

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE
DOUTORADO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

MARGARIDA MARIA DE CASTRO ANTUNES

*Doença celíaca em pacientes e familiares
de primeiro grau no Nordeste do Brasil:
genotipagem, aspectos clínicos e histológicos*



**Recife
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARGARIDA MARIA DE CASTRO ANTUNES

*Doença celíaca em pacientes e familiares de primeiro grau
no Nordeste do Brasil:
genotipagem, aspectos clínicos e histológicos*

Tese apresentada ao Colegiado da Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente.

Linha de pesquisa Afecções Gastrointestinais: Clínica e Epidemiologia.

Orientador

Profa. Dra. Giselia Alves Pontes da Silva

**RECIFE
2010**

Antunes, Margarida Maria de Castro

Doença celíaca em pacientes e familiares de primeiro grau no Nordeste do Brasil: genotipagem, aspectos clínicos e histológicos / Margarida Maria de Castro Antunes. – Recife : O Autor, 2010.

132 folhas: fig., tab., quadros.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Saúde da criança e do adolescente, 2010.

Inclui bibliografia, anexos e apêndices.

1. Doença celíaca. 2. Epidemiologia. 3. Genética.
4. Diagnóstico.
I. Título.

616.34

616.342 3

CDU (2.ed.)

CDD (20.ed.)

UFPE

CCS2010-140

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR DA PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DIRETOR**

Prof. Dr. José Thadeu Pinheiro

COORDENADOR DA COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DO CCS

Profa. Dra. Heloisa Ramos Lacerda de Melo

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO**

COLEGIADO

Profa. Dra. Giselia Alves Pontes da Silva (Coordenadora)

Profa. Dra. Luciane Soares de Lima (Vice-Cordenadora)

Profa. Dra. Marília de Carvalho Lima

Profa. Dra. Sônia Bechara Coutinho

Prof. Dr. Pedro Israel Cabral de Lira

Profa. Dra. Mônica Maria Osório de Cerqueira

Prof. Dr. Emanuel Sávio Cavalcanti Sarinho

Profa. Dra. Sílvia Wanick Sarinho

Profa. Dra. Maria Clara Albuquerque

Profa. Dra. Sophie Helena Eickmann

Profa. Dra. Ana Cláudia Vasconcelos Martins de Souza Lima

Profa. Dra. Maria Eugênia Farias Almeida Motta

Prof. Dr. Alcides da Silva Diniz

Profa. Dra. Maria Gorete Lucena de Vasconcelos

Profa. Dra. Sílvia Regina Jamelli

Profa. Dra. Cleide Maria Pontes

Adriana Azoubel Antunes (Representante Discente – Doutorado)

Thaysa Maria Gama Albuquerque Leão de Menezes (Representante Discente – Mestrado)

SECRETARIA

Paulo Sergio Oliveira do Nascimento

Juliane Gomes Brasileiro

Taynan Barbosa Mendes Barreto



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

Título:

**Doença celíaca em pacientes e familiares de
primeiro grau no nordeste do Brasil:
genotipagem, aspectos clínicos e histológicos**

Nome:

Margarida Maria de Castro Antunes

Tese aprovada em: 05/02/2010

Membros da Banca Examinadora:

Profª. Drª. Maria Eugênia Farias Almeida Motta

Profª. Drª. Carlos Alexandre Antunes de Brito

Profª. Drª. Vera Lúcia Sdepanian

Drª. Jacqueline Rosângela de Araújo

Profª. Drª. Kátia Galeão Brandt

Recife
2010

À Memória de minha avó Maria

Aos meus pais Marcello e Zélia

Para Ernesto, Luiza e Bruno

A Deus, que me deu tantos a quem agradecer.

Agradecimentos

À Professora Giselia Alves, orientadora dessa tese, por sua grandeza e generosidade durante todo esse doutorado. Não existem palavras para agradecer todo seu apoio, sabedoria e amizade. Com toda certeza esse trabalho não estaria concluído sem a sua presença.

À professora Zélia Castro, revisora do texto, com toda gratidão e à minha mãe Zélia, por ter me ensinado que tudo se consegue com esforço. Pelo exemplo de trabalho, cuidados de mãe e avó. Paciência e colo para comigo desde sempre.

