

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

**PREVALÊNCIA DE DOENÇA CELÍACA EM MÃES DE CRIANÇAS COM  
DEFEITOS DE FECHAMENTO DO TUBO NEURAL NO FETO**

**Rodrigo Coutinho de Almeida**

**Brasília  
2008**

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

**PREVALÊNCIA DE DOENÇA CELÍACA EM MÃES DE CRIANÇAS COM  
DEFEITOS DE FECHAMENTO DO TUBO NEURAL NO FETO**

**Rodrigo Coutinho de Almeida**

**Orientadora: Prof Dr<sup>a</sup> Lenora Gandolfi  
Co-Orientador: Prof Dr. Riccardo Pratesi**

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

**Brasília  
2008**

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À Dr<sup>a</sup>. Lenora Gandolfi e ao Dr. Riccardo Pratesi, pela amizade, confiança, incentivo, oportunidade de aperfeiçoamento acadêmico e aprendizado de valores humanos.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Cícero e Terezinha, pelo apoio e incentivo essenciais para o término deste trabalho importante em minha vida.

À toda a minha família, pela compreensão e apoio constante em minhas decisões.

À professora Dr<sup>a</sup>. Marilúcia Picanço, pelo apoio, gentileza, amizade e colaboração no meu aperfeiçoamento acadêmico.

Ao Dr. Benício Otton Lima, pela colaboração e participação na metodologia e conclusão deste trabalho.

Aos pós-graduandos Rita de Cássia, Lílian Queiroz e Danilo Teixeira pelo apoio e amizade.

À todas as estagiárias do Laboratório de Pesquisa em Pediatria da UnB, pela ajuda em diversos exames laboratoriais.

Aos meus amigos, que compartilharam de minhas alegrias e indecisões com compreensão para me apoiar na conclusão deste trabalho.

**“Todo o nosso conhecimento se inicia com sentimentos”**

**(Leonardo da Vinci)**

## SUMÁRIO

|                                                               |      |
|---------------------------------------------------------------|------|
| Lista de figuras .....                                        | viii |
| Lista de tabelas .....                                        | ix   |
| Lista de siglas e abreviaturas.....                           | x    |
| <br>                                                          |      |
| Resumo .....                                                  | xi   |
| Abstract .....                                                | vii  |
| <br>                                                          |      |
| 1.INTRODUÇÃO .....                                            | 13   |
| 1.1 Definição .....                                           | 14   |
| 1.2 Histórico.....                                            | 15   |
| 1.3 Quadro clínico .....                                      | 18   |
| 1.4 Desordens associadas.....                                 | 23   |
| 1.5 Patogênese.....                                           | 27   |
| 1.5.1 Fatores ambientais.....                                 | 27   |
| 1.5.2 Fatores genéticos.....                                  | 28   |
| 1.5.3 Fatores imunológicos.....                               | 32   |
| 1.6 Epidemiologia.....                                        | 36   |
| 1.7 Diagnóstico.....                                          | 39   |
| 1.7.2 Anticorpos antiendomísio (EMA).....                     | 41   |
| 1.7.3 Anticorpos anti-transglutaminase (tTG).....             | 42   |
| 1.7.4 Pesquisa de antígeno leucocitários humanos (HLA).....   | 43   |
| 1.7.5 Biópsia intestinal e histopatologia.....                | 44   |
| 1.8 A doença celíaca como possível.....                       | 46   |
| causa de deficiência de ácido fólico                          |      |
| 1.8.1 A deficiência de ácido fólico como possível causa ..... | 47   |
| de defeitos do tubo neural                                    |      |
| <br>                                                          |      |
| 2. OBJETIVOS.....                                             | 49   |
| <br>                                                          |      |
| 3.PACIENTES E MÉTODOS.....                                    | 51   |
| <br>                                                          |      |
| 4. RESULTADOS .....                                           | 54   |

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 5. DISCUSSÃO .....                  | 56 |
| 6. CONCLUSÃO .....                  | 60 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 62 |
| ANEXOS .....                        | 79 |

**LISTA DE FIGURAS**

|                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------|----|
| Figura 1: Iceberg celíaco .....                           | 23 |
| Figura 2: Haplótipos que predisõem a doença celíaca ..... | 30 |
| Figura 3: Patogênese da doença celíaca .....              | 34 |
| Figura 4: Antiendomísio positivo .....                    | 41 |

**LISTA DE TABELAS**

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Prevalência da doença celíaca em indivíduos .....<br>não diagnosticados | 37 |
| Tabela 2: Classificação histológica de Marsh .....                                | 46 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|                                |                                                                                                                                 |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>CPH</b>                     | complexo principal de histocompatibilidade                                                                                      |
| <b>DC</b>                      | doença celíaca                                                                                                                  |
| <b>DTN</b>                     | defeitos do fechamento do tubo neural                                                                                           |
| <b>ELISA</b>                   | ensaio imunoenzimático (Enzyme-linked immunosorbent assay)                                                                      |
| <b>EMA</b>                     | anticorpo antiendomísio                                                                                                         |
| <b>ESPGAN</b>                  | Sociedade Europeia de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição<br>(European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition) |
| <b>HLA</b>                     | antígeno leucocitário humano                                                                                                    |
| <b>HUB</b>                     | hospital universitário de Brasília                                                                                              |
| <b>INF-<math>\gamma</math></b> | interferon – $\gamma$                                                                                                           |
| <b>IL- 15</b>                  | interleucina-15                                                                                                                 |
| <b>LIE</b>                     | linfócitos intraepiteliais                                                                                                      |
| <b>TLR</b>                     | testes laboratorial remoto                                                                                                      |
| <b>tTG</b>                     | anticorpo anti-transglutaminase                                                                                                 |
| <b>UnB</b>                     | Universidade de Brasília                                                                                                        |

## RESUMO

**Introdução:** O ácido fólico é um dos elementos essenciais para o desenvolvimento normal do feto e sua deficiência durante a gestação pode resultar no aparecimento de defeitos do fechamento do tubo neural (DTN). A doença celíaca (DC), caracterizada por intolerância ao glúten, pode resultar em má absorção de nutrientes que frequentemente resulta em deficiência de ácido fólico e, conseqüentemente, numa possível maior prevalência de DTN na prole de mães com DC. **Objetivo:** Determinar a prevalência de DC em um grupo de mães de crianças portadoras de DTN. **Métodos:** Mães com filhos afetados por DTN atendidas em ambulatório de Neurocirurgia Pediátrica do Hospital de Base de Brasília, foram submetidas ao teste de antiendomísio (IgA-EMA), pelo método de imunofluorescência indireta sobre secções criostáticas de esôfago de primata. **Resultados:** Foram investigadas 208 mães, com idades compreendidas entre 19 e 43 anos (média: 33 anos; mediana: 32 anos). Todas as mães apresentaram EMA negativo. **Conclusões:** Nossos resultados sugerem que a DC materna não é um fator de risco para aparecimento de DTN. Conseqüentemente, até o presente, uma rotina de rastreamento para DC em mulheres grávidas a fim de evitar uma possível gestação agravada por DTN não seria justificável.

**Descritores:** doença celíaca, defeitos do tubo neural, ácido fólico

## ABSTRACT

**Introduction:** Folic acid is one of the elements essential for the normal development of the fetus. Its deficiency during pregnancy can result in the appearance of neural tube closure defects (NTD). Celiac disease, characterized by intolerance to gluten, can result in poor absorption of nutrients potentially leading to deficiency of folic acid which could possibly result in a higher prevalence of NTD in celiac mothers offspring.

**Objective:** To determine the prevalence of CD in a group of mothers of children affected by NTD. **Methods:** Mothers with children affected by NTD attending the walking in clinic of the Neuropediatric Surgical Unit of the Brasilia General Hospital, underwent antiendomysium serologic testing (IgA-EMA), utilizing the indirect immunofluorescence method on cryostat sections of monkey esophagus. **Results:** Two hundred-eight mothers, aged between 19 and 43 years (average: 33 years; median: 32 years) were tested. All mothers showed negative results on the EMA test. **Conclusions:** The negative results of the study suggest that celiac disease is not a risk factor for NTD in the offspring. Consequently, at this moment, routine screening for CD in pregnant women in order to avoid a possible pregnancy aggravated by NTD would not be justifiable.

**Key-words:** celiac disease, neural tube defects, folic acid.



## **1. Introdução**

### **1.1 Definição**

A doença celíaca (DC), também conhecida como enteropatia sensível ao glúten, é afecção caracterizada principalmente por uma síndrome de má absorção resultante de lesões inflamatórias da mucosa do intestino delgado, provocadas por mecanismo auto-imune mediado, maiormente por células T. A DC é causada, em indivíduos geneticamente predispostos, pela ingestão de glúten, encontrado no trigo e em cereais afins (centeio e cevada). Estrita dieta sem glúten leva a notável melhora, tanto clínica quanto histológica havendo, no entanto, progressiva reincidência dos sintomas e das lesões com a reintrodução do glúten. A DC que era originalmente considerada uma síndrome rara, incidente principalmente em crianças, é atualmente reconhecida como sendo uma afecção bastante comum que pode vir a ser diagnosticada em qualquer idade e que afeta além do trato gastroentérico, vários outros órgãos e sistemas (Farrell e Kelly, 2002; Green e Cellier, 2007).

## 1.2 Histórico

Arateus da Capadócia foi o primeiro a descrever a DC no século II d.C caracterizando-a pela presença de diarreia crônica, e pelo comprometimento do estado geral e atrofia do corpo (Paveley, 1988). Esta afecção caiu no esquecimento, somente em 1888 veio a ser novamente descrita por Samuel Gee, médico inglês (Auricchio e Troncone, 1996).

A ausência de qualquer tratamento efetivo fazia com que a doença fosse acompanhada de alta mortalidade. Como exemplo pode-se citar o trabalho pioneiro de acompanhamento de pacientes com DC, publicado por Hardwick em 1939: das 73 crianças com DC por ele estudadas, 36% vieram a falecer antes da adolescência (Hardwick 1939).

A primeira associação, entre a ingestão de alguns cereais, como trigo, cevada e centeio, e a eclosão da DC, foi aventada por Dicke, pediatra holandês que apropriadamente observou nítida melhora das crianças celíacas em período de grande fome e principalmente escassez de derivados de trigo durante o período final da Segunda Guerra Mundial. Com o início do abastecimento normal e a conseqüente reintrodução de farináceos na dieta, as crianças celíacas voltaram a apresentar sintomatologia e piora do seu estado geral (Van Berge-Henegouwen e Mulder, 1993).

Após pesquisas iniciais de Van de Kamer, este mesmo autor em associação com Weyers e Dicke, concluiu que o trigo, centeio e cevada eram os principais responsáveis pela esteatorreia, identificou a seguir a gliadina (fração solúvel em

álcool da farinha de trigo), como o elemento tóxico para os celíacos (Van Berge-Henegouwen e Mulder, 1993).

Até meados da década de 50, o diagnóstico da DC era baseado exclusivamente no quadro clínico do paciente. Nessa época, diferentes autores idealizaram métodos de biópsia jejunal baseados no uso de cápsulas introduzidas por via per oral, sendo as duas mais usadas, a cápsula de Crosby e a cápsula de Watson (Paveley, 1988). Este método de biópsia permitiu observar que muitos dos pacientes que apresentavam sintomatologia clássica, também, evidenciavam significativas alterações histológicas do jejuno proximal (Mulder e Cellier, 2005). A progressiva generalização do uso da biópsia jejunal no diagnóstico da DC resultou, durante e após a década de 60, em significativo aumento do número de casos diagnosticados, principalmente, na Europa (Fasano, 2001).

Em 1962, Rubin et al demonstraram, que o glúten era o fator responsável pelas anormalidades da mucosa do intestino delgado em pacientes celíacos (Aurichio e Troncone, 1996).

A Sociedade Européia de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica (European Society of Pediatric Gastroenterology, and Nutrition - ESPGHAN), em 1969, estabeleceu os critérios diagnósticos para a doença celíaca, ressaltando a importância da realização de três biópsias intestinais (uma antes do início da dieta sem glúten, a segunda um ano após o início de estrita dieta sem glúten e a terceira após desafio com reintrodução do glúten na dieta) para que pudesse ser firmado o diagnóstico definitivo de DC (Meeuwisse, 1970).

O seguinte grande marco nos métodos de diagnóstico da DC ocorreu durante as décadas de 70 e, principalmente 80, quando surgiram novos métodos sorológicos baseados, principalmente, em ensaios imuno-enzimáticos (ELISA),

radioimunoensaios e em técnicas de imunofluorescência. Na época ficou demonstrado que a DC tinha forte associação com auto-anticorpos do tecido conectivo e em 1971, 1980 e 1984 foram introduzidos, respectivamente, os anticorpos antireticulina, anticorpos antigliadina e anticorpo antiendomísio (EMA). Os testes sorológicos foram desenvolvidos na tentativa de se evitar biópsia desnecessária selecionando os pacientes que deveriam se submeter ao procedimento (Bittolo et al, 1990).

Dieterich et al (1997) identificaram a transglutaminase tecidual (tTG) como o principal e possivelmente o único auto-antígeno causador da DC. Atualmente, a presença de anticorpos anti-transglutaminase detectados pelo método ELISA constitui-se no principal método de rastreamento sorológico de casos da doença (Fasano e Catassi, 2001). Graças aos avanços destes testes sorológicos, cada vez mais sensíveis e específicos, a verificação da forma clássica da doença celíaca progrediu significativamente (Fasano 2001).

Nas últimas décadas o número de testes laboratorial remoto (TLR) tem aumentado significativamente. Os TLRs tem uma grande vantagem em relação aos testes sorológicos feitos em laboratórios, pois podem ser executado fora do ambiente laboratorial. Trata-se de um teste de fácil execução que apresenta resultados quase imediatos, em torno de cinco minutos o paciente obtém a resposta do teste (Kost, 1999). Esse tipo de teste mostrou ser muito eficaz para gestão de diabetes mellitus (Blake e Nathan, 2004). Sugerindo uma possível utilização de TLR na detecção e gestão de outras doenças autoimunes. Recentemente Korponay et al (2005), descobriram que a tTG do próprio paciente pode ser usada na detecção da DC. A liberação da tTG das células vermelhas do sangue ocorre por meio de uma hemólise na amostra de sangue total do paciente, possibilitando o uso de TLR em

pacientes com DC. Estes pesquisadores mostraram que o TLR pode ser um meio inovador de detecção da DC fora dos laboratórios, além de ter um papel importante na vigilância dos pacientes celíacos depois da adesão a dieta livre de glúten (Raivio et al 2006; Raivio et al 2007).

