, Stephansson O, Ludvigsson JF. A nationwide population-based study to determine whether coeliac disease is associated with infertility. *Gut* [Internet]. 2010;59(11):1471–5.

91. Molteni N, Bardella MT, Bianchi PA. Obstetric and gynecological problems in women with untreated celiac sprue. *J Clin Gastroenterol*. 1990;12(1):37–9.
92. Sharshiner R, Romero ST, Bardsley TR, Branch DW, Silver RM. Celiac disease serum markers and recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol*. 2013;100(2):104–8.
93. Sisley S, Trujillo MV, Khoury J, Backeljauw P. Low incidence of pathology detection and high cost of screening in the evaluation of asymptomatic short children. *J Pediatr*. 2013;
94. Elli L, Contiero P, Tagliabue G, Tomba C, Bardella MT. Risk of intestinal lymphoma in undiagnosed coeliac disease: Results from a registered population with different coeliac disease prevalence. *Dig Liver Dis [Internet]*. 2012;44(9):743–7.
95. Malamut G, Verkarre V, Callens C, Colussi O, Rahmi G, MacIntyre E, et al. Enteropathy-associated T-cell lymphoma complicating an autoimmune enteropathy. *Gastroenterology [Internet]*. 2012;142(4):726-729-4.
96. Stagi S, Simonini G, Ricci L, de Martino M, Falcini F. Coeliac disease in patients with Kawasaki disease. Is there a link? *Rheumatology*. 2006;45(7):847–50.
97. Sharma M, Singh P, Agnihotri A, Das P, Mishra A, Verma AK, et al. Celiac disease: A disease with varied manifestations in adults and adolescents. *J Dig Dis*. 2013;14:518–25.
98. Ludvigsson JF, Rubio-Tapia A, Chowdhary V, Murray JA, Simard JF. Increased risk of systemic lupus erythematosus in 29,000 patients with biopsy-verified celiac disease. *J Rheumatol*. 2012;39(10):1964–70.
99. Poulain C, Johanet C, Delcroix C, Lévy-Marchal C, Tubiana-Rufi N. Prevalence and clinical features of celiac disease in 950 children with type 1 diabetes in France. *Diabetes Metab [Internet]*. 2007;33(6):453–8.
100. Hall RK. Prevalence of developmental defects of tooth enamel (DDE) in a pediatric hospital department of dentistry population (1). *Adv Dent Res [Internet]*. 1989 Sep;3(2):114–9.

101. Zamani F, Shahram F, Shakeri R, Zayyeni H, Davatchi F, Amiri A, et al. Prevalence of celiac disease among patients with Behcet's disease in Iran. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2009 Aug;54(8):1736–9.
102. Megiorni F, Mora B, Bonamico M, Barbato M, Nenna R, Maiella G, et al. HLA-DQ and risk gradient for celiac disease. *Hum Immunol*. 2009;70(1):55–9.
103. Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, et al. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut* [Internet]. 2002;50(5):624–8.
104. Bevan S, Popat S, Braegger CP, Busch A, O'Donoghue D, Falth-Magnusson K, et al. Contribution of the MHC region to the familial risk of coeliac disease. *J Med Genet* [Internet]. 1999 Sep;36(9):687–90.
105. Freeman HJ. Risk factors in familial forms of celiac disease. *World J Gastroenterol*. 2010;16(15):1828–31.
106. Lebowl B. Celiac Disease and the Forgotten 10 %: The “Silent Minority.” *Dig Dis Sci* [Internet]. 2015 Jun 10;60(6):1517–8.
107. Gutierrez-Achury J, Coutinho de Almeida R, Wijmenga C. Shared genetics in coeliac disease and other immune-mediated diseases. In: *Journal of Internal Medicine*. 2011. p. 591–603.
108. Sollid LM, Lie BA. Celiac disease genetics: current concepts and practical applications. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2005 Sep;3(9):843–51.
109. Trynka G, Wijmenga C, van Heel DA. A genetic perspective on coeliac disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2010.
110. Stokes. Inheritance and influence of histocompatibility (HL-A) antigens in adult coeliac disease. *Gut* [Internet]. 1973;14(8):627–30.
111. Doğan Y, Yildirmaz S, Ozercan IH. Prevalence of celiac disease among first-degree relatives of patients with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2012;55(2):205–8.

112. Muniz JG, Sdepanian VL, Fagundes U. Prevalence of Genetic Susceptibility for Celiac Disease in Blood Donors in São Paulo, Brazil. *Arq Gastroenterol* [Internet]. 2016;53(4):267–72.
113. Sollid L, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med* [Internet]. 1989;169(January):345–50.
114. Sollid LM. Molecular basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2000;18(1):53–81.
115. Spurkland A, Sollid LM, Polanco I, Vartdal F, Thorsby E. HLA-DR and -DQ genotypes of celiac disease patients serologically typed to be non-DR3 or non-DR5/7. *Hum Immunol*. 1992;35(3):188–92.
116. Ferguson A, Carr KE, MacDonald TT, Watt C. Hypersensitivity Reactions in the Small Intestine. *Digestion* [Internet]. 2009 Jan 27;18(1–2):56–63.
117. Ferguson A, McClure JP, Macdonald TT, Holden RJ. Cell-mediated immunity to gliadin within the small-intestinal mucosa in coeliac disease. *Lancet*. 1975;305(7912):895–7.
118. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2011 Apr 23;29(1):493–525.
119. Barone M, Troncone R, Auricchio S. Gliadin Peptides as Triggers of the Proliferative and Stress/Innate Immune Response of the Celiac Small Intestinal Mucosa. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2014;15(11):20518–37.
120. Abadie V, Discepolo V, Jabri B. Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Semin Immunopathol*. 2012;34(4):551–6.
121. WHO and FAO. CODEX Alimentarius Cereals, pulses, legumes and vegetable proteins. CODEX STANDARD FOR CERTAIN PULSES CODEX STAN 171-1989 (Rev. 1-1995). 2007.

122. Vader W, Stepniak DB. Basic-Alimentary Tract - Characterization of Cereal Toxicity for Celiac Disease Patients Based on Protein Homology in Grains. *Gastroenterology*. 2003;5085(3):1105–13.
123. Wieser H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol*. 2007;24(2):115–9.
124. Fasano A. Zonulin and Its Regulation of Intestinal Barrier Function: The Biological Door to Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Physiol Rev* [Internet]. 2011 Jan 1;91(1):151–75.
125. Shewry PR. Wheat. *J Exp Bot* [Internet]. 2009;60(6):1537–53.
126. Popineau Y, Deshayes G, Lefebvre J, Fido R, Tatham AS, Shewry PR. Prolamin aggregation, gluten viscoelasticity, and mixing properties of transgenic wheat lines expressing 1ax and 1dx high molecular weight glutenin subunit transgenes. *J Agric Food Chem*. 2001;49(1):395–401.
127. Dong K, Hao CY, Wang a. L, Cai MH, Yan YM. Characterization of HMW glutenin subunits in bread and tetraploid wheats by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Cereal Res Commun* [Internet]. 2009;37(1):65–73.
128. Molberg O, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* [Internet]. 1998 Jun;4(6):713–7.
129. Jang TH, Lee DS, Choi K, Jeong EM, Kim IG, Kim YW, et al. Crystal structure of transglutaminase 2 with GTP complex and amino acid sequence evidence of evolution of GTP binding site. *PLoS One*. 2014;9(9):1–8.
130. Di Sabatino A, Vanoli A, Giuffrida P, Luinetti O, Solcia E, Corazza GR. The function of tissue transglutaminase in celiac disease [Internet]. Vol. 11, *Autoimmunity Reviews*. Elsevier B.V.; 2012. p. 746–53.
131. Camilleri M, Madsen K, Spiller R, Greenwood-Van Meerveld B, Van Meerveld BG, Verne GN. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil* [Internet]. 2012;24(6):503–12.