Ao meu pai Marcello que colocou o primeiro livro em minhas mãos e com quem os compartilho até hoje. Participante ativo desse trabalho, dormindo muitos dias em minha casa ou cuidando dos netos e de mim.

Ao meu marido Ernesto, co-autor da minha vida. Melhor amigo desde o tempo do colégio. Toda a minha admiração por sua bondade, inteligência e amor. Minha gratidão por seu apoio incondicional.

À Luiza e Bruno que tiveram toda a paciência e desprendimento. Na sua sabedoria de crianças, compreendendo a ausência da mãe e reforçando o carinho nos momentos difíceis.

À minha irmã e grande amiga Adriana. Aos Meus irmãos de sangue Luís Marcelo e Eduardo e aos de coração Rolando, Adriana, Antonella

e Tatiana, Ernani e Fernanda, Eliane e Roberto, Edson e Fátima, Evandro e Socorro, Evaldo e Carmela, Eugênio e Juliana, Eduardo e Catarina e à minha Sogra Neida. Por toda ajuda e incentivo que só a família pode dar.

Às famílias dos pacientes que generosamente participaram desse estudo. Por tanto que me ensinaram. Muito mais do que é possível descrever nessas páginas.

À Verônica e Gildete, sua ajuda e cuidados para a minha família me permitiram o tempo necessário para esse trabalho.

Às amigas irmãs que dividiram os cuidados com meus filhos durante esse estudo: Renata Lisboa, Verônica, Alexandra, Cíntia, Taciana e Renata Pinto.

Aos professores da Pós-Graduação da Saúde da Criança e do adolescente da UFPE. Especialmente nas pessoas de Dra Marília Lima, Maria Eugênia Motta, Ricardo Ximenes, Pedro Israel, Cláudia Marina e Alcides Diniz, que colaboraram nesse estudo com sugestões em suas várias fases.

Aos meus colegas de Turma: Ana Márcia, Dilma, Graça, Samir e Taciana pelo convívio e alegre amizade desses anos.

A Sérgio Santos, que coletou todas as amostras de sangue da pesquisa. Sempre alegre e amigo. Ajuda inestimável por toda sua experiência em pesquisa.

Aos funcionários da secretaria da Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, Paulo, Juliene e Taynan.

Ao amigos do laboratório LIKA, Lucas e Rafael co-autores do segundo artigo original. Por seu cuidado na realização dos exames genéticos; auxílio, orientação e organização nas técnicas laboratoriais.

Ao Dr. Sérgio Crovella, geneticista, pesquisador e organizador do processo da genotipagem desse estudo. Por todo suporte a essa pesquisa e disponibilidade para responder às minhas dúvidas, grazie.

Ao Dr José Luis Martins, coordenador do LIKA pela disponibilização daquele laboratório para essa pesquisa.

Ao IMIP e Hospital das Clínicas da UFPE. Na pessoa das coordenadoras dos ambulatórios, Dras Sueli Arruda e Odimariles Dantas que cederam o espaço para a coleta dos dados.

À Dra Roberta Magalhães, responsável pela Imunologia do Laboratório Marcelo Magalhães que realizou a primeira fase das sorologias do estudo.

À Dra Josemar Nobre, responsável pelo laboratório de Imunologia do IMIP. Apoio fundamental para essa pesquisa. Pessoa por quem tenho imensa admiração, por sua disponibilidade, generosidade e doçura.

Às Alunas de PIBIC Bruna e Michele, pela ajuda na coleta dos dados.

Às Dras: Patrícia Oliveira, Jaqueline Araújo, Graça Moura e Eduarda Faria pelo encaminhamento das famílias para a pesquisa.

À Dra Kátia Brandt pelo acompanhamento dos pacientes da pesquisa e grande amizade.

Aos amigos do grupo da Gastropediatria de Pernambuco: Graça, Kátia, Eugênia, Marcílio, Michela, Eduarda e Dra Giselia – que me despertam a curiosidade para estudar e por quem tenho grande admiração.

Às Dras Cristiana Menezes e Roberta Gusmão, por seus cuidados e atenção aos portadores de doença celíaca e suas famílias.

A Paulo pela formatação cuidadosa desse trabalho.

Ao CNPq que financiou esse projeto e a minha bolsa de estudos durante todo o curso.