### **1.3 Quadro Clínico**

As manifestações clínicas da DC variam de acordo com a idade do paciente. Infantes e pré-escolares geralmente apresentam a forma clássica da doença caracterizada por diarreia, dor e distensão abdominal, emagrecimento e falta de crescimento. Contudo vômitos, anorexia e constipação também são muito comuns. Já em escolares e adolescentes manifestações extra-intestinais, tais como baixa estatura, sintomas neurológicos ou anemia, podem dominar o quadro clínico (D'Amico et al, 2005). Por razões ainda não determinadas, possivelmente pelo fato das doenças autoimunes serem mais prevalentes no sexo feminino, a DC é três vezes mais comum em mulheres. Esta diferença tende a desaparecer após os 65 anos de idade (Green et al, 2001). A apresentação clássica da doença, em adultos, é também caracterizada por diarreia freqüente que pode ser acompanhada por distensão e desconforto abdominal. No entanto, os sintomas clássicos podem ser geralmente observados em menos de 50% dos casos. Formas silenciosas ou monossintomáticas em adultos incluem anemia ferropriva resistente ao tratamento, osteoporose, constipação, perda de peso, sintomas neurológicos, principalmente, epilepsia e ataxia, dermatite herpetiforme, hiponatremia, hipocalcemia e elevação

das enzimas hepáticas (Green, 2005). Significativa perda de peso é atualmente um sintoma pouco presente. Em contraste, cerca de 30% dos pacientes celíacos recém diagnosticados apresentam sobrepeso (Dickey e Kearney, 2006) e frequentemente, antes de alcançar o diagnóstico definitivo de DC, evidenciavam longa história de inexplicáveis sintomas variáveis e vagos (Green et al, 2001).

A DC é uma desordem do intestino delgado proximal que pode, no entanto, em alguns indivíduos, envolver todo o intestino delgado. A localização proximal das anormalidades do intestino delgado, geralmente resulta em má absorção de ferro, ácido fólico, cálcio e diversas vitaminas, com resultante deficiência de ferro e anemia, deficiência de folato e redução de densidade óssea. Quando apenas o intestino proximal está comprometido, freqüentemente os pacientes não se queixam de diarreia, devido ao fato do intestino delgado distal compensar e absorver produtos de gorduras e fazer a digestão de carboidratos (Green e Jabri, 2003).

A disponibilidade de testes sorológicos sensíveis e confiáveis permitiu a busca ativa de novos casos principalmente por meio de extensos estudos de rastreamento, o que veio a modificar significativamente a avaliação das possíveis apresentações da DC. Estes estudos evidenciaram que, apesar da diarreia ser ainda o principal sintoma inicial, esta queixa estava presente em menos de 50% dos pacientes, dado este significativo se comparado à prevalência de quase 100% encontrada em estudos da década de 60, antes do advento dos testes sorológicos. O segundo principal grupo diagnosticado, por meio de busca ativa de casos, vinha a ser o de parentes em primeiro grau de indivíduos afetados (Green e Jabri, 2003; Lo et al, 2003).

Apesar de ainda controversa é descrita uma associação entre a DC e a infertilidade tanto feminina como masculina, sendo que a introdução da dieta livre de

glúten levaria ao restabelecimento da fertilidade (Stazi e Mantovani, 2000). Mulheres afetadas, em uso de dieta com glúten, também apresentariam maiores risco de abortos espontâneos, natimortos, restrição de crescimento intra-uterino e maior incidência de recém-nascidos com baixo peso (Sheiner et al, 2006; Gasbarrini et al, 2000). Outras desordens reprodutivas como a disfunção sexual e algumas complicações obstétricas são encontradas em pacientes com DC. Estas desordens reprodutivas podem ser conseqüências de alterações endócrinas causadas pela deficiência de nutrientes (Rostami et al, 2001).

Está fortemente evidenciado que a dermatite herpetiforme é uma manifestação de pele na DC. Muitos pacientes com dermatite herpetiforme apresentam biópsia com alterações na mucosa intestinal, característica de DC, apresentando atrofia vilositária parcial ou completa, mesmo na ausência de sintomas gastrointestinais ou características de má absorção (Abenavoli et al, 2006).

A anemia por deficiência de ferro é uma das manifestações não gastrointestinais mais comuns da DC e frequentemente é a manifestação clínica primária em adultos (Mody et al, 2003). Recentemente em estudo feito nos EUA, utilizando biópsia do intestino delgado rotineira para diagnóstico de DC, foram encontrados 8,7% dos pacientes com anemia por deficiência de ferro (Grisolano et al, 2004).

A ampla gama de manifestações clínicas da DC pode ainda abranger alterações endocrinológicas, neurológicas e psiquiátricas importantes, osteopenia e conseqüente osteoporose, defeitos do esmalte dentário, lesões de pele e, em longo prazo, incidência aumentada de neoplasias, principalmente de linfomas e carcinomas do trato gastroentérico (Farrel e Kelly, 2002).

Freqüentemente o quadro clínico da DC é dividido em quatro subtipos, com base na presença ou não de sintomas gastrointestinais, presença de testes sorológicos positivos, pesquisa de alelos do HLA e alterações da mucosa. Assim, pode-se encontrar a forma clássica, a forma atípica, a forma silenciosa e a forma potencial ou latente (Cert-Bensussan et al, 2003; Alaedini e Green, 2005).

A forma sintomática ou doença celíaca clássica apresenta sintomas como diarreia, perda de peso, anemia e fraqueza. A idade em que ocorre o início dos sintomas pode variar muito, o que talvez dependa da quantidade de glúten na dieta e de outros fatores ambientais como, por exemplo, a duração do aleitamento materno (Hill et al, 2005). Os sintomas geralmente começam em algumas semanas ou poucos meses após a introdução de alimentos contendo glúten, isso pode resultar em progressiva perda de peso juntamente com diminuição na relação de peso por altura. Sinais clássicos de má absorção incluem deficiência de ferro, hipoalbuminemia, hipocalcemia e deficiência de vitaminas. As anormalidades histopatológicas são mais marcantes em duodeno e jejuno superior, mas as lesões apresentam grande variabilidade podendo se estender a outras regiões da mucosa. Em raros casos todo o intestino delgado pode estar envolvido (Fasano e Catassi, 2001, Green e Jabri, 2003).

A forma silenciosa pode ser caracterizada pela presença de mudanças histológicas da parte proximal do intestino em pacientes assintomáticos (Fasano e Catassi, 2001). Pacientes que apresentam a DC na forma silenciosa normalmente são identificados durante uma endoscopia ou biópsia intestinal por outras causas ou em estudos de rastreamento populacional (Lo et al, 2003). Um grande número destes pacientes tem sido relatado nos grupos de risco da DC, como diabetes do

tipo1, síndrome de Down e parentes de primeiro grau de celíacos (Catassi et al, 2002).

O termo doença celíaca atípica é usado para caracterizar pacientes que apresentam sintomas extra-intestinais como, por exemplo, anemia resistente ao tratamento, dores articulares, nefropatia por IgA, osteoporose, baixa estatura, infertilidade e uma variedade de doenças neurológicas, principalmente epilepsia e ataxia. Nesta forma da doença, os sintomas gastrointestinais são mínimos ou completamente inexistentes. É sempre importante considerar a possibilidade de DC nestes pacientes, pois a presença de sintomas atípicos frequentemente retarda o diagnóstico da doença (Rostami et al, 2001; Chin et al, 2003; Farrel e Kelly, 2001).

A DC na forma potencial ou latente está presente em pessoas portadoras dos alelos HLA predisponentes (DQ2 ou DQ8) que poderão vir a desenvolver a doença no futuro, ou que já tem a doença, mas que por ocasião da investigação diagnóstica encontram-se assintomáticas e com mucosa normal à biópsia, apesar de apresentarem testes sorológicos positivos (Catassi et al, 2002; Green e Jabri, 2003). A história natural da DC potencial ou latente não está ainda completamente esclarecida, mas existem relatos de pacientes com esta condição que evoluíram posteriormente para forma inequívoca de DC com as típicas alterações atróficas da mucosa jejunal e manifestações clínicas compatíveis (Dewar e Ciclitira, 2005).

Devido a essa grande variabilidade na apresentação clínica da DC, alguns pesquisadores descreveram as formas clínicas da doença como um “iceberg” (Figura 1), no qual a doença é evidente apenas no pico emergente (Mäki e Collin, 1997). A grande variabilidade clínica da DC, exemplificada pela figura do “iceberg celíaco” em que a doença aparente é representada tão somente pelo pico emergente, justifica considerar a DC como importante problema de saúde pública.

Os fatores genéticos e ambientais que influenciam a expressão da DC e sua passagem de latente para sintomática permanecem obscuros. Fatores ambientais outros, que não o glúten, com impacto direto sobre o sistema imune do indivíduo provavelmente estão envolvidos (Cerf-Bensussan et al, 2003).

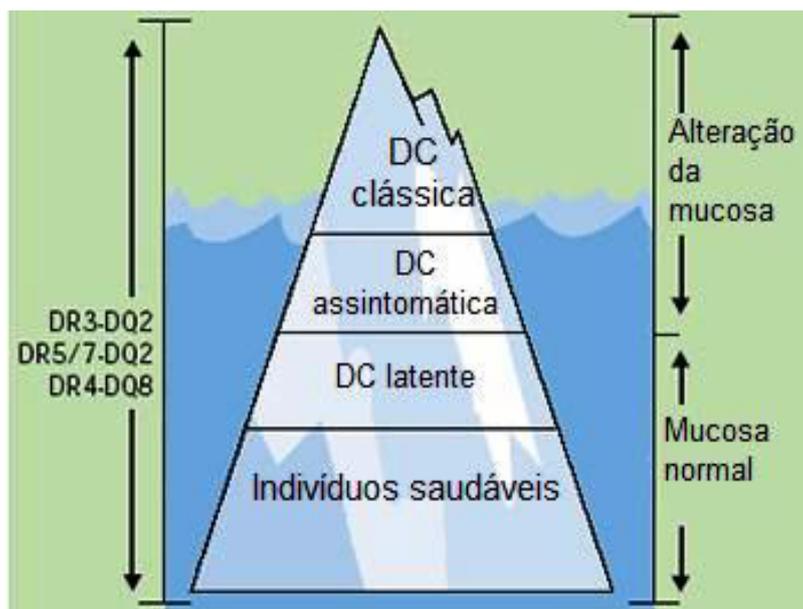


Figura 1: Iceberg Celíaco

Fonte: Adaptada de Mäki e Collin, 1997

#### 1.4 Desordens associadas

Vários estudos têm apontado para forte associação entre a DC e diferentes outras patologias. O diagnóstico de DC tem se tornado cada vez mais freqüente entre pacientes predominantemente afetados por manifestações extra-intestinais. É conseqüentemente importante que pacientes com sintomatologia extra-intestinal sugestiva de DC sejam cuidadosamente avaliados e submetidos à testes

sorológicos. O aparecimento de algumas destas desordens, como por exemplo, osteoporose, baixa estatura, anemia e determinados problemas reprodutivos, ocorrem após a eclosão da DC e estão comumente relacionados à má absorção de nutrientes, podendo ser resolvidas com adesão à dieta sem glúten. Outro grande grupo de afecções associadas inclui algumas desordens endócrinas, desordens neurológicas e síndromes genéticas, além de doenças neoplásicas (Aleadini e Green, 2005).

A osteoporose é uma das mais conhecidas manifestações associadas com a DC e persistente atrofia vilositária está freqüentemente associada à baixa densidade mineral óssea (Fasano e Catassi, 2005). É recomendável que toda criança com DC seja submetida à medição de densidade mineral óssea. Já em pacientes adultos, com comprovada baixa densidade óssea, rastreamento sorológico para exclusão da coexistência de DC torna-se mandatório (Barera et al, 2000; Bardella et al, 2000). A baixa densidade de mineralização óssea pode ser explicada pela deficiência secundária de cálcio e vitamina D proveniente da má absorção intestinal. Alguns estudos efetuados em crianças com DC que apresentavam osteoporose associada mostraram que uma recuperação completa da densidade óssea pode ser obtida através de dieta livre de glúten (Tau et al, 2006; Kalayci et al, 2001). No entanto, em adultos com osteoporose secundária a DC a adoção de dieta livre de glúten não obteve os mesmos resultados o que ressalta a importância de diagnóstico precoce no intuito de prevenir irreversível osteoporose (Fasano e Catassi, 2005).

Apesar de questionado por alguns autores, aparentemente pacientes celíacos apresentam um risco moderadamente aumentado de neoplasias, principalmente de adenocarcinoma esofágico, carcinoma da orofaringe e linfoma não Hodgkin sendo que, em sua maioria, a neoplasia destes pacientes é diagnosticada antes da

confirmação da co-existência de DC (Holmes et al, 1989; Green et al, 2003; Catassi et al, 2002).

Dentre as endocrinopatias de causa autoimune eventualmente associadas à DC vale citar a diabetes do tipo 1 e doenças da tireóide (Aleadini e Green, 2005). Alguns pesquisadores sugerem que a alta prevalência de doenças auto-imune encontradas em pacientes com DC, está fortemente relacionada com a duração da exposição ao glúten desde que diagnóstico efetuado em crianças menores de dois anos de idade tem evidenciado menor frequência de afecções auto-ímunes (Green e Jabri, 2003). Estudos mostram que a dieta isenta de glúten, pode promover diminuição ou até o desaparecimento dos auto-anticorpos específicos em pacientes celíacos com doenças endócrinas auto-ímunes associadas (Toscano et al, 2000; Ascher, 2001).

A síndrome de Down encontra-se frequentemente associada à DC e vários estudos mostram uma alta prevalência de DC (4,6 a 6,3%) em pacientes com síndrome de Down (Bonamico et al, 2001; Carnicer et al, 2001 Roizen e Patterson, 2003). Existe uma dificuldade em se detectar alguns dos sintomas clássicos da DC em crianças com síndrome de Down, como por exemplo, diarreia e distensão abdominal, pois geralmente, estas crianças não apresentam uma manifestação clínica sozinha, e mesmo existindo sintomas típicos da DC, estes sintomas podem ser considerados clinicamente insignificantes ou possivelmente são atribuídos à própria síndrome de Down e não à DC (Carnicer et al, 2001).

Outras entidades de origem genética ou imunológica, como a síndrome de Turner, a síndrome de Sjögren e deficiência de IgA, freqüentemente aparecem associadas à DC. Recentemente em um estudo multicêntrico na Itália, onde participaram 389 pacientes com síndrome de Turner, foi encontrada uma prevalência

de 6,4% de DC nestes pacientes (Bonamico et al, 2002). A síndrome de Sjögren aparece em aproximadamente 3,3% de pacientes com DC (Collin et al, 1994). A prevalência de DC entre pacientes com deficiência de IgA é de aproximadamente 2,6% (Cataldo et al, 1998).

Diversos problemas neurológicos estão associados à DC, dentre eles, os mais comuns são: ataxia cerebelar, neuropatia periférica, epilepsia e enxaqueca (Luostarinen et al, 2003). Fatores nutricionais parecem estar associados às complicações neurológicas encontradas em pacientes com DC mas raramente consegue-se identificá-los (Muller et al, 1996; Chin et al, 2003). Alguns estudos mostram que alguns sintomas neurológicos desaparecem quando o paciente é submetido a uma dieta livre de glúten (Cicarelli et al, 2003).