132. Fagundes-Neto U, Scaletsky IC. The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. Vol. 118, Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina. 2000. p. 21–9.
133. Fagundes-Neto U, Freymuller E, Gatti MS, Schmitz LG, Scaletsky I. Ultrastructural study of enteropathogenic *Escherichia coli* O111ab:H2 infection in an infant with acute diarrhea. *Arq Gastroenterol*. 1995;32(3):152–7.
134. Franco Scaldaferrri, MD M, Pizzoferrato, MD, Viviana Gerardi, MD, Loris Lopetuso, MD, and Antonio Gasbarrini, MD, PhD Gasbarrini A. The gut barrier: new acquisitions and therapeutic approaches. *J Clin Gastroenterol*. 2012;46(October):12–7.
135. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, Ockhuizen T, Schulzke J-D, Serino M, et al. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2014;14(1):189.
136. Fasano A. Physiological, pathological, and therapeutic implications of zonulin-mediated intestinal barrier modulation. *Am J Pathol* [Internet]. 2008;173(5):1243–52.
137. Fasano A. Zonulin, regulation of tight junctions, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1258(1):25–33.
138. Matysiak-Budnik T, Moura IC, Arcos-Fajardo M, Lebreton C, Ménard S, Candalh C, et al. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med* [Internet]. 2008;205(1):143–54.
139. Lebreton C, Ménard S, Abed J, Moura IC, Coppo R, Dugave C, et al. Interactions among secretory immunoglobulin A, CD71, and transglutaminase-2 affect permeability of intestinal epithelial cells to gliadin peptides. *Gastroenterology* [Internet]. 2012;143(3):698-707-4.
140. Ménard S, Lebreton C, Schumann M, Matysiak-Budnik T, Dugave C, Bouhnik Y, et al. Paracellular versus transcellular intestinal permeability to gliadin peptides in active celiac disease. *Am J Pathol* [Internet]. 2012;180(2):608–15.

141. Stammaes J, Sollid LM. Celiac disease: Autoimmunity in response to food antigen. Vol. 27, *Seminars in Immunology*. 2015. p. 343–52.
142. Cardoso I, Stammaes J, Andersen JT, Melino G, Iversen R, Sollid LM. Transglutaminase 2 interactions with extracellular matrix proteins as probed with celiac disease autoantibodies. *FEBS J* [Internet]. 2015 Jun;282(11):2063–75.
143. Maglio M, Tosco A, Auricchio R, Paparo F, Colicchio B, Miele E, et al. Intestinal deposits of anti-tissue transglutaminase IgA in childhood celiac disease. *Dig Liver Dis* [Internet]. 2011;43(8):604–8.
144. Sollid LM, Qiao S-WW, Anderson RP, Gianfrani C, Koning F. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics* [Internet]. 2012;64(6):455–60.
145. Kim C-YC-Y, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C, Sollid LM. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2004;101(12):4175–9.
146. Henderson KN, Tye-Din JA, Reid HH, Chen Z, Borg NA, Beissbarth T, et al. A Structural and Immunological Basis for the Role of Human Leukocyte Antigen DQ8 in Celiac Disease. *Immunity*. 2007;27(1):23–34.
147. Jabri B, Chen X, Sollid LM. How T cells taste gluten in celiac disease. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2014;21(5):429–31.
148. Vader W, Stepniak D, Kooy Y, Mearin L, Thompson A, van Rood JJ, et al. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12390–5.
149. Sollid LM, Jabri B. Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(4):294–302.
150. Shan L. Structural Basis for Gluten Intolerance in Celiac Sprue. *Science* (80-) [Internet]. 2002;297(5590):2275–9.

151. Biancheri P, Di Sabatino A, Rescigno M, Giuffrida P, Fornasa G, Tsilingiri K, et al. Abnormal thymic stromal lymphopoietin expression in the duodenal mucosa of patients with coeliac disease. *Gut* [Internet]. 2016 Oct;65(10):1670–80.
152. Monteleone I, Sarra M, Del Vecchio Blanco G, Paoluzi OA, Franzè E, Fina D, et al. Characterization of IL-17A-producing cells in celiac disease mucosa. *J Immunol*. 2010;184(4):2211–8.
153. Lahdenpera AI, Falth-Magnusson K, Hogberg L, Ludvigsson J, Vaarala O. Expression pattern of T-helper 17 cell signaling pathway and mucosal inflammation in celiac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2014;49(2):145–56.
154. Ciccocioppo R, Finamore A, Ara C, Di Sabatino A, Mengheri E, Corazza GR. Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease. *Am J Clin Pathol*. 2006;125(4):502–11.
155. Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cupelli F, Cinque B, Millimaggi D, Clarkson MM, et al. Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut*. 2006;55(4):469–77.
156. Marafini I, Monteleone I, Di Fusco D, Cupi ML, Paoluzi OA, Colantoni A, et al. TNF- α Producing Innate Lymphoid Cells (ILCs) Are Increased in Active Celiac Disease and Contribute to Promote Intestinal Atrophy in Mice. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(5):e0126291.
157. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Bauer M, Della Riccia DN, Bizzini F, Biagi F, et al. Matrix metalloproteinase pattern in celiac duodenal mucosa. *Lab Invest* [Internet]. 2005;85(3):397–407.
158. van Bergen J, Mulder CJ, Mearin ML, Koning F. Local communication among mucosal immune cells in patients with celiac disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2015 May;148(6):1187–94.
159. Di Sabatino A, Lenti MV, Giuffrida P, Vanoli A, Corazza GR. New insights into immune mechanisms underlying autoimmune diseases of the gastrointestinal tract. *Autoimmun Rev* [Internet]. 2015 Dec;14(12):1161–9.

160. Fina D, Sarra M, Caruso R, Del Vecchio Blanco G, Pallone F, MacDonald TT, et al. Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease. *Gut*. 2008;57(7):887–92.
161. Biancheri P, Giuffrida P, Docena GH, MacDonald TT, Corazza GR, Di Sabatino A. The role of transforming growth factor (TGF)- β in modulating the immune response and fibrogenesis in the gut. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2014;25(1):45–55.
162. Abadie V, Jabri B. IL-15: A central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunol Rev*. 2014;260(1):221–34.
163. Setty M, Discepolo V, Abadie V, Kamhawi S, Mayassi T, Kent A, et al. Distinct and Synergistic Contributions of Epithelial Stress and Adaptive Immunity to Functions of Intraepithelial Killer Cells and Active Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2015;149(3):681e10-691e10.
164. Harris KM, Fasano A, Mann DL. Monocytes differentiated with IL-15 support Th17 and Th1 responses to wheat gliadin: Implications for celiac disease. *Clin Immunol*. 2010;135(3):430–9.
165. Zanzi D, Stefanile R, Santagata S, Iaffaldano L, Iaquinto G, Giardullo N, et al. IL-15 Interferes With Suppressive Activity of Intestinal Regulatory T Cells Expanded in Celiac Disease. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2011;106(7):1308–17.
166. Kimura A, Kishimoto T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur J Immunol*. 2010;40(7):1830–5.
167. Meresse B, Curran S a, Ciszewski C, Orbelyan G, Setty M, Bhagat G, et al. Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *J Exp Med*. 2006;203(5):1343–55.
168. Jabri B, Abadie V. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2015 Nov 16;15(12):771–83.