*“A complexidade do mundo é tão grande
que seria simplesmente ridículo alguém aparecer como dono
de uma fórmula aplicável a todas as situações...
...de todas as regiões, de todos os países e de todos os continentes.*

*Mas acontece que, para além das diversidades (e notas individualizantes),
há problemas que atingem, praticamente a humanidade inteira,
embora em proporções diversas e de ângulos especiais.”*

Dom Hélder Câmara

Resumo

Introdução: Nos familiares de primeiro grau de pacientes celíacos está indicada busca ativa de novos casos por sorologia. Nesse grupo de indivíduos, o diagnóstico da doença celíaca é complexo. Dentre familiares, são frequentes pacientes assintomáticos ou sem sinais de atrofia vilositária na biópsia intestinal. Inúmeros esforços têm ocorrido para elucidar o diagnóstico em situações de dúvida e recentemente, a genotipagem do HLA foi sugerida para esse propósito. Contudo, o perfil HLA é variável entre os povos e ainda não está bem conhecido no Brasil. **Objetivos:** 1 - Determinar a soroprevalência e prevalência de doença celíaca entre familiares de primeiro grau de pacientes celíacos. 2 - Descrever as alterações histológicas, manifestações clínicas e condições associadas nos novos casos identificados por sorologia dentre os familiares de primeiro grau. 3 - Avaliar as frequências dos alelos codificadores dos HLA DQ2 e DQ8 dentre pacientes com doença celíaca e seus familiares não acometidos por essa doença. **Método:** O estudo foi descritivo com componente analítico. Os sujeitos da pesquisa foram identificados a partir de pacientes celíacos (*caso-índice*) acompanhados em ambulatórios de pediatria, gastroenterologia e endocrinologia infantil da cidade do Recife. Os familiares de primeiro grau dos *casos-índice* foram submetidos à sorologia e aqueles com anticorpo anti-transglutaminase positivo convidados a realizar biópsia de intestino delgado. Nos familiares com biópsia alterada foram pesquisados sinais, sintomas e condições associadas à doença celíaca. Os familiares que tiveram biópsia com sinais de atrofia vilositária juntamente com os *casos-índice* foram considerados *casos*. Os familiares com sorologia negativa compuseram o *grupo de comparação*. Os que tiveram sorologia positiva e biópsia sem sinais de atrofia, assim como os que recusaram a biópsia foram excluídos da análise. Todos os sujeitos foram submetidos à genotipagem dos HLA DQ2 e DQ8 e as suas frequências comparadas entre os dois grupos. A associação entre as variáveis qualitativas foram testadas pelo teste do qui-quadrado ou exato de Fisher, com nível de significância de 5%. **Resultados:** A soroprevalência foi de 20,1% (35/174). Vinte e dois familiares submeteram-se à biópsia, desses 13/174 (7,5%) com histologia grau III de Marsh, 7/174 (4%) grau I e 2/174 grau zero, conferindo uma prevalência estimada de 11,5%. Todos os familiares

com alteração de biópsia tinham sintomas ou condições associadas à doença celíaca. Dentre os 73 casos, 50 (68,5%) tinham o genótipo DQ2, 13 (17,8%) o DQ8, cinco (6,8%) DQ2 e DQ8 e cinco não possuíam esses genótipos. Dos cinco pacientes negativos, quatro tinham um gene B1*02 e um não tinha nenhum dos genes estudados. Dentre o grupo de comparação, 106/126 (78,6%) apresentaram os genótipos DQ2 e DQ8. **Conclusão:** A soroprevalência e a prevalência de doença celíaca foram elevadas dentre familiares. O achado de biópsia com alterações mínimas também foi frequente. Os genótipos DQ2 foi mais frequente dentre os casos do que no grupo de comparação. A elevada frequência dos genótipos DQ2 e DQ8 encontrada dentre familiares limita o uso da genotipagem para o diagnóstico da doença celíaca nesse grupo.