Pesquisas esclarecendo os mecanismos responsáveis pela relação entre a DC e outras afecções ainda estão em fase preliminar apesar de estas associações terem sido reconhecidas já há muitos anos. Atualmente parece ser evidente que a ligação é dependente de um substrato genético comum, principalmente da região HLA situada no cromossomo 6 (Collin et al, 2002). Além de predisposição genética comum é provável que também fatores imunológicos influenciem esta relação. Isto poderia ocorrer em consequência de reatividade cruzada dos anticorpos ou das células T, mecanismo este suspeito de desencadear a resposta imune em algumas doenças autoimunes (Lang et al, 2002; Wucherpfennig e Strominger, 1995).

## **1.5 Patogênese**

Defeitos no processamento de antígenos pelas células epiteliais, juntamente com as propriedades intrínsecas da gliadina, assim como o haplótipo do HLA-DQ do indivíduo são considerados os principais fatores envolvidos na patogênese da DC. Fatores ambientais, genéticos e imunológicos são muito importantes na patogênese da doença celíaca. A complexa interação entre estes fatores dificulta sua identificação e impõem limites à completa compreensão dos mecanismos patogênicos da doença. A apresentação do peptídeo da gliadina e a ativação das células T são eventos críticos na patogênese da doença (Kagnoff, 2005; Torres et al, 2007).

### **1.5.1 Fatores ambientais**

O fator ambiental mais importante para o aparecimento da doença celíaca é constituído pelas proteínas presentes no trigo, centeio e cevada. Apesar dessas proteínas receberem em conjunto a denominação de glúten este termo deveria mais precisamente referir-se somente às proteínas do trigo, ou seja, as gliadinas e gluteninas que contêm os peptídeos ativadores da resposta imune na DC. As proteínas do centeio e aveia contêm respectivamente os peptídeos secalina e avenina, que são também tóxicos. A cevada, que contém a ordeína, raramente consegue provocar resposta imune efetiva (Van de Wal et al, 1999).

As gliadinas, gluteninas, ordeinas e secalinas possuem alto teor de prolinas e glutaminas. A alta concentração de prolinas as torna resistentes à digestão

proteolítica completa pelas enzimas gástricas, pancreáticas e do epitélio jejunal devido principalmente à deficiente atividade da prolilendopeptidase. Isto leva ao acúmulo de fragmentos peptídicos grandes com alto teor de prolina e glutaminas no intestino delgado (Dewar et al, 2006; Vader et al, 2003).

A gliadina consiste em uma cadeia polipeptídica de 250 a 650 aminoácidos e pode ser separada por meio de eletroforese em quatro frações cujo peso molecular varia de 20 a 75 kilodaltons (kDa). Essas frações foram denominadas gliadinas alfa, beta, gama e ômega sendo que todas parecem ser tóxicas para os pacientes celíacos (Ciclitira e Ellis, 1987).

Shan et al (2002) mostraram em estudos *in vitro* e *in vivo*, com ratos e com humanos, que o peptídeo 33-mer da  $\alpha$ -gliadina é importante candidato a ser o principal causador dos efeitos tóxicos da DC, pois contém epítomos críticos (ricos em glutamina e prolina), além de apresentar resistência à digestão no lúmen, penetrar a barreira epitelial, e produzir elevada estimulação antigênica das células T CD4<sup>+</sup>. Esse peptídeo reage com a transglutaminase (tTG) que desamina certas glutaminas residuais de glúten para ácido glutâmico e constitui-se no principal se não o único autoantígeno na DC (Torres et al, 2007).

### **1.5.2 Fatores genéticos**

Os fatores genéticos na patogênese da DC foram evidenciados por meio de estudos em familiares de pacientes celíacos (Louka e Sollid, 2003). A participação de fatores genéticos na suscetibilidade da DC é fortemente influenciada pelos genes do *locus* do Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) e seus produtos

gênicos, os antígenos leucocitários humanos (“Human Leukocytes Antigens” - HLA) (Stokes et al 1972).

O CPH está localizado no cromossomo 6p21.3 ocupando um segmento de 3500 Kb do DNA, compreendendo mais de 100 genes, dos quais pelo menos quarenta por cento apresentam funções presumidamente do sistema imune. O complexo é dividido em regiões que contém grupos de genes codificadores de moléculas de classe I, que abrange os genes A, B, C, E, F e G; de classe II, representados pelos genes da região HLA-D que é dividida em três *loci*: DR, DQ e DP; e de classe III, que contém um grupo diverso de genes que codificam as moléculas do sistema complemento e outras proteínas (Bevan et al, 1999). As moléculas HLA de classe II são expressas na superfície das células apresentadoras de antígeno, onde podem se ligar a peptídeos estranhos encontrados no ambiente extracelular e posteriormente apresentar estes peptídeos a populações de células T CD4<sup>+</sup> que reconhecem o complexo dos peptídeos associado aos alelos DQ2 ou DQ8 (Kagnoff, 2005).

Inicialmente a DC foi associada à molécula B8 do HLA de classe I (Fauchuk et al, 1972). Atualmente está definitivamente demonstrada a associação entre a DC e antígenos HLA da classe II. Nítidas evidências apontam para expressão dos heterodímeros HLA-DQ2, codificado pelos genes DQA1\*0501 e DQB1\*0201 e HLA-DQ8, codificado pelos genes DQB1\*0302 e DQA1\*0301 como responsáveis pela suscetibilidade à doença. No entanto, estima-se que os antígenos do HLA são somente responsáveis por 40% do risco familiar de DC (Bevan et al, 1999). Ao que tudo indica, outros genes, não pertencentes ao sistema HLA, são determinantes potentes da susceptibilidade à doença. Estudos sobre a associação de genes

candidatos focam-se em genes de relevância conhecida para a imunopatogênese da doença (van Heel et al, 2005).

A suscetibilidade dos alelos DQ2 pode ser herdada em *cis* (no mesmo cromossomo) em pacientes celíacos homocigotos, ligados ao DR3 ou em *trans* (em cromossomos diferentes) em indivíduos heterocigotos ligados ao DR5/DR7 (Figura 2) (Sollid et al, 1989).

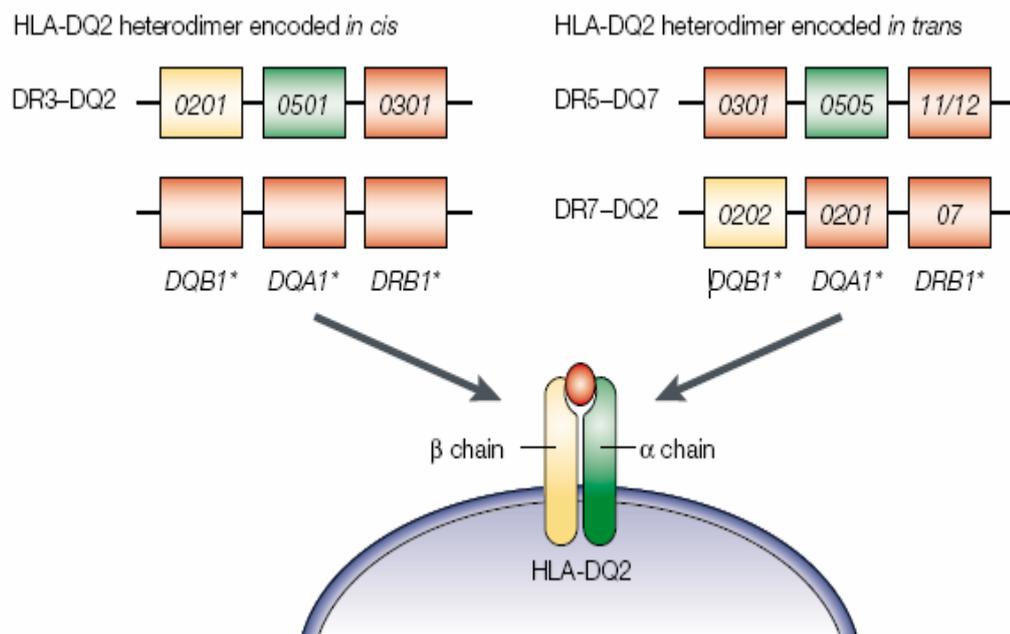


Figura 2: Haplótipos que predisõem à doença celíaca: DQA1\*05 e DQB1\*02 com disposição em *cis* (mesmo cromossomo) ou em *trans* (em cromossomos diferentes) codificam o heterodímero alfa, beta DQ2 presente na maioria dos pacientes com doença celíaca.

Fonte: Adaptada de Louka e Sollid, 2003.

A existência de tendência familiar para DC é evidenciada pela prevalência aumentada em parentes celíacos e pela concordância de 60-70% encontrada em estudos de gêmeos homocigotos (Greco et al, 2002; Hogberg et al, 2003).

Sabe-se que 90-95% dos pacientes com DC estão associados ao HLA-DQ2 (DQA1\*0501 e DQB1\*0201) e o restante com o HLA-DQ8 (DQB1\*0302 e

DQA1\*0301), entretanto apenas uma pequena porção desses indivíduos desenvolve a DC, mostrando que apesar de importante, o HLA-DQ2 ou DQ8 sozinhos não são suficientes para a eclosão da doença (Louka e Sollid, 2003; Sollid et al, 1989). Estudo feito com pacientes celíacos europeus mostra que pequena porcentagem (cerca de 6%) destes indivíduos, não apresentam o alelo HLA-DQ2, apenas o HLA-DQ8 (Karrel et al, 2003).

Apesar da indubitável importância dos genes HLA DQ2 e DQ8 estima-se que genes não HLA tenham influência ainda maior na predisposição para a doença. No entanto, tentativas de mapeamento por meio de análises de ligação não revelaram até o momento com precisão os genes ou as regiões cromossômicas responsáveis pela doença. Isto sugere que cada provável gene predisponente possui somente influência mínima na eclosão da afecção (Sollid, 2000).

Alguns estudos sugerem que além da forte influência dos genes do CPH de classe II, também genes da região de classe III podem apresentar importante papel na susceptibilidade para a DC (McManus et al, 1996). Os genes da classe III do CPH codificam fatores que participam na modulação da resposta imune e que podem determinar a heterogeneidade clínica da DC (Pena et al, 1998).

A identificação de genes responsáveis pela suscetibilidade para a doença celíaca poderia ampliar as possibilidades de diagnóstico e prognóstico, permitindo uma melhor compreensão da etiologia da doença, abrindo espaço para novas terapias, podendo até melhor explicar a freqüente sobreposição clínica com outras doenças auto-imunes (van Heel et al, 2005).

### 1.5.3 Fatores Imunológicos

A imunopatogenese da DC pode ser grosseiramente dividida em três séries de eventos principais: (a) eventos que se iniciam no lúmen e mucosa intestinal; (b) ativação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> auxiliares; (c) eventos subseqüentes levando a lesão do epitélio intestinal. A característica principal dos eventos que se iniciam no lúmen e na mucosa intestinal é conseqüente de ingestão do glúten por indivíduos geneticamente suscetíveis. O glúten não é completamente digerido devido ao seu alto teor de prolina dando origem conseqüentemente a um grande número de peptídeos de glúten não digeridos. Estes peptídeos atravessam a barreira epitelial alcançando a lâmina própria onde eles encontram a transglutaminase tecidual (tTG) e as células apresentadora de antígeno que expressam os alelos HLA-DQ2 ou DQ8, alelos estes, necessários a ligação desses peptídeos ricos em prolinas que são deaminados pela tTG. Na seqüência dessa série de eventos as células apresentadoras de antígenos apresentam esses peptídeos a populações de linfócitos T CD4<sup>+</sup> restritos pelos alelos HLA-DQ2 e DQ8, que tornam-se ativados e secretam mediadores que levam finalmente a lesão tecidual (Kagnoff 2007; Guandalini e Gokhale, 2002).

A DC está fortemente associada com a presença de anticorpos contra a proteína do glúten e autoanticorpos contra componentes de tecidos conjuntivos, principalmente, senão exclusivamente a tTG. É possível que auto-anticorpos contra a tTG estejam também envolvidos com manifestações extraintestinais da doença (Alaedini e Green, 2005).

A tTG, como já citado, é o principal, senão o único alvo dos auto-anticorpos que pode ser detectada em todas as camadas da parede do intestino delgado,

principalmente na submucosa, sendo encontrada aumentada em amostras de biópsias intestinais de pacientes com DC (Molberg et al, 1998; Esposito et al, 2003). A tTG promove a deaminação dos peptídeos do glúten originando resíduos de ácido glutâmico, carregados negativamente. A retirada do grupo amina tem um papel importante para o reconhecimento destes peptídeos pelas células T CD4<sup>+</sup>. Além disso, a introdução de cargas negativas nos peptídeos do glúten favorece a sua ligação com aminoácidos básicos localizados nas moléculas HLA-DQ2 ou DQ8 das células apresentadoras de antígeno e promovem forte estimulação de clones de linfócitos T CD4<sup>+</sup> específicos para a gliadina (Schuppan, 2000).

A ativação das células T CD4<sup>+</sup> específicas para a gliadina pode ser considerada o evento chave no desenvolvimento da DC, isto poderia ajudar a explicar o importante papel da genética dominante do HLA de classe II na doença. As células T CD4<sup>+</sup> após reconhecerem os peptídeos do glúten emitem respostas do tipo Th1 e Th2. A resposta do tipo Th1 produz principalmente citocinas, as quais provocam a proliferação celular nas criptas intestinais e induzem a secreção de metaloproteinases de matriz pelos fibroblastos intestinais, causando a destruição da mucosa característica da DC. Um infiltrado inflamatório, com células mononucleares e fibroblastos, torna a produção de tTG e a deaminação da gliadina ainda mais ativas, potencializando a apresentação dos antígenos e a resposta imune das células T CD4<sup>+</sup> (Pender et al, 1997; Kagnoff, 2005). A resposta do tipo Th2 produz interleucinas, que promovem a maturação dos plasmócitos e conseqüente produção de anticorpos contra a gliadina, tecidos conectivos, transglutaminase tecidual e complexos gliadina-tTG (Figura 3) (Kagnoff, 2007; Alaedini e Green, 2005).