169. Meresse B, Korneychuk N, Malamut G, Cerf-Bensussan N. Interleukin-15, a Master Piece in the Immunological Jigsaw of Celiac Disease. *Dig Dis* [Internet]. 2015;33(2):122–30.
170. Korneychuk N, Ramiro-Puig E, Etersperger J, Schulthess J, Montcuquet N, Kiyono H, et al. Interleukin 15 and CD4+ T cells cooperate to promote small intestinal enteropathy in response to dietary antigen. *Gastroenterology* [Internet]. 2014;146(4):1017–27.
171. Jabri B, Sollid LM. Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009;9(12):858–70.
172. Bhagat G, Naiyer AJ, Shah JG, Harper J, Jabri B, Wang TC, et al. Small intestinal CD8+TCR $\gamma\delta$ +NKG2A+ intraepithelial lymphocytes have attributes of regulatory cells in patients with celiac disease. *J Clin Investig* <http://www.jci.org>. 2008;118(1):281–93.
173. Malamut G, Meresse B, Verkarre V, Kaltenbach S, Montcuquet N, Duong Van Huyen J-P, et al. Large granular lymphocytic leukemia: a treatable form of refractory celiac disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2012;143(6):1470–1472.e2.
174. Piacentini M, Colizzi V. Tissue transglutaminase: Apoptosis versus autoimmunity [Internet]. Vol. 20, *Immunology Today*. 1999. p. 130–4.
175. Hùe S, Mention J-J, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C, Schmitz J, et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* [Internet]. 2004;21(3):367–77.
176. Allegretti YL, Bondar C, Guzman L, Cueto Rua E, Chopita N, Fuertes M, et al. Broad MICA/B expression in the small bowel mucosa: a link between cellular stress and celiac disease. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(9):e73658.
177. Mazzarella G, Stefanile R, Camarca A, Giliberti P, Cosentini E, Marano C, et al. Gliadin Activates HLA Class I-Restricted CD8+ T Cells in Celiac Disease Intestinal Mucosa and Induces the Enterocyte Apoptosis. *Gastroenterology*. 2008;134(4):1017–27.

178. Stephens HAF. MICA and MICB genes: Can the enigma of their polymorphism be resolved? Vol. 22, Trends in Immunology. 2001. p. 378–85.
179. Han A, Newell EW, Glanville J, Fernandez-Becker N, Khosla C, Chien Y-H, et al. Dietary gluten triggers concomitant activation of CD4+ and CD8+ $\alpha\beta$ T cells and $\gamma\delta$ T cells in celiac disease. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2013;110(32):13073–8.
180. Meresse B, Chen Z, Ciszewski C, Tretiakova M, Bhagat G, Krausz TN, et al. Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. Immunity. 2004;21(3):357–66.
181. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, et al. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. Science. 1999;285(5428):727–9.
182. Oberhuber G. Histopathology of celiac disease. Biomed Pharmacother = Biomédecine pharmacothérapie [Internet]. 2000 Aug;54(7):368–72.
183. Ensari A. Gluten-sensitive enteropathy (celiac disease): controversies in diagnosis and classification. Arch Pathol Lab Med [Internet]. 2010 Jun;134(6):826–36.
184. Husby S, Murray JA. Defining Thresholds of Antibody Levels Improves Diagnosis of Celiac Disease: Replacing the Gold Standard. Clin Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2013;11(4):404–5.
185. Bao F, Green PHR, Bhagat G. An update on celiac disease histopathology and the road ahead. Arch Pathol Lab Med [Internet]. 2012 Jul;136(7):735–45.
186. Serra S, Jani PA. An approach to duodenal biopsies. J Clin Pathol [Internet]. 2006 May 5;59(11):1133–50.
187. Meresse B, Malamut G, Cerf-Bensussan N. Celiac Disease: An Immunological Jigsaw. Immunity [Internet]. 2012;36(6):907–19.
188. Nielsen JA, Steephen A, Lewin M. Angiotensin-II inhibitor (olmesartan)-induced collagenous sprue with resolution following discontinuation of drug. World J Gastroenterol. 2013;19(40):6928–30.

189. Sanford ML, Nagel AK. A Review of Current Evidence of Olmesartan Medoxomil Mimicking Symptoms of Celiac Disease. *J Pharm Pract* [Internet]. 2015 Apr 1;28(2):189–92.
190. Rubio–Tapia A, Kyle RA, Kaplan EL, Johnson DR, Page W, Erdtmann F, et al. Increased Prevalence and Mortality in Undiagnosed Celiac Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2009;137(1):88–93.
191. Giersiepen K, Lelgemann M, Stuhldreher N, Ronfani L, Husby S, Koletzko S, et al. Accuracy of diagnostic antibody tests for coeliac disease in children: summary of an evidence report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2012;54(2):229–41.
192. Bonamico M, Ferri M, Mariani P, Nenna R, Thanasi E, Luparia RPL, et al. Serologic and Genetic Markers of Celiac Disease: A Sequential Study in the Screening of First Degree Relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2006 Feb;42(2):150–4.
193. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1 *05-DQB1 *02 (DQ2) heterodimer: Results from the European genetics cluster on celiac disease. *Hum Immunol*. 2003;64(4):469–77.
194. Bai J, Zeballos E, Fried M, Corraza G. World Gastroenterology Organisation Practice Guidelines: Celiac disease. *World Gastroenterol Organ* [Internet]. 2013;48(2):1–18.
195. Jeon MK. Intestinal barrier: Molecular pathways and modifiers. *World J Gastrointest Pathophysiol* [Internet]. 2013;4(4):94.
196. Kelly CP, Bai JC, Liu E, Leffler DA. Advances in Diagnosis and Management of Celiac Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2015;148(6):1175–86.
197. Vives-pi M, Takasawa S, Pujol-autonell I, Planas R, Cabre E, Ojanguren I, et al. Biomarkers for diagnosis and monitoring of celiac disease. *J Clin Gastroenterol* [Internet]. 2013;47(4):308–13.

198. Bienvenu F, Anghel SI, Besson Duvanel C, Guillemaud J, Garnier L, Renosi F, et al. Early diagnosis of celiac disease in IgA deficient children: contribution of a point-of-care test. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2014;14(1):186.
199. Wang N, Truedsson L, Elvin K, Andersson BA, R?nnelid J, Mincheva-Nilsson L, et al. Serological assessment for celiac disease in IgA deficient adults. *PLoS One*. 2014;
200. Sacchettini JC, Haufft SM, Van Camp SL, Cistola DP, Gordon JI. Developmental and structural studies of an intracellular lipid binding protein expressed in the ileal epithelium. *J Biol Chem*. 1990;265(31):19199–207.
201. Alpers DH, Bass NM, Engle MJ, DeSchryver-Kecsckemeti K. Intestinal fatty acid binding protein may favor differential apical fatty acid binding in the intestine. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2000;1483(3):352–62.
202. Storch J, Corsico B. The Emerging Functions and Mechanisms of Mammalian Fatty Acid–Binding Proteins. *Annu Rev Nutr* [Internet]. 2008 Aug;28(1):73–95.
203. Storch J, McDermott L. Structural and functional analysis of fatty acid-binding proteins. *J Lipid Res* [Internet]. 2009 Apr;50(Supplement):S126–31.
204. Furuhashi M, Hotamisligil GS. Fatty acid-binding proteins: role in metabolic diseases and potential as drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(june):489–503.
205. Ockner RK, Manning JA. Fatty acid-binding protein in small intestine. Identification, isolation, and evidence for its role in cellular fatty acid transport. *J Clin Invest* [Internet]. 1974;54(2):326–38.
206. Lagakos WS, Gajda AM, Agellon L, Binas B, Choi V, Mandap B, et al. Different functions of intestinal and liver-type fatty acid-binding proteins in intestine and in whole body energy homeostasis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300(5):G803–14.
207. Gajda AM, Storch J. Enterocyte fatty acid-binding proteins (FABPs): Different functions of liver and intestinal FABPs in the intestine. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids* [Internet]. 2015 Feb;93:9–16.