Descritores: Doença celíaca. Epidemiologia. Genética. Diagnóstico

Abstract

Introduction: Among first-degree members of celiac patients' families, active serological searches for new cases are indicated. Within this group of individuals, diagnosing celiac disease is complex. Among family members, asymptomatic patients or patients who do not present signs of villous atrophy in intestinal biopsies are often found. Great efforts have been made to elucidate the diagnosis in situations of doubt and, recently, HLA genotyping was suggested for this purpose. However, HLA profiles vary between populations and are still poorly known in Brazil. **Objectives:** 1 – To determine the seroprevalence and prevalence of celiac disease among first-degree members of celiac patients' families. 2 – To describe the histological abnormalities, clinical manifestations and associated conditions among new cases identified by serological means among first-degree family members. 3 – To evaluate the frequency of occurrence of alleles coding for the DQ2 and DQ8 types of HLA among patients with celiac disease and unaffected members of their families. **Method:** This was a descriptive study with an analytical component. The research subjects were identified from celiac patients (index cases) who were followed up at pediatric, gastroenterological and pediatric endocrinological outpatient clinics in the city of Recife. First-degree members of the index cases' families underwent serological tests and those who were positive for anti-transglutaminase antibodies were invited to undergo biopsies of the small intestine. Those with abnormal biopsies were investigated for signs, symptoms and conditions associated with celiac disease. Those whose biopsies showed signs of villous atrophy, like in the index cases, were taken to be cases. Those with negative serological tests made up the comparison group. Those with positive serological tests and biopsies without signs of atrophy, and those who refused to undergo biopsy, were excluded from the analysis. All the subjects underwent genotyping for the DQ2 and DQ8 types of HLA, and frequencies were compared between the two groups. Associations between qualitative variables were tested using the chi-square or Fisher exact test, with a significance level of 5%. **Results:** The seroprevalence was 20.1% (35/174). Twenty-two family members underwent biopsies and, among these, 13/174 (7.5%) presented Marsh's grade III histology, 7/174 (4%) had grade I and 2/174 had grade 0, thus giving an estimated prevalence of 11.5%. All the family members with biopsy abnormalities had symptoms or conditions associated with celiac disease. Among the 73 cases, 50 (68.5%)

had the DQ2 genotype, 13 (17.8%) had DQ8, five (6.8%) had DQ2 and DQ8 and five did not have either of these genotypes. Among the five negative patients, four had one B1*02 gene and one did not have any of the genes studied. In the comparison group, 106/126 (78.6%) presented the DQ2 and DQ8 genotypes. **Conclusion:** The seroprevalence and prevalence of celiac disease were high among family members. Biopsy findings with minimal abnormalities were also common. The DQ2 genotype occurred more frequently among the cases than in the comparison group. The high frequencies of the DQ2 and DQ8 genotypes found among family members limited the use of genotyping for diagnosing celiac disease in this group.

Key words: Celiac disease, epidemiology, genetics, diagnosis

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
LISTA DE QUADROS, FIGURAS E TABELAS	14
RESUMO	16
ABSTRACT	18
1 - APRESENTAÇÃO	20
1.1 Referências	26
2 – REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1 Introdução	29
2.2 Doença celíaca: distribuição mundial ou “a aldeia global da doença celíaca”	32
2.2.1 <i>A doença celíaca nas Américas e no Brasil</i>	34
2.2.2 <i>Doença celíaca dentre familiares de primeiro grau</i>	37
2.3 Diagnóstico da doença celíaca	39
2.3.1 <i>Critérios de diagnóstico</i>	39
2.3.2 <i>Aspectos clínicos do diagnóstico de Doença Celíaca</i>	41
2.3.3 <i>Testes sorológicos</i>	44
2.3.4 <i>Histologia do intestino delgado</i>	47
2.3.5 <i>Genotipagem dos marcadores HLA DQ2 e DQ8</i>	49
2.4 Considerações finais	52
2.5 Referências	53
3 – MÉTODO	66
3.1 Aspectos gerais	67
3.1.1 <i>Desenho do estudo</i>	67
3.1.2 <i>Local e período</i>	67
3.1.3 <i>População</i>	67
3.1.4 <i>Estimativa do tamanho amostral</i>	68
3.2 Critérios de inclusão dos casos e do grupo de comparação	68
3.2.1 <i>Casos</i>	68
3.2.2 <i>Grupo de comparação</i>	69
3.3 Aspectos éticos	71