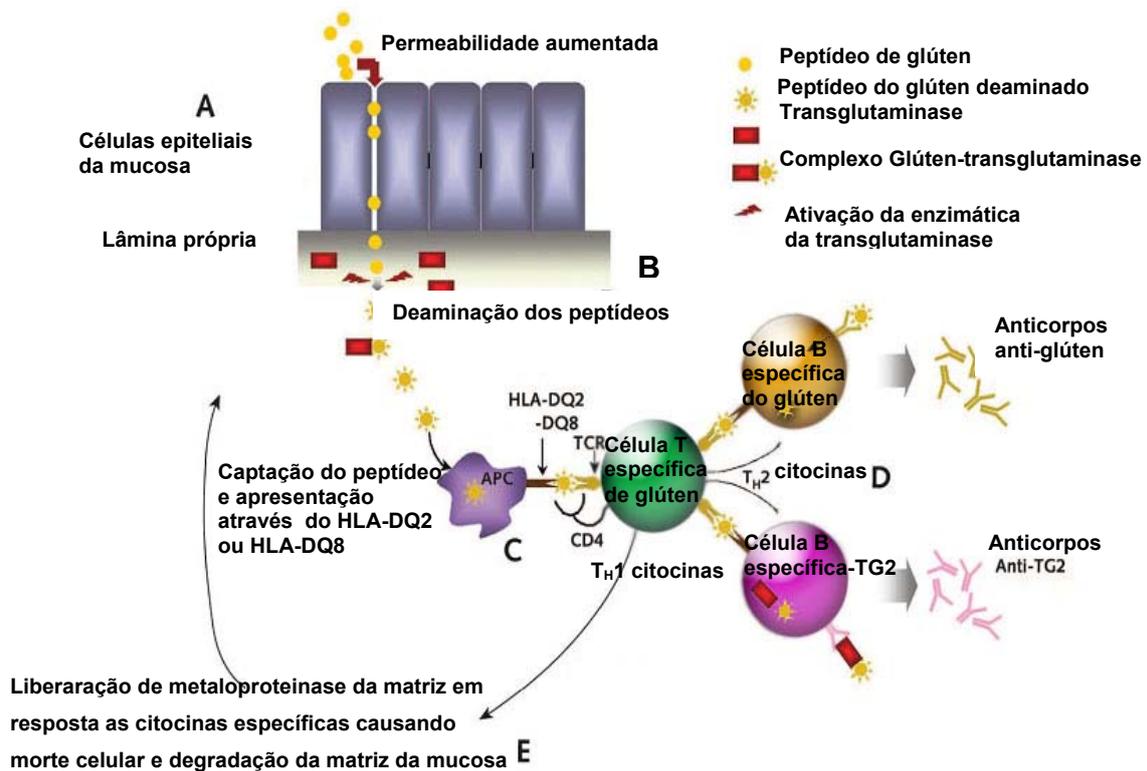


Figura 3: A: Peptídeos do glúten resistentes a enzimas digestivas chegam a lâmina própria após a permeabilidade intestinal aumentada. B: Introdução dos peptídeos que são deaminados pela atividade enzimática da transglutaminase 2 (TG2), criando epítopos com maior potencial imunestimulatório. C: Peptídeos do glúten deaminados são apresentados no complexo com moléculas do HLA-DQ2 ou DQ8 pelas células apresentadoras de antígenos (APC), tais como células dendríticas, macrófagos ou células B para células  $TCD4^+$ . D: Células B específicas para o glúten recebem ajuda de células T específicas do glúten, levando a expansão clonal de células B e liberação de anticorpos contra o glúten. Células B específicas para TG2 também recebe ajuda de células T específicas do glúten, quando retoma o complexo glúten-TG2 e especificamente apresentar os peptídeos do glúten para as células T. Este hipotético mecanismo intermolecular de ajuda, tem sido proposto para explicar a liberação de anticorpos anti-transglutaminase na ausência de células T específicas para transglutaminase. E: Expressão de citocinas pro-inflamatórias ativadas por células T que promovem a liberação da matriz de metaloproteinase que causam danos as células epiteliais e tecidos de remodelação. A lesão tecidual resultante leva a uma maior liberação de transglutaminase 2. TCR = Receptor de células T.

Fonte: Adaptada de Aleadini e Green, 2005.

A produção de interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) pelas células T  $CD4^+$ , promove reações inflamatórias ricas em macrófagos, isto pode ser considerado um dos motivos principais para o início de danificação a mucosa intestinal na DC (Torres et al, 2007).

Estudo feito com biópsias de mucosa de pacientes com DC, mantidas em cultura orgânica, mostrou que a neutralização de INF-  $\gamma$  pode impedir danos iniciais à mucosa causados pela ingestão do glúten por esses pacientes (Przemioslo et al 1995).

O aumento de linfócitos intraepiteliais (LIE) é uma característica marcante na DC, e reforça a idéia de que apenas a ativação de células T-CD4<sup>+</sup> na lâmina própria não é suficiente para explicar a expansão de LIE na DC (Green e Jabri, 2003; Cerf-Bensussan et al, 2003). Alguns autores apontam a interleucina-15 (IL-15) como a chave na indução da expansão e sobrevivência de LIE na DC. A IL-15 pode levar a uma destruição das células epiteliais pelos LIE, um processo que contribui para o desaparecimento das vilosidades do epitélio do intestino, característica da DC. A IL-15 encontra-se fortemente expressa por muitas células mononucleares da lâmina própria em indivíduos com DC ativa, enquanto estaria quase ausente em pessoas sem a doença. A persistência da expressão aumentada de IL-15 em pacientes com DC refratária, explicaria a manutenção das lesões epiteliais nestes pacientes mesmo em dieta sem glúten. Já em pacientes com DC não refratária ocorre diminuição da IL-15 durante a dieta sem glúten. Uma possível neutralização dessa citocina pode ter um valor específico na terapêutica da DC com benefícios evidentes aos portadores da doença (Stepniak e Koning, 2006; Mention et al, 2003; Cellier et al, 2000).

## 1.6 Epidemiologia

Anteriormente a DC era considerada rara e pensava-se que aparecia somente em países da Europa. Em 1950 um estudo epidemiológico encontrou uma incidência de 1/8000 na Inglaterra e de 1/4000 na Escócia (Davidson e Fountain, 1950). O diagnóstico na época era baseado na detecção de sintomas típicos, principalmente diarreia crônica, e confirmados pelas complicações características da doença. Com o aparecimento de novos métodos de rastreamento da doença, particularmente os testes sorológicos, em meados da década de 1970 o perfil epidemiológico da DC mudou consideravelmente. Estudos epidemiológicos recentes feitos na Europa e nos Estados Unidos da América (EUA) mostram uma prevalência da DC na população geral de 0,5 a 1% (Fasano et al, 2003; Fasano e Catassi, 2001).

Um estudo feito com crianças e adolescentes na Finlândia, mostrou uma prevalência de 1:99 (casos confirmados por biópsia) e 1:67 (pacientes com anitendomísis positivo e alelo DQ2 presente, porém sem biópsia confirmatória) (Mäki et al, 2003). Na Itália, estudos prévios mostraram uma prevalência aumentada de 1:210 casos de DC em crianças (Catassi, 1996). Em Portugal a prevalência encontrada, em adolescentes na população geral, foi de 1:134 (Antunes et al, 2006). Um estudo recente feito com 6286 crianças na Tunísia, mostrou uma prevalência de 1:157 para DC (Hariz et al, 2007). Estudos como estes corroboram para apontar uma maior prevalência da DC em crianças do que em adultos (Tabela 1).

Tabela 1 - Prevalência da doença celíaca em indivíduos não diagnosticados

| <i>País</i> | <i>Nº de casos</i> | <i>Faixa etária</i> | <i>Prevalência</i> | <i>Referências</i>                  |
|-------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------------------------|
| Itália      | 17201              | crianças            | 1:210              | Catassi <i>et al.</i> , 1996        |
| Hungria     | 427                | crianças            | 1:85               | Korponay-Szabo <i>et al.</i> , 1999 |
| Suécia      | 690                | crianças            | 1:77               | Carlsoon <i>et al.</i> , 2001       |
| Finlândia   | 3654               | crianças            | 1:99               | Maki <i>et al.</i> , 2003           |
| Saara       | 989                | crianças            | 1:18               | Catassi <i>et al.</i> , 1999        |
| Portugal    | 5363               | adolescentes        | 1:134              | Antunes, 2006                       |
| Israel      | 1571               | adultos e crianças  | 1:157              | Shamir <i>et al.</i> , 2002         |
| EUA         | 4126               | adultos e crianças  | 1:133              | Fasano <i>et al.</i> , 2003         |
| Argentina   | 2000               | adultos             | 1:167              | Gomez <i>et al.</i> , 2001          |
| Brasil      | 4405               | adultos e crianças  | 1:275              | Pratesi <i>et al.</i> , 2003 e      |
| Brasil      | 3000               | adultos e crianças  | 1:214              | Oliveira <i>et al.</i> , 2007       |

Fonte: Adaptada de Baptista, 2006

Recentemente um estudo multicêntrico nos EUA avaliou 13.145 indivíduos, tendo sido incluídos pacientes do grupo de risco da DC e pacientes que não apresentavam fatores de risco, a prevalência encontrada para os pacientes do grupo de risco foi de 1:22 (4,5%) quando eram parentes de primeiro grau, 1:39 (2,6%) em parentes de segundo grau e 1:56 (1,8%) em pacientes sintomáticos. A prevalência em pacientes sem fatores de risco foi de 1:133 (0,8%). De acordo com esta estimativa uma projeção do possível número de indivíduos com DC nos EUA pode ser feita, este número poderia estar representado por aproximadamente três milhões de pessoas (Fasano *et al.*, 2003; Catassi *et al.*, 2007).

O primeiro estudo de prevalência da DC na América Latina foi feito por Gandolfi *et al.* (2000) no Brasil. A prevalência encontrada por estes pesquisadores foi de 1:681 pessoas em grupo de doadores de sangue aparentemente saudáveis. Posteriormente os mesmos pesquisadores confirmaram que a DC não é rara no Brasil, através de um estudo com 4.405 pacientes externos de um hospital geral que compareceram de modo consecutivo ao laboratório clínico para a realização de

exames de sangue. A prevalência da DC encontrada foi de 1:275, esse estudo revelou ainda que em crianças menores de 15 anos a prevalência encontrada foi 2,6 vezes mais alta do que em adultos, com taxas de 1:184 e 1:474, respectivamente (Pratesi et al, 2003). Posteriormente outros trabalhos foram realizados encontrando prevalências de DC semelhantes. Melo et al (2006) encontraram uma prevalência de 1:273 entre indivíduos doadores de sangue em Ribeirão Preto, São Paulo; Pereira et al (2006) encontraram entre doadores de sangue na cidade de Curitiba, Paraná, uma prevalência de 1:417 e; na cidade de São Paulo, Oliveira et al (2007), encontraram uma prevalência de 1:214 em potenciais voluntários para doação de sangue.

Na Argentina, um estudo feito com uma população adulta e urbana mostrou uma elevada prevalência de DC (1:167) (Gomez et al, 2001).

A DC vem sendo diagnosticada com freqüência em países que não apresentam população caucasiana. A população de indivíduos do oeste do Saara apresenta a maior freqüência mundial de DC: 5,6% ou seja, 5 a 10 vezes mais freqüente do que aquela observada na Europa (Catassi et al, 1999). Nessa população foi encontrada uma forte associação dos alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8, mesmo não sendo de origem caucasiana, explicando pelo menos parcialmente, a alta prevalência de DC encontrada no Saara. Em uma perspectiva evolucionista, essa alta prevalência de DC no Saara, poderia ser explicada pela alta freqüência de genes residuais, como os dos HLA-DQ2, que possivelmente podem ter sido seletivamente neutros ou benéficos em centenas de gerações. Possivelmente estes genes se tornaram desvantajosos com o passar do tempo, devido a mudanças dramáticas no contexto ambiental que eventualmente ocorreu no norte do Saara (Catassi et al, 2001).

Na Índia a DC vem sendo cada vez mais diagnosticada, e frequentemente ocorre como uma apresentação típica em crianças, aparecendo principalmente com diarreia e déficit de crescimento. Em estudo feito com 4347 crianças, a prevalência encontrada foi de 1:310 casos com DC confirmada (Yachha e Poddar, 2007; Sood et al, 2006).

A DC ainda é pouco diagnosticada em países onde grandes estudos epidemiológicos não foram feitos. A experiência europeia mostrou que além de fatores genéticos e ambientais, a apresentação clínica da DC pode divergir muito, isso explicaria a diferença da prevalência previamente relatada em países vizinhos na Europa. Uma comparação entre a prevalência estimada (baseada na ocorrência de sintomas típicos) e de estudos de rastreamento sorológico mostraram que a DC é uma desordem comum, mas a exteriorização clínica da afecção somente com sintomas gastrointestinais é o que pode ser considerado raro principalmente no adulto. Em países em que o diagnóstico era exclusivamente baseado em sintomatologia gastroentérica a doença era considerada rara até que estudos de rastreamento na população geral mostraram o contrario (Fasano e Catassi, 2001).

## **1.7 Diagnóstico**

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

Em 1970 foram definidos os critérios de diagnóstico atuais para DC. Em 1990, estes critérios, foram revisados e atualizados pela ESPGAN. Tais critérios são

baseados principalmente, na sorologia positiva e em uma biópsia do intestino delgado mostrando dano a mucosa característico, seguidos de melhora clínica e normalização dos testes sorológicos após retirada do glúten da dieta (Walker-Smith et al, 1990).

Atualmente a biópsia intestinal permanece como o padrão-ouro no diagnóstico de DC. Os testes sorológicos são considerados úteis para identificar quais indivíduos deverão ser submetidos à biópsia e monitorar a resposta ao tratamento destes pacientes. Além de testes sorológicos específicos, frequentemente é recomendado em pacientes não sintomáticos e em parentes de celíacos, uma verificação de alelos HLA (DQ2 e DQ8) (Hill, 2005).

Em 1971 foram descritos anticorpos anti-reticulina, tanto da classe IgA quanto da classe IgG, que são detectados por imunofluorescência indireta tendo como substrato o fígado e rim de ratos. Mas por terem baixa sensibilidade para detectar a DC não têm sido usados atualmente (Ciclitira et al, 2001).

Os anticorpos antigliadina foram os primeiros marcadores sorológicos para DC a serem largamente utilizados na prática clínica no início dos anos 80. Duas classes são habitualmente medidas: IgA e IgG. Apesar de serem de fácil execução e terem baixo custo, possuem baixa especificidade (Trocone e Fergusson, 1991). Observou-se que algumas condições como esofagite, colite ulcerativa, fibrose cística, Síndrome de Down, gastrite, doença de Crohn, também causam níveis elevados de anticorpos antigliadina e podem levar a resultados falso-positivos para a DC (Hill et al, 2005).

### 1.7.2 Anticorpos antiendomísio (EMA)

Os anticorpos antiendomísio de classe IgA, foram primeiramente descritos em pacientes com DC, por Chorzelsky et al (1984). Esses anticorpos são dirigidos contra proteínas do tecido conjuntivo encontradas entre as miofibrilas do trato gastrointestinal de primatas. Utilizando o método de imunofluorescência indireta e o esôfago de macaco como principal substrato antigênico, observa-se a presença de EMA pelo aparecimento de um padrão verde brilhante em aspecto de favo de mel (Figura 4).