208. Kaikaus RM, Bass NM, Ockner RK. Functions of fatty acid binding proteins. *Experientia* [Internet]. 1990 Jun 15;46(6):617–30.
209. Bass NM. Function and regulation of hepatic and intestinal fatty acid binding proteins. *Chem Phys Lipids* [Internet]. 1985 Aug;38(1–2):95–114.
210. Pelsers MMA., Namiot Z, Kisielowski W, Namiot A, Januszkiewicz M, Hermens WT, et al. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin Biochem* [Internet]. 2003 Oct;36(7):529–35.
211. Matsumoto S, Sekine K, Funaoka H, Yamazaki M, Shimizu M, Hayashida K, et al. Diagnostic performance of plasma biomarkers in patients with acute intestinal ischaemia. *Br J Surg* [Internet]. 2014 Feb;101(3):232–8.
212. Güzel M, Sözüer EM, Salt Ö, İkizceli İ, Akdur O, Yazıcı C. The value of the serum I-FABP level for diagnosing acute mesenteric ischemia. *Surg Today*. 2014;44(11):2072–6.
213. Khadaroo RG, Fortis S, Salim SY, Streutker C, Churchill TA, Zhang H. I-FABP as biomarker for the early diagnosis of acute mesenteric ischemia and resultant lung injury. *PLoS One*. 2014;9(12):1–16.
214. Not T, Ziberna F, Vatta S, Quaglia S, Martelossi S, Villanacci V, et al. Cryptic genetic gluten intolerance revealed by intestinal antitransglutaminase antibodies and response to gluten-free diet. *Gut* [Internet]. 2011 Nov 1;60(11):1487–93.
215. Adriaanse MPM, Leffler DA, Kelly CP, Schuppan D, Najarian RM, Goldsmith JD, et al. Serum I-FABP Detects Gluten Responsiveness in Adult Celiac Disease Patients on a Short-Term Gluten Challenge. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2016 Jul 17;111(7):1014–22.
216. Zhang Y, Ding L, Lai M. Reg gene family and human diseases. *World J Gastroenterol*. 2003;9(12):2635–41.
217. Parikh A, Stephan A-F, Tzanakakis ES. Regenerating proteins and their expression, regulation, and signaling. *Biomol Concepts* [Internet]. 2012 Jan 1;3(1):57–70.

218. Ose T, Kadowaki Y, Fukuhara H, Kazumori H, Ishihara S, Udagawa J, et al. Reg I-knockout mice reveal its role in regulation of cell growth that is required in generation and maintenance of the villous structure of small intestine. *Oncogene* [Internet]. 2007 Jan 18;26(3):349–59.
219. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J*. 2005;272(24):6179–217.
220. Sarles H, Sarles JC, Camatte R, Muratore R, Gaini M, Guien C, et al. Observations on 205 confirmed cases of acute pancreatitis, recurring pancreatitis, and chronic pancreatitis. *Gut* [Internet]. 1965;6(6):545–59.
221. Terazono K, Uchiyama Y, Ide M, Watanabe T, Yonekura H, Yamamoto H, et al. Expression of reg protein in rat regenerating islets and its co-localization with insulin in the Beta cell secretory granules. *Diabetologia*. 1990;33:250–2.
222. Montalto G, Bonicel J, Multigner L, Rovey M, Sarles H, De Caro A. Partial amino acid sequence of human pancreatic stone protein, a novel pancreatic secretory protein. *Biochem J*. 1986;238(1):227–32.
223. Terazono K, Yamamoto H, Takasawa S, Shiga K, Yonemura Y, Tochino Y, et al. A novel gene activated in regenerating islets. *J Biol Chem*. 1988;263(5):2111–4.
224. Caro AMDE, Bonicel JJ, Rouimi P, R JDDECA, Sarles H, Rovey M. Complete amino acid sequence of an immunoreactive form of human pancreatic stone protein isolated from pancreatic juice. *Eur J Biochem* [Internet]. 1987 Oct;207(1):201–7.
225. de Caro A, Multigner L, Lafont H, Lombardo D, Sarles H. The molecular characteristics of a human pancreatic acidic phosphoprotein that inhibits calcium carbonate crystal growth. *Biochem J*. 1984;222(3):669–77.
226. Care A De, Lohse J, Sarles H. Received February 28,1979. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979;87(4):1176–82.
227. Regi M, Garib B. Proteinn-X, Pancreatic Stone-, Pancreatic Thread-, reg-Protein, P19, Lithostathine, and Now What. *Curr Protein Pept Sci* [Internet]. 2001 Mar 1;2(1):19–42.

228. Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Takeda J, Nanakin A, Hisatsune H, et al. REG I α protein may function as a trophic and/or anti-apoptotic factor in the development of gastric cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 2005 Mar;128(3):642–53.
229. Watanabe T. Complete Nucleotide Sequence of Human reg Gene and Its Expression in Normal and Tumoral Tissues. *J Biol Chem*. 1990;265(13):7432–9.
230. Dhar DK, Udagawa J, Ishihara S, Otani H, Kinoshita Y, Takasawa S, et al. Expression of Regenerating Gene I in Gastric Adenocarcinomas: Correlation with Tumor Differentiation Status and Patient Survival. *Cancer*. 2004;100(6):1130–6.
231. Yonemura Y, Sakurai S, Yamamoto H, Endou Y, Kawamura T, Bandou E, et al. REG gene expression is associated with the infiltrating growth of gastric carcinoma. *Cancer* [Internet]. 2003 Oct 1;98(7):1394–400.
232. Sekikawa A, Fukui H, Zhang X, Maruo T, Tsumura T, Okabe Y, et al. REG I α is a biomarker for predicting response to chemotherapy with S-1 plus cisplatin in patients with unresectable stage IV gastric cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2013;108(2):395–401.
233. Acquatella-Tran Van Ba I, Marchal S, Francois F, Silhol M, Lleres C, Michel B, et al. Regenerating Islet-derived 1 (Reg-1) Protein Is New Neuronal Secreted Factor That Stimulates Neurite Outgrowth via Exostosin Tumor-like 3 (EXTL3) Receptor. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 Feb 10;287(7):4726–39.
234. Cohn A, Sofia AM, Kupfer SS. Type 1 Diabetes and Celiac Disease: Clinical Overlap and New Insights into Disease Pathogenesis. *Curr Diab Rep* [Internet]. 2014 Aug 21;14(8):517.
235. Astorri E, Guglielmi C, Bombardieri M, Alessandri C, Buzzetti R, Maggi D, et al. Circulating Reg1 α Proteins and Autoantibodies to Reg1 α Proteins as Biomarkers of β -Cell Regeneration and Damage in Type 1 Diabetes. *Horm Metab Res* [Internet]. 2010 Dec 22;42(13):955–60.
236. Kimura T, Fukui H, Sekikawa A, Yamagishi H, Ichikawa K, Tomita S, et al. Involvement of REG I α protein in the regeneration of ductal epithelial cells in the minor salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *Clin Exp Immunol* [Internet]. 2009 Jan;155(1):16–20.

237. Dieckgraefe BK, Crimmins DL, Landt V, Houchen C, Anant S, Porche-Sorbet R, et al. Expression of the regenerating gene family in inflammatory bowel disease mucosa: Reg Ialpha upregulation, processing, and antiapoptotic activity. *J Investig Med [Internet]*. 2002 Nov;50(6):421–34.
238. Nejad MR, Dabiri R, Ehsani-ardakani MJ, Mojarad EN, M. RN, D. A, et al. An undigested gliadin peptide activates innate immunity and proliferative signaling in enterocytes: The role in celiac disease. Trackman PC, editor. *J Endod [Internet]*. 2013 Oct 18;14(2):1123–35.
239. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA [Internet]*. 2013;310(20):2191–4.
240. König J, Wells J, Cani PD, García-Ródenas CL, MacDonald T, Mercenier A, et al. Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease. *Clin Transl Gastroenterol [Internet]*. 2016 Oct 20;7(10):e196.
241. Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology [Internet]*. 1992 Jan;102(1):330–54.
242. Simula MP, Cannizzaro R, Canzonieri V, Pavan A, Maiero S, Toffoli G, et al. PPAR signaling pathway and cancer-related proteins are involved in celiac disease-associated tissue damage. *Mol Med [Internet]*. 2010;16(5–6):199–209.
243. Bloemendaal ALA, Buchs NC, George BD, Guy RJ. Intestinal stem cells and intestinal homeostasis in health and in inflammation: A review. *Surgery [Internet]*. 2016;(Fig 1):1–12.
244. Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat*. 1974;141(4):537–61.
245. Piscaglia AC. Intestinal stem cells and celiac disease. *World J Stem Cells [Internet]*. 2014;6(2):213.