3.4 Operacionalização	71
3.4.1 <i>Recrutamento</i>	71
3.4.2 <i>Coleta de Dados</i>	72
3.4.3 <i>Identificação</i>	72
3.4.4 <i>Coleta, transporte e armazenamento do sangue</i>	72
3.5 Avaliação clínica	73
3.6 Laboratório	74
3.6.1 <i>Pesquisa do anticorpo antitransglutaminase tecidual humana (tTG)</i>	74
3.6.2 <i>Genotipagem</i>	75
3.6.3 <i>Biópsia de intestino delgado</i>	75
3.7 Variáveis do estudo	76
3.8 Banco de dados	80
3.9 Análise estatística	80
3.9.1 <i>Plano de análise</i>	80
3.10 Financiamento	81
3.10.1 <i>Prestação de contas</i>	81
3.12 Referências	82
4 – ARTIGO I	83
Doença celíaca em familiares de primeiro grau de pacientes no Recife, Nordeste do Brasil, aspectos clínicos e histológicos	
Resumo	85
Abstract	86
Introdução	87
Pacientes e Método	88
Resultados	90
Discussão	94
Referências	96
5 – ARTIGO II	100
Distribuição das frequências dos HLA DQ2 e DQ8 entre pacientes celíacos e seus familiares de primeiro grau	
Resumo	102
Abstract	103
Introdução	104
Método	105

Resultados	108
Discussão	110
Referências	114
6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS E RECOMENDAÇÕES	117
6.1 Considerações finais	118
6.2 Recomendações	121
7 – APÊNDICES	122
Apêndice A – Carta de apresentação do Artigo original I ao JPGN	
Apêndice B – Termo de consentimento Livre e Esclarecido	
Apêndice C – Carta de convocação para a pesquisa	
Apêndice D – Formulário da Pesquisa	
Apêndice E – Formulário de caso - índice	
8– ANEXOS	130
Anexo A – Comprovação de submissão do Artigo original II	
Anexo B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira	

Lista de abreviaturas e Siglas

AGA	– Anticorpo anti gliadina
AGA-d	– Anticorpo anti gliadina deaminada
BID	– Biópsia de intestino Delgado
BVS	– Biblioteca Virtual em Saúde
CDC	– Centers of Disease Control and Prevention
Cm	– centímetro
CNPq	– Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Cols	– Colaboradores
DC	– Doença celíaca
DNA	– Ácido desoxirribonucléico
EDA	– Endoscopia digestiva alta
EDTA	– Ácido etilendiamino tetra-acético
ELISA	– Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EMA	– Anticorpo anti-endomíseo
ESPGHAN	– Sociedade Europeia de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica

EUA	– Estados Unidos da América
HC-UFPE	– Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
HLA	– Antígeno de histocompatibilidade linfocitária
HR	– Hospital da Restauração do Recife
IMC	– Índice de massa corporal
IMIP	– Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira
Kg	– Kilograma
LIE	– Linfócitos intra-epiteliais
LIKA	– Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami
NASPGHAN	– Sociedade Norte Americana de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica
NICE	– National Institute for Health and Clinical Excellence
NIH	– National Institutes of Health
OMS	– Organização Mundial de Saúde
OPAS	– Organização Pan-americana de Saúde
PIBIC	– Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
TCLE	– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
tTG	– Anticorpo anti-transglutaminase tecidual humana

Lista de Quadros, Figuras e Tabelas

	Revisão da Literatura	
Quadro 1	Descritores e enfoque dos estudos utilizados na revisão	32
Quadro 2	Soroprevalências para DC encontradas nos diferentes estudos brasileiros	34
Quadro 3	Sumário dos estudos em frequência de DC entre familiares de primeiro grau	38
Quadro 4	Sinais e sintomas não gastrointestinais e condições associadas à doença celíaca	42
	Método	
Figura 1	Fluxograma da Pesquisa	70
Quadro 1	Classificação de Marsh para diagnóstico histológico de doença celíaca	76
Quadro 2	Descrição das variáveis do estudo	77
Figura 2	Plano de análise principal da pesquisa	80