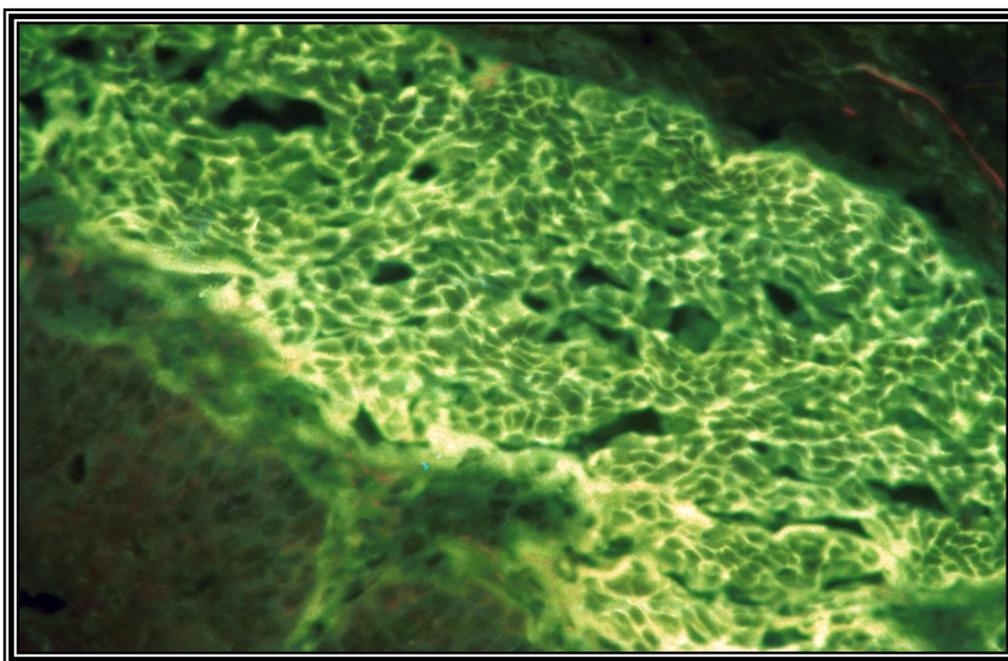


Figura 4: Antiendomísio positivo

Fonte: Laboratório de Pesquisa em Pediatria da Faculdade de Medicina da UnB

O teste sorológico EMA apresenta uma sensibilidade de aproximadamente 92,5% e uma especificidade entre 93,9% e 99,9% em pacientes com DC. Os níveis séricos desse marcador sorológico de DC apresentam declínio, quando o paciente inicia uma dieta isenta de glúten, e entre três a seis meses após o início da dieta, o EMA torna-se indetectável (Stern 2000; Hill et al, 2005).

Apesar do EMA ser um bom marcador para DC, apresenta algumas desvantagens, como a disponibilidade limitada de substratos antigênicos e a dependência de habilidade do observador das lâminas. Em algumas situações a utilização do EMA ficaria prejudicada para o diagnóstico da DC, é o caso de pacientes com deficiência de IgA e em crianças abaixo de dois anos de idade (Catassi et al 2002).

### **1.7.3 Anticorpos anti-transglutaminase (anti-tTG)**

A transglutaminase tecidual (tTG) é uma enzima distribuída largamente no organismo. Foi reconhecida primeiramente por Dietrich et al (1997) em pacientes com DC não tratada. Esses pesquisadores identificaram a tTG como principal auto-antígeno contra o endomísio desencadeando uma resposta humoral com a produção de anticorpos da classe IgA. O ensaio imuno enzimático (ELISA) é usado para a detecção do anti-tTG e identificação de anticorpos IgA, isso permite o rastreamento populacional para DC, principalmente por ser uma técnica simples, rápida e econômica (Fasano e Catassi, 2001).

A sensibilidade do teste variou de 77% a 100% e especificidade de 91% a 100%. E a comparação entre os testes que usaram o anti-tTG de cobaia e os que

usaram o anti-tTG recombinante humano, mostraram que o último é mais sensível e específico (Hill et al, 2005).

A avaliação do IgA anti-tTG mostra-se um bom método sorológico de exclusão de DC, pois apresenta valores preditivos negativos altos, chegando a aproximadamente 98,2% (Baudon et al, 2004)

Alguns estudos comparativos entre os testes sorológicos de anticorpos tTG e EMA, foram realizados e mostraram que os resultados destes testes são concordantes, 95,2% e 95% respectivamente (Hansson et al 2000; Bonamico et al, 2001).

Em estudos de rastreamento populacional para a detecção de DC, é recomendado a utilização de tTG, para a identificação dos casos. O menor custo e por ser um teste quantitativo não dependente de observador, como o EMA, além de uma técnica rápida e fácil, favorecem o uso de tTG nesses tipos de estudos (Gomez et al, 2002).

#### **1.7.4 Pesquisa de antígenos leucocitários humanos (HLA)**

É conhecido que 95% de indivíduos com DC possui os alelos HLA-DQ2 e 5 % restante o HLA-DQ8 (Sollid et al, 1989). Porém aproximadamente 30% da população geral também possuem o alelo DQ2, logo apesar de muito sensível, a tipagem do HLA poderia ser pouco específica para identificar indivíduos que precisassem de biópsia intestinal. A pesquisa dos perfis específicos do HLA poderia ser indicada para excluir casos duvidosos e indivíduos assintomáticos pertencentes a grupos de risco para DC, como parentes de primeiro grau de celíacos, portadores de diabetes

*melitus* tipo I, pacientes com síndromes de Down ou síndrome de Turner (Hill et al, 2005).

Pacientes que já estão em dieta sem glúten, mas não tiveram um diagnóstico prévio, também são indicados a fazer uma tipagem de HLA. Um resultado negativo para HLA-DQ2/DQ8 significa pouca probabilidade para DC, não havendo necessidade de submeter o paciente a testes sorológicos posteriores (Guandaline e Gupta, 2002).

A pesquisa destes HLAs predisponentes pode contribuir para antecipação do tratamento de possíveis casos da DC, o que promoveria a melhora clínica das alterações da mucosa e reduziria os riscos de outras patologias e complicações associadas ao desenvolvimento da DC (Wolters e Wijmenga, 2008).

### **1.7.5 Biópsia intestinal e histopatologia**

A avaliação histológica de uma amostra de biópsia do intestino delgado é considerada o “padrão-ouro” para o diagnóstico da DC, através de achados clássicos de atrofia vilositária e hiperplasia de criptas, que são características da doença. Tais achados, no entanto, podem ser encontrados também em outras doenças que agredem o intestino delgado, como a doença de Crohn, linfoma intestinal e parasitoses intestinais como a giardíase (Macdonald, 2002; Shamir, 2003).

Diversas alterações celulares características são descritas na DC, dentre elas incluem, número aumentado de linfócitos intraepiteliais (LIE) (mais de 30 linfócitos por 100 enterócitos), índice mitótico de LIE maior do que 0,2%, diminuição na altura

das células epiteliais, perda da polaridade nuclear com pseudoestratificação das células epiteliais, diminuição do número das células calciformes e anormalidades na borda em escova (Hill et al, 2005).

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

Marsh classifica as lesões em cinco estágios conformes descritos na tabela 2. Estudos indicam que o estágio Marsh do tipo 3, com atrofia vilositária, são características mais marcantes da DC. As alterações correspondentes ao Marsh do tipo 2 são sugestivas a doença, porém o diagnóstico deve ser fortalecido por testes sorológicos positivos. Marsh do tipo 1 é inespecífica na infância e mais uma vez, os testes sorológicos aumentam a probabilidade individual para a doença. A lesão Marsh do tipo 4 parece estar relacionada com a DC refratária ao tratamento e ao desenvolvimento de enteropatia associada ao linfoma de células T (Tabela 2) (Hill et al, 2005; Cellier et al, 2000).

Tabela 2. Classificação histológica de Marsh

| <b>Classe</b> | <b>Denominação</b>               | <b>Descrição</b>                                                             |
|---------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Marsh 0       | Pré-infiltrativa / mucosa normal | Vilosidade e criptas sem alterações, LIE em quantidade normal                |
| Marsh 1       | Lesão infiltrativa               | Aumento dos LIE. Arquitetura mucosa e superfície absortiva normal            |
| Marsh 2       | Lesão hiperplástica              | Aumento dos LIE e hiperplasia de criptas, com vilosidades preservadas        |
| Marsh 3       | Lesão destrutiva                 | Aumento dos LIE e hiperplasia de criptas e redução da altura das vilosidades |
| Marsh 4       | Lesão hipoplástica               | Atrofia vilositária total com hipoplasia de criptas                          |

Fonte: Adaptada de Marsh, 1992.

### **1.8 A doença celíaca como possível causa de deficiência de ácido fólico**

As conseqüências da DC não se restringem somente ao sistema gastroentérico, podendo afetar vários outros órgãos e sistemas. A síndrome de má absorção de nutrientes está presente em praticamente todos os pacientes com DC, e frequentemente está associada à deficiência de ácido fólico (Harper et al, 2007). Estudo feito com 258 pacientes com deficiência de ácido fólico, em um hospital do Reino Unido, mostrou que aproximadamente 5% destes pacientes também apresentavam DC (Howard et al, 2002).

O ácido fólico é requerido para o crescimento normal do indivíduo, na fase reprodutiva (gestação e lactação), e na formação de anticorpos. Atua como coenzima no metabolismo de aminoácidos (glicina) e síntese de purinas e pirimidinas, que estão envolvidas com a síntese de DNA e RNA. É vital para a divisão celular e síntese protéica, conseqüentemente sua deficiência pode ocasionar alterações na síntese de DNA e alterações cromossomiais (Tamura e Picciano, 2006).

A deficiência de ácido fólico durante a gestação pode predispor para defeitos congênitos no recém-nascido, principalmente defeitos cardíacos e defeitos de tubo neural (DTN). A síndrome de má absorção características da DC poderia consequentemente predispor para estas anormalidades na criança (Hozyask, 2001). Sem a suplementação adequada mulheres com DC podem não ter nenhum folato para manter níveis de proteínas suficientes para um desenvolvimento adequado do organismo (Mohamed et al, 2000; Hancock e Koren, 2004).

### **1.8.1 A deficiência de ácido fólico como possível causa de defeitos do tubo neural.**

Defeitos do tubo neural (DTN) são anormalidades congênitas do sistema nervoso que ocorrem na fase inicial do desenvolvimento fetal entre a terceira e a quinta semana da gestação, resultando em um fechamento incompleto do tubo neural do feto. Alguns estudos sugerem que os DTN são resultados de fatores genéticos e ambientais (Kibar et al, 2007; Detrait et al, 2005).

Dentre os DTN os mais prevalentes são a espinha bífida e a anencefalia, representando um sério problema para o setor de saúde e para a família dos conceptos, sendo a sua prevenção possível na maioria dos casos. Crianças com espinha bífida podem sobreviver, mas apresentam várias complicações ao longo da vida e desenvolvem deficiências físicas. Geralmente crianças com anencefalia já nascem morta ou morrem rapidamente após o nascimento (Blom et al, 2006).

O ácido fólico, como já citado, é elemento essencial para o normal desenvolvimento do feto, e sua deficiência durante a gestação pode eventualmente redundar no aparecimento de DTN. Evidências epidemiológicas, clínicas e teratológicas têm demonstrado que o ácido fólico está envolvido na prevenção e patogênese de DTN. Sabe-se que gestantes são propensas a desenvolverem deficiência de ácido fólico provavelmente devido ao aumento da demanda desse nutriente para o crescimento fetal e dos tecidos maternos (Stegers-Theunissen, 1995). É conhecido que uma suplementação em níveis adequados de ácido fólico no início da gravidez reduz consideravelmente o risco de DTN (De Walls et al, 2007; Moore et al, 2003)

Dickey et al, (1996) na Irlanda, investigaram a possibilidade de que a DC poderia ser um fator de risco materno para DTN. Eles investigaram, em grupo de 60 mulheres com filhos com DTN, a presença de anticorpos anti-endomísio (IgA-EMA) que é considerado teste de grande sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da DC. Nesse estudo os autores encontraram uma mãe de criança com DTN com teste positivo e DC confirmada por biópsia jejunal. Estes autores ressaltam a importância de se determinar, através de futuros estudos se a prevalência de DC é maior entre mães de crianças com DTN e a possível influência da DC na eclosão de destes graves defeitos.



## **2. Objetivos**

Verificar a prevalência da soropositividade para doença celíaca entre mães de crianças portadoras de defeitos de fechamento do tubo neural.



### 3. Pacientes e Métodos

O presente estudo foi previamente avaliado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital de Base de Brasília. Todas as pacientes ou responsáveis foram informadas de forma verbal e escrita, sobre os objetivos da pesquisa e autorizaram sua participação no estudo após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO I).

Trata-se de um estudo epidemiológico transversal descritivo, de prevalência de DC em mães com filhos que apresentassem DTN. Foi realizado no período de 2005 a 2007 foram identificadas 208 mães que tinha filhos com DTN, a partir de prontuários médicos das crianças atendidas no Serviço de Neurocirurgia do Hospital de Base de Brasília (Secretaria de Saúde do Distrito Federal), quando do atendimento de seus filhos para seguimento e aconselhamento no Ambulatório de Neurocirurgia Pediátrica. O Hospital de Base de Brasília é um hospital terciário que serve como referencial para uma rede de hospitais secundários e centros de saúde da Secretaria de Saúde do Distrito Federal, praticamente cobrindo todo o território do Distrito Federal e seu entorno, com uma população estimada em mais de dois milhões de pessoas.

Foi retirada uma única amostra de dois mililitros de sangue das participantes, através de uma punção de veia basílica do antebraço. O sangue foi centrifugado a 3000 rpm por aproximadamente 4 min. O soro obtido foi mantido em freezer à temperatura de -20°C até ser feita a análise no Laboratório de Pesquisa em Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB).

Para detecção dos casos utilizou-se o teste sorológico baseado na presença de anticorpos antiendomísio (IgA-EMA), teste diagnóstico de DC efetuado com

técnica de imunofluorescência indireta sobre secções criostáticas de esôfago de primata rhesus (*Macaca mullata*), fixadas em lâminas (INOVA Diagnostics, San Diego, CA, USA). Em todos os soros foram feitos uma diluição de 1:5 em tampão fosfato, e após essa diluição, os soros, foram incubados em substrato antigênico. Em seguida a reação foi detectada através da utilização de um anticorpo antimunoglobulina humana marcada com isoticianato de fluoresceína (FICT). As lâminas foram examinadas em microscópio de fluorescência, por dois observadores com ampla experiência em microscopia de fluorescência, utilizando filtro verde e objetiva 250-400x. A reação era considerada positiva caso apresentasse característico padrão verde-brilhante em favo de mel (Figura 4).



#### **4. Resultados**

Foram investigadas 208 mulheres com filhos com DTN confirmados, em dieta normal até o momento do teste. A idade variou de 19 à 43 anos (média de idade 33 anos). Todos os resultados do teste IgA-EMA foram negativos.



## 5. Discussão

Até o presente momento não existem dúvidas que o prévio uso do ácido fólico na gravidez é eficiente na prevenção de DTN. Estima-se que o uso de 0,4 a 0,8 mg de ácido fólico, reduz consideravelmente o risco para DTN (Czeizel, 2004; Steverson et al, 2000). Contudo o risco de recorrência de DTN não está completamente eliminado e possivelmente estes casos que não respondem ao ácido fólico provavelmente representam alta dependência genética de DTN. Receptores de folato são essenciais durante a embriogênese, visto que a sua função incorreta geralmente conduz a morte do feto (O'leray et al, 2006). O mecanismo pelo qual o ácido fólico reduz o risco de DTN ainda não está totalmente esclarecido. Alguns estudos sugerem que o ácido fólico possivelmente corrigiria uma deficiência nutricional já instalada no indivíduo, enquanto outros estudos indicam que a função do folato compensaria deficiências que alguns indivíduos têm de processar esse nutriente (Santos e Pereira, 2007; Frey e Hauser, 2003). Estudo recente mostrou que algumas mulheres com filhos com DTN, produzem anticorpos contra os receptores de folato na membrana placentária, como resultado do bloqueio do sítio de ligação do ácido fólico. Devido a alta afinidade para estes receptores de folato a administração do uso de folato, quando em altas doses, permitiria contornar o bloqueio deslocando os auto-anticorpos (Rothemberg et al, 2004).