246. Okamoto R, Watanabe M. Molecular and clinical basis for the regeneration of human gastrointestinal epithelia. *J Gastroenterol* [Internet]. 2004 Jan 1;39(1):1–6.
247. Vanuytsel T, Senger S, Fasano A, Shea-Donohue T. Major signaling pathways in intestinal stem cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2013 Feb;1830(2):2410–26.
248. Totafurno J, Bjerknes M, Cheng H. The crypt cycle. Crypt and villus production in the adult intestinal epithelium. *Biophys J* [Internet]. 1987;52(2):279–94.
249. Webb C, Myleus A, Norstrom F, Hammarroth S, Hogberg L, Lagerqvist C, et al. High adherence to a gluten-free diet in adolescents with screening-detected celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2015;60(1):54–9.
250. Langlands AJ, Almet AA, Appleton PL, Newton IP, Osborne JM, N??thke IS. Paneth Cell-Rich Regions Separated by a Cluster of Lgr5+ Cells Initiate Crypt Fission in the Intestinal Stem Cell Niche. *PLoS Biol*. 2016;14(6):1–31.
251. Bruens L, Ellenbroek SIJ, van Rheenen J, Snippert HJ. In vivo Imaging Reveals Existence of Crypt Fission and Fusion in Adult Mouse Intestine. *Gastroenterology* [Internet]. 2017 May 25; Volume 0, Issue 0.
252. Fischer JM, Calabrese PP, Miller AJ, Muñoz NM, Grady WM, Shibata D, et al. Single cell lineage tracing reveals a role for TgfβR2 in intestinal stem cell dynamics and differentiation. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2016;113(43):12192–7.
253. Riehl TE, Santhanam S, Foster L, Ciorba M, Stenson WF. CD44 and TLR4 mediate hyaluronic acid regulation of Lgr5 + stem cell proliferation, crypt fission and intestinal growth in postnatal and adult mice. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol* [Internet]. 2015;(4):ajpgi.00123.2015.
254. Shalimar, Das P, Sreenivas V, Gupta SD, Panda SK, Makharia GK. Mechanism of villous atrophy in celiac disease: Role of apoptosis and epithelial regeneration. *Arch Pathol Lab Med*. 2013;
255. Mention JJ, Ahmed M Ben, 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(3):730–45.

256. Pagliari D, Cianci R, Frosali S, Landolfi R, Cammarota G, Newton EE, et al. The role of IL-15 in gastrointestinal diseases: A bridge between innate and adaptive immune response. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2013;24(5):455–66.
257. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:485–517.
258. Kimura A, Naka T, Kishimoto T. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(29):12099–104.
259. Sollid LM, Iversen R, Steinsbø Ø, Qiao S-W, Bergseng E, Dørum S, et al. Small bowel, celiac disease and adaptive immunity. *Dig Dis* [Internet]. 2015 Apr 22;33(2):115–21.
260. Cicerone C, Nenna R, Pontone S. Th17, intestinal microbiota and the abnormal immune response in the pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterol Hepatol from bed to bench* [Internet]. 2015;8(2):117–22.
261. Tang F, Sally B, Lesko K, Discepolo V, Abadie V, Ciszewski C, et al. Cysteinyl leukotrienes mediate lymphokine killer activity induced by NKG2D and IL-15 in cytotoxic T cells during celiac disease. *J Exp Med* [Internet]. 2015 Sep 21;212(10):1487–95.
262. Hmida NB, Ahmed M Ben, Moussa A, Rejeb M Ben, Said Y, Kourda N, et al. Impaired Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells: A Clue to Loss of Oral Tolerance and Autoimmunity in Celiac Disease? *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2012 Apr 22;107(4):604–11.
263. Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The Induction of Tolerance by Dendritic Cells That Have Captured Apoptotic Cells. *J Exp Med*. 2000;191(3):411–6.
264. Tanaka T, Narazaki M KT. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2014;Sep 4(6(10)):a016295.
265. Fornari MC, Pedreira S, Niveloni S, González D, Diez RA, Vázquez H, et al. Pre- and Post-Treatment Serum Levels of Cytokines IL-1 β , IL-6, and IL-1 Receptor

Antagonist in Celiac Disease. Are They Related to the Associated Osteopenia? *Am J Gastroenterol* [Internet]. 1998 Mar;93(3):413–8.

266. Böttcher JP, Schanz O, Garbers C, Zaremba A, Hegenbarth S, Kurts C, et al. IL-6 trans-Signaling-Dependent Rapid Development of Cytotoxic CD8+ T Cell Function. *Cell Rep* [Internet]. 2014 Sep 11;8(5):1318–27.

267. Pascual V, Medrano LM, López-Palacios N, Bodas A, Dema B, Fernández-Arquero M, et al. Different gene expression signatures in children and adults with celiac disease. *PLoS One*. 2016;11(2):1–10.

268. Kishimoto T. INTERLEUKIN-6: From Basic Science to Medicine—40 Years in Immunology. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2005;23(1):1–21.

269. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* [Internet]. 2011 May;1813(5):878–88.

270. Kishimoto T. Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine. *Arthritis Res Ther* [Internet]. 2006;8(Suppl 2):S2.

271. Scheller J, Garbers C, Rose-John S. Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Semin Immunol* [Internet]. 2014 Feb;26(1):2–12.

272. Rose-John S, Ehlers M, Grötzinger J, Müllberg J. The soluble interleukin-6 receptor. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 1995 Jul 21;762:207-20-1.

273. Rose-John S. IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the Pro-Inflammatory Activities of IL-6. *Int J Biol Sci* [Internet]. 2012;8(9):1237–47.

274. Wolf J, Rose-John S, Garbers C. Interleukin-6 and its receptors: A highly regulated and dynamic system. *Cytokine* [Internet]. 2014 Nov;70(1):11–20.

275. Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, et al. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*. 1994;368(6469):339–42.

276. Jeffery V, Goldson AJ, Dainty JR, Chieppa M, Sobolewski A. IL-6 Signaling Regulates Small Intestinal Crypt Homeostasis. *J Immunol* [Internet]. 2017 Jul 1;199(1):304–11.
277. Garbers C, Jänner N, Chalaris A, Moss ML, Floss DM, Meyer D, et al. Species Specificity of ADAM10 and ADAM17 Proteins in Interleukin-6 (IL-6) Trans-signaling and Novel Role of ADAM10 in Inducible IL-6 Receptor Shedding. *J Biol Chem* [Internet]. 2011 Apr 29;286(17):14804–11.
278. Riethmueller S, Ehlers JC, Lokau J, Düsterhöft S, Knittler K, Dombrowsky G, et al. Cleavage Site Localization Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(December 2015):25550.
279. Rose-John S, Scheller J, Schaper F. “Family reunion” – A structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines. *Cytokine Growth Factor Rev* [Internet]. 2015 Oct;26(5):471–4.
280. Oberg H-H, Wesch D, Grüssel S, Rose-John S, Kabelitz D. Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4+CD25- and CD25high regulatory T cells. *Int Immunol* [Internet]. 2006 Apr 15;18(4):555–63.
281. Steinman L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* [Internet]. 2007;13(2):139–45.
282. Tanaka T, Kishimoto T. The Biology and Medical Implications of Interleukin-6. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2014 Apr 1;2(4):288–94.
283. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, Imamura T, Kimura K, Maeda T, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun* [Internet]. 2013;4(May):1829.
284. Calderari S, Irminger J-C, Giroix M-H, Ehses JA, Gangnerau M-N, Coulaud J, et al. Regenerating 1 and 3b Gene Expression in the Pancreas of Type 2 Diabetic Goto-Kakizaki (GK) Rats. Einwaechter H, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Feb 26;9(2):e90045.