	Artigo I		
Tabela 1	Frequência do anticorpo antitransglutaminase segundo sexo e grau de parentesco com o caso-índice	91	
Figura 1	Fluxograma da pesquisa com a distribuição dos resultados das sorologias e biopsias, classificadas segundo Marsh	92	
Tabela 2	Idade, parentesco com o caso-índice, resultado do anticorpo antitransglutaminase, percentis da estatura e índice de massa corporal, classificação histológica e características clínicas dos 20 familiares de primeiro grau com biopsia alterada	93	
	Artigo II		
Tabela 1	Sexo, idade e características clínicas dos 73 pacientes com doença celíaca no momento do diagnóstico	108	
Tabela 2	Frequência dos genótipos DQ2 e DQ8 nos pacientes e controles familiares	109	
Tabela 3	Características dos pacientes sem HLA DQ2 ou DQ8, segundo sexo, idade, sintomas no diagnóstico e alelos presentes na genotipagem.	109	
Tabela 4	Frequências dos alelos A1*0201, A1*05, B1*02 e B1*0302 nos pacientes e controles familiares.	110	

1 - APRESENTAÇÃO



1 – Apresentação

Em 1999, foi realizado o primeiro estudo sorológico para doença celíaca (DC) no Nordeste do Brasil. Brandt (2001) demonstrou 1,9% de soroprevalência para o anticorpo antitransglutaminase em amostras de sangue de 831 crianças e adolescentes do ambulatório de pediatria do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP). Uma frequência considerada surpreendentemente alta na ocasião. A revolução do conhecimento acerca da doença celíaca, que havia se iniciado na Europa na década anterior e se consolidava em todo o mundo, era assim descortinada nessa região. Novos estudos, em diabéticos (ARAÚJO; SILVA; MELO, 2006), crianças com baixa estatura (GUEIROS; SILVA, 2009), em pacientes com queixas digestivas (ALBUQUERQUE, 2009) e universitários (MOURA, 2009) confirmavam que a doença celíaca é frequente no Nordeste do Brasil.

Em todo o mundo, uma mudança de paradigma em relação ao conhecimento da DC se encontrava em curso, uma “revolução” nos moldes descritos por Thomas Kuhn¹. O paradigma antigo: A doença celíaca é rara, de sintomatologia característica, que acomete populações de ascendência europeia e de diagnóstico objetivo (sintomas e atrofia das vilosidades em consumo de glúten; desaparecimento dos sintomas e normalização da biopsia com a retirada do glúten; atrofia vilositária em biopsia após nova exposição a essa proteína) (MEEUWISSE, 1970). O novo paradigma: A doença celíaca é frequente, um novo problema de saúde pública nas diversas regiões do mundo; sua clínica é polimórfica e o seu diagnóstico muitas vezes de difícil definição (ACCOMANDO; CATALDO, 2004).

A clássica descrição do *iceberg* celíaco, metáfora perfeita dos achados dos novos estudos populacionais, já prenunciava as dificuldades que surgiriam para a clínica: uma grande quantidade de indivíduos com testes sorológicos positivos e sem alterações na biopsia,

¹ Thomas Kuhn, autor do livro “*A estrutura das revoluções científicas*”, explica a construção do conhecimento científico por substituição de paradigmas (KUHN, 1970).

ou ainda, com atrofia vilositária e sem sintomatologia característica (MAKI; COLLIN, 1997). Esses achados são *anomalias*² no paradigma antigo, que baseia o diagnóstico da DC nos sintomas e na evidência de atrofia vilositária na mucosa do intestino delgado. Novos exames começaram a ser sugeridos na tentativa de fornecer maior precisão ao diagnóstico. Dentre eles, a genotipagem dos antígenos de histocompatibilidade linfocitária DQ2 e DQ8, pois em estudos europeus eles se mostraram presentes em até 98% dos pacientes portadores de DC (FERNANDEZ-ARQUERO et al., 1995).

Contudo, o perfil HLA é extremamente variável e reflete a formação de cada povo (NIGAN et al, 2004). O Brasil foi povoado inicialmente por tribos ameríndias originárias da Sibéria e que aqui chegaram através do estreito de Bering (SANTOS et al., 1999). Esse povo sofreu miscigenação com europeus a partir do Século XVI e, posteriormente, com africanos. Estudos genéticos populacionais confirmam as teorias de que houve miscigenação entre as três etnias no Brasil. Miscigenação tão acentuada, que na maioria dos brasileiros, não é possível determinar a ascendência genética apenas pelas características físicas (PARRA et al., 2003). No Brasil, portanto, as características da população são tão peculiares que se espera que o seu perfil HLA seja distinto do europeu.