A deficiência de ácido fólico freqüentemente é conseqüência de comum má absorção de nutrientes associada com a DC (Howard et al, 2002; Tikkakoshi et al, 2007). Conseqüentemente administração de uso de folato por mulheres celíacas grávidas parece ser justificável, embora ainda existam controvérsias em relação a este tópico. Vários estudos apontam alto risco de problemas reprodutivos em

mulheres celíacas antes de começarem a dieta isenta de glúten (Sher e Mayberry, 1994; Norgard et al, 1999; Martinelli et al, 1999). Por outro lado, estudos recentes têm desafiado estas afirmações (Greco et al, 2004; Tata et al, 2005). Similarmente ainda não está claro se filhos de mulheres com DC não tratada apresentam alto risco de malformações congênitas, incluindo DTN. Estudo feito por Tata et al (2005) comparou dados informatizados de 1521 mulheres com DC e 7732 controles, focando a frequência de reações adversas relacionadas a gravidez, mostrou que embora abortos foram levemente mais comuns em mulheres com DC nenhuma outra reação adversa foi encontrada, nem DTN ou outra malformação do sistema nervoso, foram registradas entre proles de mulheres com DC.

Dickey et al (1996) sugeriu a possível associação entre DTN nos recém-nascidos e DC na mãe, com base no achado de uma mãe celíaca entre sessenta mães que tinham filhos com DTN. Apesar de sugestivo este resultado careceu de significância estatística devido ao pequeno número de pacientes testados. Appropriadamente, estes autores sugeriram que estudos mais extensivos seriam necessários sendo, no entanto recomendável o uso de testes sorológicos para rastreamento de possível DC em mulheres grávidas, devido a má absorção de ácido fólico por estas pacientes.

DTN estão entre os mais comuns defeitos de nascimento. Nos EUA, entre americanos caucasianos esta incidência de nascimento é de aproximadamente 1/1000, sendo superado apenas por defeitos congênitos do coração (Detrait et al, 2005). DTN exibem uma acentuada variação geográfica e atualmente a mais alta incidência é no norte da China (3,7 por 1000 nascidos vivos) (Moore et al, 1997). Existem poucos estudos que abordam especificamente a incidência de DTN na América Latina, um estudo feito no Chile, que analisou dados de um projeto

multicêntrico cobrindo 283.403 crianças revelou uma incidência de 0,9/1000 por nascidos vivos (Nazer et al, 2001). No Brasil em estudo feito em uma maternidade de um Hospital Geral de Minas Gerais em 18.807 partos, foi encontrada uma prevalência de 4,73: 1000 de DTN, sendo que espinha bífida (47,2%) e anencefalia (26,9%) foram os DTN mais freqüentes (Aguiar et al, 2003).

A Irlanda é conhecida por ter alta prevalência, quando comparada com outros países europeus, tanto de DC (Johnston et al, 1997) como de DTN (McDonnell et al, 1999) e isto pode possivelmente explicar os achados de Dickey et al (1996). Usando o teste IgA-EMA que é considerado um método de rastreamento com alta sensibilidade e especificidade (Hill et al, 2005) em 208 mães sem evidência de deficiência de IgA, nós não encontramos nenhum resultado com sorologia positiva. Na América Latina, como em outros países não pertencentes a Europa, a DC foi considerada uma doença rara. Durante as últimas décadas tem se tornado progressivamente evidente que isto não é uma afirmação verdadeira. Vários estudos mostram que a prevalência de DC na América Latina (Gomez et al, 2001), particularmente no Brasil (Gandolfi et al, 2000), é similar a prevalência encontrada em vários países da Europa. Em um prévio rastreamento de DC em um grupo de 2629 mulheres sem sintomas gastrointestinais, originárias da mesma área geográfica, de similar nível sócio-econômico, e utilizando o mesmo método de rastreamento, foi encontrada uma prevalência de 1:292 (Pratesi et al, 2003). Isto é um achado expressivo quando comparado com os resultados do presente estudo em que nenhuma das mães com filhos afetados por DTN, apresentou teste IgA-EMA positivo.



## **6. Conclusões**

No presente estudo não foi encontrado sorologia positiva para DC em nenhuma das 208 mães pesquisadas, portanto, não confirmamos o achado de Dickey et al (1996). Conseqüentemente afirmamos que até o momento uma rotina de rastreamento sorológico para DC em mulheres grávidas para excluir uma possível gravidez agravada pelos DTN na prole não deve ser justificada. Estudos adicionais são necessários para maiores esclarecimentos sobre este assunto.



## 7. Referências Bibliográficas

Abenavoli L, Proietti I, Leggio L, Ferrulli A, Vonghia L, Capizzi R et al. Cutaneous manifestations in celiac disease. *World J Gastroenterol* 2006;12:843-52.

Aguiar MJB, Campos AS, Aguiar ALP, Lana AM, Magalhães RL, Babeto RL. Defeitos do fechamento do tubo neural e fatores associados em recém-nascidos vivos e natimortos. *J Pediatr (Rio J)* 2003;79:129-34:

Alaedini A, Green PH. Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Intern Med* 2005; 142:289-98.

Antunes H, Abreu I, Nogueiras A, Sá C, Gonçalves C, Cleto P, et al. Primeira determinação de prevalência de doença celíaca numa população portuguesa. *Acta Med Port* 2006; 19: 115-120.

Ascher H. Coeliac disease and type 1 diabetes: an affair still with much hidden behind the well. *Acta Paediatr* 2001;90:1217-25.

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

Baptista ML, Doença celíaca: uma visão contemporânea. *Pediatria (São Paulo)* 2006;28:262-71.

Bardella MT, Fredella C, Prampolini L, Molteni N, Giunta AM, Bianchi PA. Body composition and dietary intakes in adult celiac disease patients consuming a strict gluten-free diet. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:937-9.

Barera G, Mora S, Brambilla P, Ricotti A, Menni L, Beccio S, et al. Body composition in children with celiac disease and the effects of a gluten-free diet: a prospective case-control study. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:71-5.

Baudon JJ, Johanel C, Absalon YB, Morgant G, Cabrol S, Mougnot JF. Diagnosing celiac disease: a comparison of human tissue transglutaminase antibodies with antigliadin and antiendomysium antibodies. *Arch Pediatr Adolesc Med*.2004;158:584-8.

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* 1999; 36:687-90.

Bittolo M, Not T, Perticarari S, Cauci S, Graziosi G, Marzari R. A dot immunobinding assay to detect anti-alfa-gliadin antibodies in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1990; 11:337-40.

Blake DR, Nathan DM. Point-of-care testing for diabetes. *Crit Care Nurs Q*. 2004; 27:150-61.

Blom HJ, Shaw GM, den Heijer M, Finnell RH. Neural tube defects and folate: case far from closed. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7:724-31.

Bonamico M, Mariani P, Danesi HM, Crisogianni M, Failla P, Gemme G et al. Prevalence and clinical picture of celiac disease in Italian Down syndrome patients: a multicenter study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33:139–43.

Bonamico M, Pasquino AM, Mariani P, Danesi HM, Culasso F, Mazzanti L et al. Prevalence and Clinical Picture of Celiac Disease in Turner Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:5495–98.

Carlsson AK, Axelsson IE, Borulf SK, Bredberg AC, Ivarsson AS. Serological screening for celiac disease in healthy 2.5-year old children in Sweden. *Pediatrics* 2001; 107; 42-5.

Carnicer J, Farré C, Varea V, Vilar P, Moreno J, Artigas J. Prevalence of coeliac disease in Down's syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:263-67.

Cataldo F, Marino V, Ventura A, Bottaro G, Corazza GR. Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Italian Society of Paediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and "Club del Tenue" Working Groups on Coeliac Disease. *Gut*. 1998;42:362-5.

Catassi C, Doloretta Macis M, Ratsch IM, De Virgiliis S, Cucca F. The distribution of DQ genes in the Saharawi populations provides only a partial explanation for the high coeliac disease prevalence. *Tissue Antigens* 2001;58:402-5.

Catassi C, Fabiani E, Corrao G, Barbato M, De Renzo A, Carella AM et al. Risk of non-Hodgkin lymphoma in coeliac disease. *JAMA* 2002; 287:1413-19.

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

Catassi C, Fornaroli F, Fasano A. Coeliac disease: From basic immunology to bedside practice. *Clin Applied Immunol Rev*. 2002;3: 61-71.

Catassi C, Kryszak D, Louis-Jacques O, Duerksen DR, Hill I, Crowe S, et al. Detection of Coeliac Disease in Primary Care: A Multicenter Case-Finding Study in North America. *Am J Gastroenterol* 2007; 102:1454-60.

Catassi C, Ratsch IM, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, El Asmar, et al. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet* 1999;354:647-48.

Cellier C, Delabasse E, Helmer C, Patey N, Imatuchausky C, Jabri B et al. Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. French Coeliac Disease Study Group. *Lancet* 2000; 356: 203-8.

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

Chin RL, Sander HW, Brannagan TH, Green PH, Hays AP, Alaedini A et al. Celiac neuropathy. *Neurology* 2003;60:1581-5.

Chorzelski TP, Beutner EH, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonda S, Kurmar V, Kapuscinska A. IgA anti-endomysium antibody. A new immunological marker of dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Br J Dermatol* 1984; 111:395-402.

Cicarelli G, Della Rocca G, Amboni M, et al. Clinical and neurological abnormalities in adult celiac disease. *Neurol Sci* 2003; 24:311–17.

Ciclitira PJ, Ellis HJ. Investigation of cereal toxicity in coeliac diseases. *Postgrad Med J* 1987;63:767-75.

Ciclitira PJ, Johnson MW, Dewar DH, Ellis HJ. The pathogenesis of coeliac disease. *Molecular Aspects of Medicine* 2005;26: 421–58.

Collin P, Kaukinen K, Valimaki M, Salmi J. Endocrinological disorders and celiac disease. *Endocr Rev.* 2002;23:464-83.

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

Czeizel AE. The primary prevention of birth defects: Multivitamins or folic acid? *Int. J. Med. Sci.* 2004; 1: 50-61.

D'Amico MA, Holmes J, Stavropoulos SN, et al. Presentation of pediatric celiac disease in the United States: prominent effect of breastfeeding. *Clin Pediatr (Phila)* 2005;44:249-58.

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

De Walls P, Tairou F, Van Allen MI, Uh SH, Lowry RB, Sibbald B, et al. Reduction in neural-tube defects after folic acid fortification in Canada. *N Engl J Med.* 2007;357:135-42.

Detrait ER, George TM, Etcheves HC, Gilbert JR, Vekemans M, Speer MC. Human neural tube defects: Developmental biology, epidemiology and genetics. *Neurotoxicol Teratol* 2005;27:515-24.

Dewar DH, Amato M, Ellis HJ, Pollock EL, Gonzalez-Cinca N, Wieser H, et al. The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006;18:483-91.

Dewar DH, Ciclitira PJ. Clinical Features and Diagnosis of Celiac Disease. *Gastroenterology* 2005;128:S19-S24.

Dickey W, Stewart F, Nelson J et al. Screening for celiac disease as a possible maternal risk factor for neural tube defect. *Clin Genet* 1996;49:106-8

Dickey W, Kearney N. Overweight in celiac disease: prevalence, clinical characteristics, and effects of a gluten-free diet. *Am J Gastroenterol* 2006;101:2356-9.

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

Esposito C, Paparo F, Caputto I, Porta R, Salvati VM, Mazzarella G, et al. Expression and enzymatic activity of small intestinal tissue transglutaminase in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1813-20.

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

Farrell RJ, Kelly CP. Current concepts: celiac sprue. *N Engl J Med* 2002;346:180-188.

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

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

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

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

Fasano A. Celiac Disease: The Past. The Presente, the Future. *Pediatrics* 2001;107:768-70.

Frey L, Hauser WA. Epidemiology of neural tube defects. *Epilepsia* 2003; 44:4-13.

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

Gasbarrini A, Torres ES, Trivellini C, De Carolis S, Caruso A, Gasbarrini G. Recurrent spontaneous abortion and intrauterine fetal growth retardation as symptoms of coeliac disease. *Lancet* 2000;356:399-400.

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

Gomez JC, Sevaggio GS, Viola M, Pizarro B, La Motta G, Barrio et al. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol* 2001;96:2700-4.

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

Greco L, Veneziano A, Di Donato L, Zampella C, Pecoraro M, Paladini D et al. Undiagnosed coeliac disease does not appear to be associated with unfavorable outcome of pregnancy. *Gut* 2004; 53:149-51.

Green PH, Cellier C. Celiac disease. *N Engl J Med* 2007;357: 1731-43.

Green PH, Fleischauer AT, Bhagat G, Goyal R, Jabri B, Neugut AI. Risk of alignment in patients with celiac disease. *Am J Med.* 2003;115:191–195.

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

Green PH. The many faces of celiac disease: clinical presentation of celiac disease in adult population. *Gastroenterology* 2005;128:Suppl 1:S74-S78.

Green PHR, Stavropoulos SN, Panagi SG, et al. Characteristics of adult celiac disease in the USA: results of a nation survey. *Am J Gastroenterol* 2001;96:126-31.

Grisolano SW, Oxentenko AS, Murray JA, et al. The use fullness of routine small bowe biopsies in evaluation of iron deficiency anemia. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:756-60.

Guandalini S, Gokhale R. Update on immunologic basis of celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2002;18:95-100.

Guandalini S, Gupta P. Celiac disease. A diagnostic challenge with many facets. *Clin Applied Immunol Rev* 2002; 3: 293-305.

Hancock, Koren G. Celiac disease during pregnancy. *Can Fam Physician* 2004;50:1361-3.

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

Hardwick C. Prognosis in celiac disease. A review of seventythree cases. *Arch Dis Child* 1939;14:279–93.

Hariz MB, Kallel-Sellami M, Kallel L, Lahmer A, Halioui S, Bouraoui S, et al. Prevalence of celiac disease in Tunisia: mass-screening study in schoolchildren. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007;19:687-94.

Harper JW, Holleran SF, Ramakrishnan R, Bhagat G, Green PH. Anemia in celiac disease is multifactorial in etiology. *Am J Hematol*. 2007;82:996-1000.

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

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

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

Holmes GK, Prior P, Lane MR, et al. Malignancy in coeliac disease-effect of a gluten free diet. *Gut*. 1989;30:333-338.