285. Judd LM, Alderman BM, Howlett M, Shulkes A, Dow C, Moverley J, et al. Gastric Cancer Development in Mice Lacking the SHP2 Binding Site on the IL-6 Family Co-receptor gp130. *2004*;196–207.
286. Sekikawa A, Fukui H, Fujii S, Ichikawa K, Tomita S, Imura J, et al. REG Ia protein mediates an anti-apoptotic effect of STAT3 signaling in gastric cancer cells. *Carcinogenesis*. 2008;29(1):76–83.
287. Schurink M, Scholten IGH, Kooi EMW, Hulzebos C V., Kox RG, Groen H, et al. Intestinal Fatty Acid-Binding Protein in Neonates with Imminent Necrotizing Enterocolitis. *Neonatology [Internet]*. 2014;106(1):49–54.
288. de Haan JJ, Lubbers T, Derikx JP, Relja B, Henrich D, Greve J-W, et al. Rapid development of intestinal cell damage following severe trauma: a prospective observational cohort study. *Crit Care [Internet]*. 2009;13(3):R86.
289. Ravelli A, Villanacci V, Monfredini C, Martinazzi S, Grassi V, Manenti S. How patchy is patchy villous atrophy?: distribution pattern of histological lesions in the duodenum of children with celiac disease. *Am J Gastroenterol [Internet]*. 2010;105(9):2103–10.
290. Özakıncı H, Kırmızı A, Savaş B, Kalkan Ç, Soykan İ, Çetinkaya H, et al. Classification chaos in coeliac disease: Does it really matter? *Pathol - Res Pract [Internet]*. 2016 Dec;212(12):1174–8.
291. Valitutti F, Di Nardo G, Barbato M, Aloï M, Celletti I, Trovato CM, et al. Mapping histologic patchiness of celiac disease by push enteroscopy. *Gastrointest Endosc [Internet]*. 2014 Jan;79(1):95–100.
292. Bonamico M, Mariani P, Thanasi E, Ferri M, Nenna R, Tiberti C, et al. Patchy villous atrophy of the duodenum in childhood celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004;38(June 1996):204–7.
293. Khan A, Peter S, Wilcox C. Olmesartan-induced enteropathy resembling celiac disease. *Endoscopy [Internet]*. 2014 Mar 27;46(S 01):E97–8.

294. Häuser W, Janke K-H, Klump B, Gregor M, Hinz A. Anxiety and depression in adult patients with celiac disease on a gluten-free diet. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2010;16(22):2780–7.
295. Leffler DA, Acaster S, Gallop K, Dennis M, Kelly CP, Adelman DC. A Novel Patient-Derived Conceptual Model of the Impact of Celiac Disease in Adults: Implications for Patient-Reported Outcome and Health-Related Quality-of-Life Instrument Development. *Value Heal* [Internet]. 2017 Apr;20(4):637–43.
296. Burger JPW, de Brouwer B, IntHout J, Wahab PJ, Tummers M, Drenth JPH. Systematic review with meta-analysis: Dietary adherence influences normalization of health-related quality of life in coeliac disease. *Clin Nutr* [Internet]. 2017;36(2):399–406.
297. Lahdenperä A, Ludvigsson J, Fälth-Magnusson K, Högberg L, Vaarala O. The effect of gluten-free diet on Th1-Th2-Th3-associated intestinal immune responses in celiac disease. *Scand J Gastroenterol*. 2011;46(5):538–49.
298. Machado J, Gandolfi L, Coutinho De Almeida F, Malta Almeida L, Puppim Zandonadi R, Pratesi R. Gluten-free dietary compliance in Brazilian celiac patients: Questionnaire versus serological test. *Nutr Clin y Diet Hosp*. 2013;33(2):46–9.
299. Silvester JA, Weiten D, Graff LA, Walker JR, Duerksen DR. Living gluten-free: adherence, knowledge, lifestyle adaptations and feelings towards a gluten-free diet. *J Hum Nutr Diet* [Internet]. 2015;5(2):n/a-n/a.
300. Leffler D a, Edwards-George J, Dennis M, Schuppan D, Cook F, Franko DL, et al. Factors that influence adherence to a gluten-free diet in adults with celiac disease. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2013;53(6):1573–81.
301. Dewar DH. Celiac disease: Management of persistent symptoms in patients on a gluten-free diet. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2012;18(12):1348.
302. Viljamaa M, Collin P, Huhtala H, Sievanen H, Maki M, Kaukinen K. Is coeliac disease screening in risk groups justified? A fourteen-year follow-up with special focus on compliance and quality of life. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2005 Aug 15;22(4):317–24.

303. Silvester JA, Graff LA, Rigaux L, Walker JR, Duerksen DR. Symptomatic suspected gluten exposure is common among patients with coeliac disease on a gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;44(6):612–9.
304. Hollon JR, Cureton P a, Martin ML, Puppa ELL, Fasano A. Trace gluten contamination may play a role in mucosal and clinical recovery in a subgroup of diet-adherent non-responsive celiac disease patients. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2013;13(40):1–9.
305. Bascuñán KA, Vespa MC, Araya M. Celiac disease: understanding the gluten-free diet. *Eur J Nutr* [Internet]. 2016 Jun 22;1–11.
306. Ludvigsson JF, Card T, Ciclitira PJ, Swift GL, Nasr I, Sanders DS, et al. Support for patients with celiac disease: A literature review. *United Eur Gastroenterol J* [Internet]. 2015;3(2):146–59.
307. Jacobsson LR, Milberg A, Hjelm K, Friedrichsen M. Experiences and own management regarding residual symptoms among people with coeliac disease. *Appl Nurs Res* [Internet]. 2017 Jun;35:53–8.
308. Samasca G, Lerner A, Girbovan A, Sur G, Lupan I, Makovicky P, et al. Challenges in gluten-free diet in coeliac disease: Prague consensus. *Eur J Clin Invest*. 2017;47(5):394–7.
309. Dowd AJ, Tamminen KA, Jung ME, Case S, Mcewan D, Beauchamp MR. Motives for adherence to a gluten-free diet: A qualitative investigation involving adults with coeliac disease. *J Hum Nutr Diet*. 2014;27(6):542–9.
310. Wahab PJ, Meijer JWR, Mulder CJJ. Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: Slow and incomplete recovery. *Am J Clin Pathol*. 2002;118(3):459–63.
311. Newnham ED, Shepherd SJ, Strauss BJ, Hosking P, Gibson PR. Adherence to the gluten-free diet can achieve the therapeutic goals in almost all patients with coeliac disease: A 5-year longitudinal study from diagnosis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2016;31(2):342–9.