Além disso, nos países em desenvolvimento, soma-se outra dificuldade: o diagnóstico diferencial com enteropatias infecciosas e desnutrição, situações mais prevalentes do que nos países desenvolvidos e que podem ser confundidas com a doença celíaca, tanto do ponto de vista clínico, como histológico (PODDAR; THAPA; SINGH, 2006). Nessa população o achado de outros marcadores do diagnóstico pode ser útil e muito valioso.

Os familiares de primeiro grau de pacientes portadores de DC têm risco elevado para desenvolver a doença (DUBÉ et al., 2005). Existe recomendação de que se realize sorologia nesses indivíduos para diagnóstico precoce, evitando complicações da doença (NICE, 2009). Nesse grupo especial, está concentrado o maior número de indivíduos com diagnóstico indefinido (BONAMICO et al., 2006). Nessa nova realidade, os cuidados médicos com o paciente com DC se estendem aos seus familiares.

² Segundo T Kuhn as *anomalias* são situações não explicadas pelo paradigma vigente (KUHN, 1970).

A motivação para a pesquisa, que originou a tese ora apresentada, surgiu pelas dificuldades no diagnóstico e condução da DC entre familiares. A escolha do objeto de estudo foi norteada pela sugestão recente do uso da genotipagem no diagnóstico, em situações de dúvida, especialmente em grupos de risco. Este estudo se justifica pela necessidade de avaliar o uso da genotipagem HLA DQ2 e DQ8 no diagnóstico de doença celíaca em populações brasileiras, considerando seu alto custo e dificuldades de operacionalização.

A pesquisa foi planejada para ser um estudo exploratório, descritivo e de análise de marcadores HLA. Porém, necessitava de uma etapa anterior de diagnóstico dentro do próprio estudo. Era preciso definir dentro do grupo de familiares os indivíduos com DC e os que não eram acometidos por essa doença no momento da pesquisa. Os novos pacientes diagnosticados durante o estudo se somaram aos *casos-índice* e compuseram o grupo de *casos*. E os familiares não acometidos por doença celíaca compuseram o *grupo de comparação*. Essa etapa de diagnóstico gerou o primeiro artigo original da tese. A comparação das frequências dos HLA DQ2 e DQ8 entre os casos e o grupo de comparação gerou o segundo artigo.

A tese se intitula *Doença celíaca em pacientes e familiares de primeiro grau no Nordeste do Brasil: genotipagem, aspectos clínicos e histológicos* e é composta por: um capítulo de revisão da literatura, um capítulo de método e dois artigos originais.

A tese foi planejada e conduzida para responder as seguintes perguntas:

1. Qual a soroprevalência para o anticorpo anti-transglutaminase e a prevalência da DC dentre familiares de primeiro grau de pacientes portadores de DC em unidades hospitalares da cidade do Recife, Nordeste do Brasil?
2. Quais as manifestações clínicas e aspecto histológico das biopsias dos casos de DC identificados por triagem sorológica dentre familiares de primeiro grau de pacientes celíacos?
3. A frequência dos genótipos DQ2 e DQ8 do sistema HLA dentre pacientes portadores de DC do Recife é a mesma observada na Europa?
4. Existe diferença nas frequências dos genótipos DQ2 e DQ8 do sistema HLA entre indivíduos celíacos e seus familiares de primeiro grau?

As hipóteses formuladas foram: 1 - As frequências dos genótipos DQ2 e DQ8 nos celíacos do Brasil são diferentes das descritas na Europa. 2 - Os pacientes portadores de DC têm a frequência dos genótipos DQ2 e DQ8 semelhante àquela de seus familiares com sorologia negativa para DC.

A tese atende aos seguintes objetivos:

- 1 - Determinar a soroprevalência para o anticorpo antitransglutaminase, a prevalência de doença celíaca dentre familiares de primeiro grau de pacientes com DC na cidade de Recife, Nordeste do Brasil.
- 2 - Descrever as alterações histológicas, manifestações clínicas e condições associadas nos novos casos identificados por sorologia dentre os familiares de primeiro grau.
- 3 - Avaliar as frequências dos alelos codificadores dos HLA DQ2 e DQ8 dentre pacientes com doença celíaca e seus familiares com sorologia negativa para DC.