Howard MR, Turnbull AJ, Morley P, Hollier P, Webb R, Clarke A. A prospective study of the prevalence of undiagnosed celiac disease in laboratory defined iron and folate deficiency. *J Clin Pathol* 2002; 55:754-57.

Hozyasz KK. Coeliac disease and birth defects in offspring. *Gut* 2001;49:738.

Johnston SD, Watson RPG, McMillan SA, Sloan J, Love AHG. Prevalence of celiac disease in Northern Ireland. *Lancet* 1997: 350;1370

Kagnoff MF. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *The Journal of Clinical Investigation*.2007; 17: 41-49.

Kagnoff MF. Overview and Pathogenesis of Celiac Disease. *Gastroenterology* 2005;128:S10-S18.

Kalayci A, Kansu A, Girgin N, Kucuk O, Aras G. Bone mineral density and importance of a gluten-free diet in patients with celiac disease in childhood. *Pediatrics* 2001;108:E89.

Karrel K, Louka AS, Moodie SJ 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. *Human Immunology* 2003; 64: 469–77.

Kibar Z, Capra V, Gros P. Toward understanding the genetic basis of neural tube defects. *Clin Genet* 2007; 71: 295–310.

Korponay-Szabo I.R, Raivio T, Laurila K, et al. Coeliac disease case finding and diet monitoring by point-of-care testing. *Aliment Pharmacol Ther* 2005; 22: 729–737.

Kost GJ. Knowledge optimization theory and application to point-of-care testing. *Stud Health Technol Inform.* 1999;62:189-90

Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat Immunol.* 2002;3:940-3.

Lo W, Sano K, Lebwohl B, Diamond B, Green PH. Changing presentation of adult celiac disease. *Dig Dis Sci* 2003;48:395-8.

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

Luostarinen L, Himanen SL, Luostarinen M, Collin P, Pirttilä T. Neuromuscular and sensory disturbances in patients with well treated coeliac disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2003;74:490-4.

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

MacManus R, Moloney M, Borton M, Finch A, Chuan YT, Lawlor E, Weir DG, Kelleher D. Association of celiac disease with microsatellite polymorphisms close to the tumor necrosis factor genes. *Hum Immunol* 1996;45:24-31.

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

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;348:2517-24.

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

Martinelli P, Troncone R, Paparo F, Torre P, Trapanese E, Fasano C et al. Coeliac disease and unfavorable outcome of pregnancy. *Gut* 2000; 46: 332-35.

McDonnell RJ, Johnson Z, Delaney V, Dack P. East Ireland 1980-1994: epidemiology of neural tube defects. *J Epidemiol Community Health* 1999; 53:782-88.

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

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

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

Mody RJ, Brown PI, Wechsler DS. Refractory iron deficiency anemia as the primary manifestation of celiac disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25:169-72.

Mohammad Masud Iqbal MD, MPH, MSPH. Prevention of Neural Tube Defects by Periconceptional Use of Folic Acid. *Pediatrics in Review* 2000 21:02.

Molberg O, McAdam SN, Korner 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* 1998;4:713-7.

Moore CA, Li S, LiZ, Hong SX, Gu HQ, Berry RJ et al. Elevated rates of severe neural tube defects in a high-prevalence area in northern China. *Am J Med Genet* 1997: 73;113-18.

Moore LL, Bradlee ML, Singer MR, Rothman KJ, Milunsky A. Folate intake and the risk of neural tube defects: na estimation of dose – response. *Epidemiology* 2003; 14:200-5.

Mulder CJJ, Cellier C. Coeliac disease: changing views. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2005 ;19: 313–21.

Muller AF. Donnelly MT, Smith CM, Grundman MJ, Holmes GK, Toghil PJ. Neurological complications of celiac disease: a rare but continuing problem. *Am J Gastroenterol.* 1996;91:1430-5.

Nazer JH, Margozzini JR, Rodriguez MC, Rojas MN, Cifuentes LO. Malfoemaciones invalidantes em Chile. *Estúdio ECLAMC, 1982-1997. Ver Med Chile* 2001: 129;67-74.

Norgard B, Fonager K, Sorensen HT, Olsen J. Birth outcomes of women with celiac disease: A nation wide historical cohort study. *Am J Gastroenterol* 1999: 94:2435-2440.

O'leary VB, Pangilinan F, Cox C, Parle-McDermott A, Conley M, Molloy AM, et al. Reduced folate carrier polymorphisms and neural tube defects risk. *Mol Genet Metab* 2006;87: 364-69.

Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA, Cortez AJ, 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*. 2007;19:43-9.

Paveley WF. From Arateus to Crosby: a history of coeliac disease. *BMJ* 1988; 29: 724-31.

Pena AS, Garrote JA, Crusis JB. Advances in the immunogenetics of coeliac disease. Clues for understanding the pathogenesis and disease heterogeneity. *Scand J Gastroenterol* 1998;suppl 225:56-8.

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

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

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

Przemioslo RT, Lundin KE, Sollid LM, Nelufer J, Ciclitira PJ. Histological changes in small bowel mucosa induced by gliadin sensitive T lymphocytes can be blocked by anti-interferon  $\gamma$  antibody. *Gut* 1995; 36: 874-79.

Raivio T, Kaukinen K, Nemes E, Laurila K, Collin P, Kovacs IB, et al. Self transglutaminase-based rapid coeliac disease antibody detection by a lateral flow method. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;24:147–54.

Raivio T, Korponay-Szab I, Collin P, Laurila K, et al. Performance of a new rapid whole blood coeliac test in adult patients with low prevalence of endomysial antibodies. *Digestive and Liver Disease* 2007; 39: 1057–1063.

Roizen NJ, Patterson D. Down's syndrome. *Lancet* 2003; 361: 1281–89.

Rostami K, Steegers EA, Wong WY, Braat DD, Steegers-Theunissen RP. Coeliac disease and reproductive disorders: a neglected association. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2001;96:146-9.

Rothenberg SP, da Costa MP, Sequeira JM, Cracco J, Roberts JL, Weedon J, Quadros ED. Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube-defect. *N Engl J med* 2004; 350:134-42.

Santos LM, Pereira MZ. Efeitos da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. *Cad Saúde Publica* 2007;23:17-24.

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

Shamir R. Advances in celiac disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2003; 32:931-47.

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

Sheiner E, Peleg R, Levy A. Pregnancy outcome of patients with known celiac disease. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2006;129: 41–45.

Sher KS, Mayberry JF. Female fertility, obstetric and gynaecological history in coeliac disease. *Digestion* 1994;55:243-246.

Sollid LM, Markussen G, Ek J et al. Evidence for a primary association of coeliac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med* 1989;169:345-50.

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

Sood A, Midha V, Sood N, Avasthi G, Sehgal A. Prevalence of coeliac disease among school children in Punjab, North India. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006;21:1622-5.

Stazi AV, Mantovani A. A risk factor for female fertility and pregnancy: coeliac disease. *Gynecol Endocrinol*. 2000;14:454-63.

Steeegers-Theunissen RP. Folate metabolism and neural tube defects: a review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1995; 61: 39-48.

Stepniak D, Koning F. Coeliac Disease-Sandwiched between Innate and Adaptive Immunity. *Human Immunology* 2006; 67: 460–68.

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

Steverson RE, Allen WP, Shashidhar Pai G, Best R, Seaver LH, Dean J, Thompson S. Decline in prevalence of neural tube defects in a high-risk of the United States. *Pediatrics* 2000; 106:677-83.

Stokes PL, Asquith P, Holmes GK, Mackintosh P, Cooke WT. Histocompatibility antigens associated with adult coeliac disease. *Lancet*. 1972; 22;2:162-4.

Tamura T, Picciano MF. Folate and human reproduction. *Am J Clin Nutr* 2006;83:993–1016.

Tata LJ, Card TR, Logan RFA, Hubbard RB, Smith CJP, West J. Fertility and pregnancy-related events in women with celiac disease: A population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 128: 849-55.

Tau C, Mautalen C, De Rosa S, Roca A, Valenza X. Bone Mineral density in children with celiac disease. Effect of a gluten-free diet. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:358-63.

Tikkakoshi S, Savilahti E, Kolho KL, Undiagnosed coeliac disease and nutritional deficiencies in adults screened in primary health care. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42:60-5.

Torres MI, López Casado MA, Ríos A. New aspects in celiac disease. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1156-61.

Toscano V, Conti FG, Anastasi E, Mariani P, Tiberti C, Poggi et al. Importance of gluten in the induction of endocrine autoantibodies and organ dysfunction in adolescent celiac patients. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1742-8.

Trocone R, Ferguson A. Anti-gliadin antibodies. *J Pediatric Gastroenterol Nutr* 1991; 12:150-8.

Vader LW, Stepniak DT, Bunnik EM, Kooy YM, de Haan W, Drijfhout JW, et al. Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology*. 2003;125:1105-13.

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

van de Wal Y, Kooy YM, van Veelen P, Vader W, August SA, Drijfhout JW, et al. Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *Eur J Immunol*. 1999;29:3133-9.

van Heel DA, Hunt K, Greco L, Wijmenga C. Genetics in coeliac disease. *Best Practic & Research Clinical Gastroenterology* 2005;19:323-39.

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

Wolters VM, Wijmenga C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am J Gastroenterol* 2008;103:190–195.

Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*. 1995;80:695-705.

Yachha SK, Poddar U. Celiac disease in India. *Indian J Gastroenterol*. 2007;26:230-7.



## Anexo 1

**HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA - UnB**  
**Departamento de Pediatria - Serviço de Gastroenterologia Pediátrica**  
**Projeto:**

**Pesquisador: Rodrigo Coutinho de Almeida (61) 8154-4885-1684**  
**Médico Responsável: Prof. Riccardo Pratesi (61) 3307-2134**

### **Termo de consentimento livre e esclarecido:**

#### **Dados de identificação do sujeito da pesquisa:**

Nome do paciente: .....

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

Endereço:.....N<sup>o</sup>.....Apto:.....

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

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

Nome do responsável:.....

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

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

Foi garantido para mim pelos pesquisadores, que os testes realizados são confiáveis e desempenhados por profissionais com ampla experiência. Eu não pagarei nada pelo exame e o resultado será informado para mim. O resultado do

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

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

Brasília,.....de .....200.....

Assinatura do paciente:.....

Assinatura do médico responsável:.....

## **Anexo 2**

**Artigo**

Editorial Manager(tm) for European Journal of Gastroenterology & Hepatology  
Manuscript Draft  
Manuscript Number: EJGH2427

Title: Maternal celiac disease: improbable risk factor for neural tube defect

Article Type: Original Study

Section/Category:

Keywords: Keywords: celiac disease, folic acid, neural tube defects, prevalence.

Corresponding Author: Dr Riccardo Pratesi, MD, PhD

Corresponding Author's Institution: University of Brasilia School of Medicine

First Author: Rodrigo C Almeida, MS

Order of Authors: Rodrigo C Almeida, MS; Benicio O Lima, M.D.; MS; Luiz C Castro, M.D.; Lenora Gandolfi, M.D.; PhD; Riccardo Pratesi, MD, PhD

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Abstract

In order to verify the existence of possible relation between maternal celiac disease (CD) and the appearance of neural tube defects (NTD) in the newborn serological testing in 208 mothers with NTD affected-pregnancy were performed. All sera were tested for total serum immunoglobulin A levels and for IgA class endomysial antibody using indirect immunofluorescence technique. Subject age ranged from 19 to 43 years (mean: 33 years). None had been previously investigated for or had family history of CD. Immunoglobulin levels were normal and results of the IgA-EMA test were negatives in all women tested. The present study, although no conclusive, did not corroborate previous findings described in the literature of increased frequency of CD in mothers with history of NTD affected-pregnancy. We feel that, at this moment routine screening for CD in pregnant women in order to avoid a possible pregnancy aggravated by NTD would not be justifiable.

Suggested Reviewers: Troncone Riccardo M.D.; PhD

Pediatrics, University Federico II, Naples, Italy

troncone@unina.it

He is one of the most active researcher in celiac disease

Carlo Catassi M.D.; PhD

Pediatrics, Università degli Studi di Ancona

catassi@tin.it

He is an active researcher in celiac disease, mainly in the epidemiologic aspects of the disease

Lorete M.S. Kotze M.D. PhD

Gastroenterology, Pontificia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil

loretkotze@hotmail.com

She is one of the most active researcher on celiac disease in Brazil

Opposed Reviewers:



**Maternal celiac disease: improbable risk factor for neural tube defect**

**Running title: Celiac disease and neural tube defect**

Rodrigo Coutinho de Almeida<sup>1</sup>, Benicio Oton Lima<sup>2</sup>, Luiz Claudio Castro<sup>3</sup>, Lenora Gandolfi<sup>4</sup>, Riccardo Pratesi<sup>4</sup>.

1. Graduate Program in Health Sciences, University of Brasília School of Health Sciences, Brasília, DF, Brazil
2. Neuropediatric Surgical Unit, Brasília General Hospital, Brasília, DF, Brazil
3. Pediatric Department, Brasília University Hospital, University of Brasília School of Medicine, Brasília, DF, Brazil
4. Celiac Disease Investigation Center, University of Brasília School of Medicine, Brasília, DF, Brazil.

Correspondence:

Riccardo Pratesi, MD

SQN 212, Bloco F, Apt. 605

CEP: 70864-060

Brasília, DF, Brazil.

E-mail: [pratesir@unb.br](mailto:pratesir@unb.br); [riccardop@terra.com.br](mailto:riccardop@terra.com.br)

### **Abstract**

In order to verify the existence of possible relation between maternal celiac disease (CD) and the appearance of neural tube defects (NTD) in the newborn serological testing in 208 mothers with NTD affected-pregnancy were performed. All sera were tested for total serum immunoglobulin A levels and for IgA class endomysial antibody using indirect immunofluorescence technique. Subject age ranged from 19 to 43 years (mean: 33 years). None had been previously investigated for or had family history of CD. Immunoglobulin levels were normal and results of the IgA-EMA test were negatives in all women tested. The present study, although no conclusive, did not corroborate previous findings described in the literature of increased frequency of CD in mothers with history of NTD affected-pregnancy. We feel that, at this moment routine screening for CD in pregnant women in order to avoid a possible pregnancy aggravated by NTD would not be justifiable.

Keywords: celiac disease, folic acid, neural tube defects, prevalence. .

## **Introduction**

Neural tube defects (NTD) are major congenital abnormalities of the nervous system that result from the incomplete closure of the developmental neural tube early in pregnancy. Epidemiological studies have suggested that NTD result from combined effects of genetic and environmental factors [1,2]. Maternal periconceptional supplementation with folic acid is currently the most well documented NTD prevention method. The percentage of NTD that can be prevented by periconceptional folic acid supplementation has not been established yet, but it is probably around 50-60% [3,4].

Celiac disease (CD) caused by a permanent intolerance toward dietary gluten is presently considered the most common food induced enteropathy in humans. In genetically predisposed individuals the ingestion of gluten results in villous atrophy with various degree of malabsorption. Iron, folic acid and or vitamin B12 deficiency is a common complication of CD and consequently, folic acid deficit could be considered a possible cause of NTD in the offspring of celiac women.