312. Zanini B, Marullo M, Villanacci V, Salemme M, Lanzarotto F, Ricci C, et al. Persistent Intraepithelial Lymphocytosis in Celiac Patients Adhering to Gluten-Free Diet Is Not Abolished Despite a Gluten Contamination Elimination Diet. *Nutrients* [Internet]. 2016 Aug 26;8(9):525.
313. Pekki H, Kurppa K, Maki M, Huhtala H, Sievanen H, Laurila K, et al. Predictors and Significance of Incomplete Mucosal Recovery in Celiac Disease After 1 Year on a Gluten-Free Diet. *Am J Gastroenterol*. 2015;110(7):1078–85.
314. Rubio-Tapia A, Rahim MW, See JA, Lahr BD, Wu TT, Murray JA. Mucosal recovery and mortality in adults with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2010;105(6):1412–20.
315. Galli G, Esposito G, Lahner E, Pillozzi E, Corleto VD, Di Giulio E, et al. Histological recovery and gluten-free diet adherence: a prospective 1-year follow-up study of adult patients with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2014;40(6):639–47.
316. Lanzini A, Lanzarotto F, Villanacci V, Mora A, Bertolazzi S, Turini D, et al. Complete recovery of intestinal mucosa occurs very rarely in adult coeliac patients despite adherence to gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2009;29(12):1299–308.
317. Ghazzawi Y, Rubio-Tapia A, Murray JA, Absah I. Mucosal healing in children with treated celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* [Internet]. 2014;59(2):229–31.
318. Hutchinson JM, West NP, Robins GG, Howdle PD. Long-term histological follow-up of people with coeliac disease in a UK teaching hospital. *Q J Med* [Internet]. 2010;103(7):511–7.
319. Rubio-Tapia A, Murray JA. Celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol* [Internet]. 2010;26(2):116–22.
320. Rubio-tapia A, Barton SH, Murray JA. Celiac Disease and Persistent Symptoms Causes of Nonresponsive Celiac Disease. *YJCGH* [Internet]. 2011;9(1):13–7.

321. Yachha SK, Srivastava A, Mohindra S, Krishnani N, Aggarwal R, Saxena A. Effect of a gluten-free diet on growth and small-bowel histology in children with celiac disease in India. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2007;22(8):1300–5.
322. Leffler DA, Dennis M, Hyett B, Kelly E, Schuppan D, Kelly CP. Etiologies and Predictors of Diagnosis in Nonresponsive Celiac Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2007 Apr;5(4):445–50.
323. Bazzigaluppi E, Roggero P, Parma B, Brambillasca MF. Antibodies to recombinant human tissue-transglutaminase in coeliac disease: Diagnostic effectiveness and decline pattern after gluten-free diet. 2006;38:98–102.
324. Trigoni E, Tsirogianni A, Pipi E, Mantzaris G, Papasteriades C. Celiac Disease in Adult Patients: Specific Autoantibodies in the Diagnosis, Monitoring, and Screening. 2014;2014.
325. Ciacci C, Mazzacca G. Original Paper: Intestinal Disorders Long-Term Follow-Up of Celiac Adults on Gluten-Free Diet: Prevalence and Correlates of Intestinal Damage. *Digestion*. 2002;66(aug):178–85.
326. 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* [Internet]. 2005 Jan;40(1):1–19.
327. Vahedi K, Mascart F, Mary JY, Laberene JE, Bouhnik Y, Morin MC, et al. Reliability of antitransglutaminase antibodies as predictors of gluten-free diet compliance in adult celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2003;98(5):1079–87.
328. Tursi A, Brandimarte G, Giorgetti GM. Lack of usefulness of anti-transglutaminase antibodies in assessing histologic recovery after gluten-free diet in celiac disease. *J Clin Gastroenterol* [Internet]. 2003;37(5):387–91.
329. Dickey W, Hughes DF, McMillan SA. Disappearance of endomysial antibodies in treated celiac disease does not indicate histological recovery. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2000;95(3):712–4.

330. Kaukinen K, Sulkanen S, Mäki M, Collin P. IgA-class transglutaminase antibodies in evaluating the efficacy of gluten-free diet in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2002 Mar;14(3):311–5.
331. Kaukinen K, Peräaho M, Lindfors K, Partanen J, Woolley N, Pikkarainen P, et al. Persistent small bowel mucosal villous atrophy without symptoms in coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2007;25(10):1237–45.
332. Leffler D a., Edwards George JB, Dennis M, Cook EF, Schuppan D, Kelly CP. A prospective comparative study of five measures of gluten-free diet adherence in adults with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(9):1227–35.
333. Sategna-Guidetti C, Grosso S, Bruno M, Grosso SB. Reliability of immunologic markers of celiac sprue in the assessment of mucosal recovery after gluten withdrawal. *J Clin Gastroenterol* [Internet]. 1996;23(2):101–4.
334. Naito H. REG α gene expression is linked with the poor prognosis of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma patients via discrete mechanisms. *Oncol Rep* [Internet]. 2013 Sep 19;30(6):2625–31.
335. Kinoshita Y, Ishihara S, Kadowaki Y, Fukui H, Chiba T. Reg protein is a unique growth factor of gastric mucosal cells. *J Gastroenterol* [Internet]. 2004 Jun;39(6):507–13.
336. Sekino M, Funaoka H, Sato S, Okada K, Inoue H, Yano R, et al. Intestinal fatty acid-binding protein level as a predictor of 28-day mortality and bowel ischemia in patients with septic shock: A preliminary study. *J Crit Care* [Internet]. 2017 Dec;42:92–100.
337. Yamauchi A, Takahashi I, Takasawa S, Nata K, Noguchi N, Ikeda T, et al. Thiazolidinediones inhibit REG α gene transcription in gastrointestinal cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2009 Feb;379(3):743–8.
338. Basson M, Mezzarobba M, Weill A, Ricordeau P, Allemand H, Alla F, et al. Severe intestinal malabsorption associated with olmesartan: a French nationwide observational cohort study. *Gut* [Internet]. 2015 Aug 6;August(6):gutjnl-2015-309690.

339. Scialom S, Malamut G, Meresse B, Guegan N, Brousse N, Verkarre V, et al. Gastrointestinal Disorder Associated with Olmesartan Mimics Autoimmune Enteropathy. Sampson AP, editor. PLoS One [Internet]. 2015 Jun 23;10(6):e0125024.

APÊNDICE I



Termo de Consentimento Livre e Escclarecido – TCLE

O (a) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto: Avaliação e utilidade dos biomarcadores não invasivos, Reg1 α , e IFABP como novo mecanismo de monitoramento da destruição e regeneração do epitélio intestinal em pacientes celíacos antes e depois da dieta sem glúten.

O objetivo desta pesquisa é: analisar um novo exame sorológico Reg1 α e IFABP para verificação de destruição e regeneração da mucosa intestinal biópsia em pacientes celíacos.

O (a) Senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários antes e no decorrer da pesquisa e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

A sua participação será através de uma única coleta de 6 ml de sangue do antebraço, com risco mínimo para o paciente, pois será feita por técnicos de laboratório especializados e com uso de material descartável no Hospital Universitário de Brasília no mesmo dia em que concordar em participar da pesquisa.

Informamos que o(a) Senhor(a) pode se recusar a responder (ou participar de qualquer procedimento) qualquer questão que lhe traga constrangimento, podendo desistir de participar da pesquisa em qualquer momento sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Universidade de Brasília podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de no mínimo cinco anos, após isso serão destruídos.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, por favor telefone para: Dra. Rosa Harumi Uenishi na Universidade de Brasília telefone: 3107-1989 no horário comercial.

Este projeto foi Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. As dúvidas com relação à assinatura do TCLE ou dos seus direitos podem ser esclarecidos através do telefone: (61) 3107-1947 ou do e-mail cepfs@unb.br.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o paciente.

Nome/assinatura _____

Pesquisador responsável _____

Brasília, _____ de _____ de _____.

APÊNDICE II

Ambulatório de Doença Celíaca – HUB/UnB

Avaliação da utilidade dos biomarcadores não invasivos, Reg1 α , e IFABP no monitoramento da destruição e regeneração do epitélio intestinal em pacientes celíacos antes e depois da dieta sem glúten

Nome:.....MF

Data de Nasc.:/...../.....Idade:.....Email:.....

Endereço:

Telefones:

Responsável:

- 1) Quando foi diagnosticado para a DC já era portador de alguma outra doença autoimune?
Não. Sim. Qual ou quais?
- 2) Após o diagnóstico da DC evoluiu com alguma outra doença?
Não. Sim. Qual(is)?
- 3) Está em dieta sem glúten?
 Não: Nunca começou. Parou depois de quanto tempo?
Sim: Estrita. Com falhas. As falhas são: intencionais não intencionais
- 4) O diagnóstico da DC foi feito quando estava com quantos anos?
 E possuías quais sintomas? Flatulência Evacuações diarreicas Distensão abdominal Constipação Dor abdominal recorrente Aftas Outros
- 5) Possui alguns desses sintomas atualmente? Não. Sim. Quais?
- 6) Toma algum medicamento? Não. Sim. Quais?

Exames da época do diagnóstico:

Peso: Altura: IMC: tTG: EMA: HLA: Biópsia:

Exames atuais:

Peso: Altura: IMC: tTG/EMA: Reg1 α : IFABP:

ANEXO I



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação e utilidade dos biomarcadores não invasivos, REG1 alfa e IFABP no monitoramento da destruição e regeneração do epitélio intestinal em pacientes celíacos antes e depois da dieta sem glúten

Pesquisador: ROSA HARUMI UENISHI

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 18855513.3.0000.0030

Instituição Proponente: FACULDADE DE SAÚDE - FS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 552.566

Data da Relatoria: 05/02/2014

Apresentação do Projeto:

Parecer Consubstanciado

Avaliação e utilidade dos biomarcadores não invasivos, REG1 α , e IFABP no monitoramento da destruição e regeneração do epitélio intestinal em pacientes celíacos antes e depois da dieta sem glúten

PARECER

Apresentação / Sumário do Projeto

A Doença Celíaca (DC) é uma enteropatia imunomediada e ocorre em indivíduos geneticamente predispostos sensibilizados permanentemente pelo glúten (trigo, cevada e centeio), sendo o tratamento eficiente a exclusão total do glúten da dieta. Pelo critério de ESPGHAN (European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology And Nutrition) estipulados em 2012 o diagnóstico da DC é estabelecida mediante realização de exames sorológicos específicos como a investigação de anticorpos IgA-antitransglutaminase (IgA-tTG) e IgA-antiendomíscio (IgA-EMA), de exame genético, a apresentação clínica, a biópsia intestinal jejunal e a melhora clínica com o início do tratamento. A ESPGHAN de 2012 recomenda a realização de exames após o início do

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **Fac:** (61)3307-3799 **E-mail:** cepfs@unb.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 552.566

tratamento: o sorológicos IgA-tTG e biópsia jejunal após um ano do início do tratamento. O pesquisador Vives-Fi e colaboradores propuseram a realização de um novo biomarcador, que possa verificar o nível da proteína REG 1 alfa (Regenerating Gene tipo 1 alfa) expresso durante o processo de regeneração da mucosa tecidual ante destruição efetuada pelo mecanismo

fisiopatológico da DC sem o uso de meios invasivos. Pois os marcadores IgA-tTG e IgA-EMA não são capazes de revelar a regeneração da parede intestinal com o início do tratamento, conseqüentemente necessita de realização de nova biópsia jejunal para este fim. A proteína IFABP (Intestinal Fatty Acid Binding Protein) exclusivo da parede intestinal é detectada em nível sérico quando ocorre a destruição da parede intestinal

MÉTODO: Trata-se de um estudo observacional analítico de caso-controle para testar os biomarcadores REG1 alfa e IFABP em coorte de pacientes portadores de DC. Será feita uma análise sorológica de REG1 alfa, IFABP e IgA-tTG pelo método imunoenzimático (ELISA) e a IgA-EMA pelo método de imunofluorescência indireta em cortes criostáticos de esfago de primata. Será empregado o Odds-ratio (OR) ou a razão de produtos cruzados em que avaliará a chance de exposição dos grupos envolvidos nesta pesquisa. Serão recrutados 300 participantes (150 para o estudo do caso e 150 para o grupo controle) Análise do material: O material coletado será estocado a -20° C até seu uso e analisados no Centro de Estudos da Doença Celíaca. Os exames sorológicos IgA-tTG, REG1 ζ e IFABP serão mensurados pelo teste imunoenzimático (ELISA) e o IgA-EMA pelo exame de imunofluorescência indireta em cortes criostáticos de esfago de primata. Após a realização dos exames sorológicos o soro será encaminhado para incineração. As análises do material e dos resultados serão realizadas no Centro de Estudos da Doença Celíaca (Salas B1-94/13 FS:FM - UnB). Todos os equipamentos necessários já existem no laboratório o que garante a exequibilidade técnica e econômica do projeto. Os kits comerciais para a realização dos testes imunoenzimáticos (ELISA) dos exames de IgA-tTG, REG1 ζ , antiREG1 ζ e IFABP e também do exame de imunofluorescência indireta IgA-EMA serão adquiridos com recursos do próprio laboratório. Os custos estimados são de R\$ R\$ 9.800,00.

Critério de Inclusão: Para compor o grupo de Casos, serão convidados a participarem da pesquisa os pacientes portadores de DC acompanhados pela equipe médica do Ambulatório de Doença Celíaca do Hospital Universitário de Brasília. O grupo Controle será formado por parentes dos pacientes diagnosticados com DC, assintomáticos e com sorologia negativa.

Critério de Exclusão:

Em ambos os grupos (Casos e Controles), os indivíduos que apresentem doenças autoimunes, lesões dermatológicas extensas, problemas relacionadas com a degeneração neural.

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **Fax:** (61)3307-3799 **E-mail:** cepfs@unb.br



Continuação do Parecer: 552.566

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral:

Determinar o nível de REG1 ζ e IFABP como mecanismo de monitoramento da destruição e regeneração dos enterócitos em pacientes portadores de DC.

Objetivos Específicos:

- a) Comparar os níveis dos marcadores sorológicos IgA-ITG e IgA-EMA, em pacientes celíacos no momento do diagnóstico com os níveis de REG1 ζ e IFABP.
- b) Comparar os níveis dos marcadores sorológicos IgA-ITG e IgA-EMA, em pacientes celíacos após no mínimo de um ano de tratamento com dieta sem glúten, com os níveis de REG1 ζ e IFABP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Avaliação dos riscos e benefícios:

A coleta de sangue será efetuada em ambiente hospitalar (3 ml) e, executada por técnicos de laboratório especializados para este fim, desta forma, minimiza-se o risco do procedimento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Resultados Esperados:

A possibilidade de monitorar os pacientes portadores de DC de forma não invasiva sem a necessidade de biópsia endoscópica jejuna

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos analisados:

1. Projeto de pesquisa
2. Folha de rosto
3. Carta de encaminhamento ao CEP
4. Termo de Concordância do HUB
5. Termo de ciência da Instituição co-participante
6. TCLE
7. Termo de conhecimento do Laboratório de Análise Clínicas do Hospital Universitário de Brasília
8. Termo comprometimento da pesquisadora
9. Instrumento de pesquisa
10. Currículo Lenora Gandolfi
11. Currículo Rosa Harumi Venishi
12. Currículo Fernanda Coutinho de Almeida
13. Currículo Patricia Maria Fritsch

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **Fax:** (61)3307-3799 **E-mail:** cepfs@unb.br



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE DA UNIVERSIDADE DE
BRASÍLIA - CEP/FS-UNB



Continuação do Parecer: 552.566

- 14. Currículo Ricardo Prates
- 15. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega
- 16. Planilha de custos
- 17. Cronograma do projeto

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto se encontra em conformidade 466/12.

Situação do projeto: *Aprovado*

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BRASÍLIA, 11 de Março de 2014

Assinador por:
Natan Monsore de Sá
(Coordenador)

Endereço: Faculdade de Ciências da Saúde - Campus Darcy Ribeiro
Barro: Asa Norte **CEP:** 70 910-900
UF: DF **Município:** BRASÍLIA
Telefone: (61)3107-1947 **Fax:** (61)3307-3799 **E-mail:** cepfs@unb.br