Using serological screening and biopsy confirmation when appropriate, Dickey et al [5] suggested a possible relationship between maternal CD and NTD-affected offspring. In their study, the screening of a group of 60 women with history of NTD affected-pregnancy disclosed one immunoglobulin A endomysial antibody (IgA-EMA) positive and biopsy confirmed CD patient. Since Dickey's et al [5] original work, no other study confirmed this association. In order to verify the existence of possible relation between maternal CD and the appearance of NTD in the newborn, serological testing in a larger number of mothers with NTD affected-pregnancy were performed.

## **Patients and methods:**

The present study was performed according to the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Research Committee from the School of Health Sciences. Mothers of children with NTD attended at the Neuropediatric Surgical Unit of the Brasilia General Hospital (DF, Brazil), for an initial evaluation or follow up consultations were invited to participate in the study. Two hundred and eight mothers with history of a single NTD-affected pregnancy, on normal diet at the time of the testing, participated in this study. Ages ranged from 19 to 43 years (mean age: 33 years). None of them had been previously investigated for or had a family history of CD. All women were informed about the objectives of the study and the eventual necessity of small intestinal biopsy and written informed consent was obtained from all.

Folic acid supplementation had been prescribed to all women and could be freely obtained from State Health Centers, although its regular use could not be ascertained in the

majority of cases. Each blood sample obtained was centrifuged and the resulting serum was stored at  $-20^{\circ}$  until testing. Total immunoglobulin A (IgA) level was determined in all sera by turbidimetric immunoquantification (COBAS MIRA; Roche Diagnostic Systems, Basel Switzerland). IgA-EMA test was performed using indirect immunofluorescence technique [6] on cryostat sections of monkey esophagus (INOVA Diagnostic Inc, San Diego, CA, USA). Fluorescein-labeled goat antibody to human IgA was used as a second antibody. All sera were screened at a dilution of 1/5. The presence of characteristic brilliant green network pattern, under fluorescent light microscope, was considered positive.

## Results

Total IgA levels were normal in all sera tested and results of the IgA-EMA tests were all negative.

## Discussion

As previously reported, there are currently few doubts whether the periconceptional use of folic acid is efficient in preventing NTD in a significant percentage of offspring as shown by several clinical trials and prevalence studies [7-10]. However, the risk of recurrence is not completely eliminated and these cases that are not responsive to folic acid probably represent highly genetic dependent cases of NTD. The mechanism through which folic acid acts to reduce the risk of NTD is still unclear. Folate deficiency leads to the up-regulation of folate receptors that mediate the folate uptake at physiological level [11,12]. Rothemberg et al [12] have recently shown that some mothers with an NTD-complicated pregnancy produce autoantibodies against folate receptors on the placental membrane which result on the blockage of folic acid binding site. Due to the high folate affinity for its receptor, the periconceptional administration of folate, when administered in high doses, would bypass the blockage, displacing the autoantibodies.

Folic acid deficiency is a frequent consequence of malabsorption commonly associated with CD [13,14] and consequently the periconceptional administration of folic acid in celiac pregnant women seems to be more than justifiable although controversies still exists regarding this topic. Several studies have pointed to a higher risk of reproductive problems in celiac women before being started on GFD [15-20]. On the other hand, recent studies have challenged these assertions [21, 22]. Similarly, it is still unclear whether offspring from women with untreated CD are at higher risk of congenital malformations, including NTD. The study conducted by Tata et al [22] that compared computerized primary care data from 1521 women with CD and 7732 age-matched controls, focusing the frequency of adverse pregnancy-related events showed that although miscarriages were slightly more common among women with CD, no other adverse effects were

found, and NTD or other nervous system malformations were not registered among offspring from CD women.

Aside Dickey et al study [5] few communications mentioned the topic of a possible association between NTD in children born from celiac mothers and in general the results of these few reports lack of statistical significance due to the small number of patients screened [23-25].

NTD are among the most common birth defects. In USA, among American Caucasians, its birth incidence is approximately 1/1000 being second only after congenital heart defects [2]. NTD exhibit a marked geographical variation and currently the highest reported incidence is in Northern China (3.7 per 1000 live births) [26]. There are few data that specifically address the incidence of NTD in Latin America. A study performed in Chile that analyzed data from a multicenter project covering 283.403 children revealed an incidence of 0.9/1000 per live births [27]. No study concerning the frequency of NTD in Brazil was found in literature. Ireland is known to have a high prevalence, when compared to other European countries, both of CD [28] and NTD [29] and this could possibly explain the findings of Dickey et al [5]. In Latin America, as in the rest of non-European world CD was considered a rare disease. During the last decade has become progressively evident that this was not a true assertion. Several study showed that CD prevalence in Latin America and particularly in Brazil is similar to the prevalence found in several European countries [30, 31]. In our study, using the Iga-EMA test that is considered a screening method with high sensitivity and specificity in 208 women without laboratory evidence of IgA deficiency, no serologically positive result was verified. In a previous CD screening in a group of 2629 women without gastroenterological symptoms originated from the same geographical area and socio-economic level, using the same screening method, a prevalence of 1:292 was found [31]. This is a suggestive finding when compared with the result of the present study in which none of the 208 mothers of NTD-affected children was IgA-EMA positive.

In short, although not conclusive, the present study did not corroborate the finding of Dickey et al [5]. Consequently, we feel that at this moment, routine screening for CD in all pregnant women in order to avoid a possible pregnancy aggravated by NTD in the offspring would not be justifiable. Further studies should be conducted to better elucidate this issue.

## References

1. Botto LD, Moore CA, Khoury MJ, Erickson JD. Medical Progress: Neural-Tube Defects. *N Engl J Med* 1999; 341: 1509-1519.
2. Deraet ER, George TM, Etchevers HC, Gilbert JR, Vekemans M, Speer MC. Human neural tube defects: Developmental biology, epidemiology, and genetics. *Neurotoxicol Teratol* 2005; 27: 515-524.
3. Mills JL, Signore C. Neural tube defect rates before and after food fortification with folic acid. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2004; 70: 844-845.
4. Pitkin RM. Folate and neural tube defects. *Am J Clin Nutr* 2007; 85(suppl): 285S-288S.
5. Dickey W, Stewart F, Nelson J, McBreen G, McMilan SA, Porter KG. Screening for celiac disease as a possible maternal risk factor for neural tube defect. *Clin Genet* 1996; 49: 106-108.
6. Chorzelski TP, Beutner EH, Sulej J, Chorzewska H, Jablonska S, Kumar V et al. IgA antiendomysium-antibody. A new immunological marker of dermatitis herpetiformis and coeliac disease. *Br J Dermatol* 1986; 87: 703-706.
7. Laurence KM, James N, Miller MH, Tennant GB, Campbell H. Double-blind randomized controlled trial of folate treatment before conception to prevent recurrence of neural-tube defects. *Br Med J* 1981; 282: 1509-1511.
8. Smithells RW, Nevin NC, Seller MJ, Sheppard S, Harris R, Read AP, Fielding DW, Walker S, Schorah CJ, Wild J. Further experience of vitamin supplementation for prevention of neural tube defect recurrences. *Lancet* 1983; 1:1027-1031.
9. Kirke NP, Daly LE, Elwood JH. A randomised trial of low dose folic acid to prevent neural tube defects. *Arch Dis Child* 1992; 67: 1442-1446.
10. Stevenson RE, Allen WP, Shashidhar Pai G, Best R, Seaver LH, Dean J, Thompson S. Decline in prevalence of neural tube defects in a high-risk region of the United States. *Pediatrics* 2000; 106:677-683.
11. Antony AC. The biological chemistry of folate receptors. *Blood* 1992; 79: 2807- 2820.
12. Rothenberg SP, da Costa MP, Sequeira JM, Cracco J, Roberts JL, Weedon J, Quadros ED. Autoantibodies against folate receptors in women with a pregnancy complicated by a neural-tube defect. *N Engl J med* 2004; 350: 134-142.
13. Howard MR, Turnbull AJ, Morley P, Hollier P, Webb R, Clarke A. A prospective study of the prevalence of undiagnosed celiac disease in laboratory defined iron and folate deficiency. *J Clin Pathol* 2002; 55: 754-757.
14. Tikkakoshi S, Savilahti E, Kolho KL. Undiagnosed coeliac disease and nutritional deficiencies in adults screened in primary health care. *Scand J Gastroenterol* 2007; 42: 60-65.

15. Molteni N, Bardella MT, Bianchi PA. Obstetric and gynecological problems in women with untreated celiac sprue. *J Clin Gastroenterol* 1990; 12:37-39.
16. Sher KS, Mayberry JF. Female fertility, obstetric and gynecological history in celiac disease. A case control study. *Digestion* 1994; 55: 243-246.
17. Smecuol E, Mauriño E, Vasquez H, Pedreira S, Niveloni S, Mazure R et al. Gynecological and obstetric disorders in coeliac disease: frequent clinical onset during pregnancy or puerperium. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996; 8: 63-69.
18. Ciacci C, Cirillo M, Auriemma G, Di Dato G, Sabbatini F, Mazzacca G. Celiac disease and pregnancy outcome. *Am J Gastroenterol* 1996; 91: 718-722.
19. Norgard B, Fonager K, Sorensen HT, Olsen J. Birth outcomes of women with celiac disease: A nation wide historical Cohort study. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:2435-2440.
20. Martinelli P, Troncone R, Paparo F, Torre P, Trapanese E, Fasano C et al. Coeliac disease and unfavorable outcome of pregnancy. *Gut* 2000; 46: 332-335.
21. Greco L, Veneziano A, Di Donato L, Zampella C, Pecoraro M, Paladini D et al. Undiagnosed coeliac disease does not appear to be associated with unfavorable outcome of pregnancy. *Gut* 2004; 53: 149-151.
22. Tata LJ, Card TR, Logan RFA, Hubbard RB, Smith CJP, West J. Fertility and pregnancy-related events in women with celiac disease: A population-based cohort study. *Gastroenterology* 2005; 128: 849-855.
23. Hozyasz KK. Coeliac disease and birth defects in offspring. *Gut* 2001; 738.
24. Haslam N, Lock RJ, Unsworth DJ. Coeliac disease, anemia and pregnancy. *Clin lab.* 2001; 47: 467-9.
25. Hancock R, Koren G. Celiac disease during pregnancy. *Can Fam Physician* 2004; 50: 1361-1363.
26. Moore CA, Li S, Li Z, Hong SX, Gu HQ, Berry RJ et al. Elevated rates of severe neural tube defects in a high-prevalence area in northern China. *Am J Med Genet* 1997; 73: 113-118.
27. Nazer JH, Margozzini JR, Rodriguez MC, Rojas MN, Cifuentes LO. Malformaciones invalidantes em Chile. Estudio ECLAMC, 1982-1997. *Rev Med Chile* 2001; 129: 67-74.
28. Johnston SD, Watson RPG, McMillan SA, Sloan J, Love AHG. Prevalence of celiac disease in Northern Ireland. *Lancet* 1997; 350: 1370.
29. McDonnell RJ, Johnson Z, Delaney V, Dack P. East Ireland 1980-1994: epidemiology of neural tube defects. *J Epidemiol Community Health* 1999; 53:782-788.
30. Gomez JC, Selvaggio GS, Viola M, Pizarro B, la Motta G, de Barrio S et al. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol.* 2001; 96: 2700-4.

31. Pratesi R, Gandolfi L, Garcia SG, Modelli IC, Almeida PL, Bocca AL et al. Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 747–750.

## European Journal of Gastroenterology & Hepatology

### Author's Ethics Checklist

Please complete this form in Word by entering information where indicated by arrowheads (ensure document is unprotected in "Tools" in the menu bar in order to write in it). Please see the author guidelines

at <http://www.editorialmanager.com/ejgh/accounts/ifaauth.htm> for further clarification on ethics issues.

Title of paper: ► Maternal celiac disease: improbable risk factor for neural tube defect

Names of authors: ► Rodrigo C Almeida, Benicio O Lima, Luiz C Castro, Lenora Gandolfi, Riccardo Pratesi.

Office use only Sub. no.: Vol/Issue:

**1. DUPLICATE PUBLICATION** is not acceptable and includes papers, or letters to the Editor reporting the same data previously published in any journal. Abstracts of papers presented at meetings and published in the proceedings of such meetings do not constitute duplicate publication,

but should be disclosed by including a note at the beginning of the paper, i.e.. "Data presented previously at (state meeting) and published as abstract in (give reference)". Have you published these data previously?

► No

**2. CONFLICT OF INTEREST** include financial support from the biomedical industry or other commercial sources in the form of research grants, bench fees, consultancy or lecture fees, travelling expenses, payment of registration fees, consultancy appointments, posts held in the biomedical industry or equipment manufacturers, stock holdings in the company, free supply of drugs and the like. These should be stated in relation to each author.

If conflict of interest is present, I will seek your permission to publish a statement to that effect at the end of your paper. Has any of the authors any conflict of interest? Please state details.

► None of the authors have any of the above mentioned modalities of conflict of interest.

**3. CONSENT** Please note that patient's, or normal control's, written consent is needed not only for

full papers, but also for case reports. The written consent needs to include not only agreement to undergo treatment, or participate in an experiment or an RCT, but also agreement for anonymised data to be published in a scientific journal. Was patient's consent obtained and in what form? If the

patient is deceased, we will need consent from their relatives, before the report can be published.

The study was performed according to the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics

Research Committee from the School of Health Sciences of the University of Brasilia.

► All women included in the study were informed about the objectives of the study and verbal and written informed consent was obtained from all.

**4. ETHICS** All studies need to be approved by the local Ethical Committees. Was your study? *(Not applicable to case reports.)*

► Yes, the study was approved by the Ethics Research Committee from the School of Health Sciences of the University of Brasilia.

**5. AUTHOR'S CONTRIBUTIONS AND APPROVAL OF TEXT** Please state briefly how each

of the authors contributed to the study, to data analysis and to the writing of your paper. Subject to your agreement, we will print this information, if the paper is accepted for publication. In addition,

please confirm that all the authors have read and approved the text as submitted to EJGH

**\* Ethics Checklist**

► All authors have read and approved the final text as submitted to EJGH.

Rodrigo O. Almeida: organized the serum samples and data sheets; performed part of the IgA-EMA testing and fluorescence microscopy; wrote the first draft of the article.

Benicio O. Lima: selected all women included in the study from his walking in clinic of Neuropediatric Surgery Unit at the Brasilia General Hospital; collected all data concerning subjects and their offspring.

Luiz C. Castro: performed the majority of the IgA-Ema testing and fluorescence microscopy.

Lenora Gandolfi: Supervised all the laboratory testing and microscopic immunofluorescence diagnosis.

Riccardo Pratesi: coordinated and supervised the study. Wrote the final draft of the article.

**6. STATISTICAL ANALYSIS** Kindly please let me know who performed the statistical analysis of you data.

► Statistical analysis was not performed since no positive case was found in our sample.

Other information for the Editor:

►

Name of person completing this form:

*(Please print if handwritten)*

► Riccardo Pratesi

Date: ► may 19, 2008