O capítulo de revisão da literatura foi estruturado para abranger os aspectos do diagnóstico da DC na atualidade, a fim de embasar a definição dos métodos de diagnóstico da pesquisa e a definição dos casos e grupo de comparação. Nele estão também contemplados os aspectos da distribuição da DC e dos marcadores do HLA no mundo e na América Latina para fundamentar a discussão dos dados empíricos encontrados na pesquisa.

O capítulo de método descreve o planejamento, operacionalização do estudo e análise dos dados, assim como os custos e materiais empregados na pesquisa “*Marcadores genéticos de histocompatibilidade linfocitária em familiares de primeiro grau de pacientes celíacos*” financiada pelo CNPq, por meio do edital Universal de 2006 (Processo: 475120/2006-1). Os dados empíricos obtidos no estudo compuseram o banco de dados que originou os dois artigos ora apresentados.

O primeiro artigo submetido para publicação ao *Jornal de Pediatria (Rio J)* se intitula “*Doença celíaca em familiares de primeiro grau de pacientes no Recife, Nordeste do Brasil, aspectos clínicos e histológicos*”. E foi construído a partir dos dois primeiros objetivos da tese. Esse artigo se fundamenta nos dados obtidos na primeira fase do estudo elaborada para definição dos grupos de caso e comparação. Além da soroprevalência e dos

achados das biopsias, são descritos os sintomas e condições associadas relatadas pelos pacientes identificados. Entre os dados descritos nesse artigo, estão: a alta prevalência da doença nos familiares, a presença de sintomas ou condições associadas em todos os novos casos diagnosticados na pesquisa e o achado de alterações inflamatórias mínimas nas biopsias de um terço dos pacientes com sorologia positiva para o anticorpo antitransglutaminase.

O segundo artigo “*Distribuição das frequências dos HLA DQ2 e DQ8 entre pacientes portadores de DCe seus familiares de primeiro grau*”, que atende o segundo e o terceiro objetivo da pesquisa, descreve as frequências dos genótipos DQ2 e DQ8 nos grupos de pacientes portadores de DCe seus controles familiares, assim como a distribuição dos genes isolados desses genótipos entre esses grupos. As frequências dos HLA DQ2 e HLA DQ8 foram diferentes daquelas descritas na Europa e próximas às do Chile e Estados Unidos da América, sugerindo assim um padrão uniforme e distinto nas populações das Américas, possivelmente explicado pelo povoamento desse continente. Outro dado descrito nesse estudo é a alta frequência dos genótipos DQ2 e DQ8 dentre os controles o que dificulta o seu uso para diagnóstico dentre familiares dessa região.

Ainda no segundo artigo, para caracterização da amostra estão descritos a idade e os sintomas no momento do diagnóstico do grupo de 73 pacientes portadores de DC incluídos no estudo. Esse grupo abrange os casos-índice e os familiares que tiveram atrofia vilositária nas suas biopsias de intestino delgado durante a primeira fase do estudo. Dentre esses pacientes, 40% tinham sintomas discretos ou não gastrointestinais no momento do diagnóstico, refletindo aumento no grau de suspeição para a doença celíaca nessa região. O segundo artigo foi submetido ao *Jornal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* no dia 06/12/2009.

A tese se destina à obtenção do título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente pela Aluna Margarida Maria de Castro Antunes e foi orientada pela Professora Dra Giselia Alves Pontes da Silva. O estudo se insere na Linha de Pesquisa Afecções gastrointestinais: clínica e epidemiologia, que pertence ao Grupo de Pesquisa em Gastroenterologia e Nutrição da UFPE, coordenado pela Professora Giselia Alves Pontes da Silva.

1.1 Referências

1. ACCOMANDO, S.; CATALDO F. The global village of celiac disease. **Dig Liver Dis**, Italy, v. 36, n. 7, p. 492-498, 2004.
2. ALBUQUERQUE, L. T. C. de. **Sintomas gastrintestinais discretos: um novo olhar sobre formas de apresentação da doença celíaca**. 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.
3. ARAÚJO, J.; SILVA, G. A. P. da; MELO, F. M. de. Soroprevalência da doença celíaca em crianças e adolescentes com diabetes melito tipo1. **Jornal de pediatria**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 3, p. 210-214, 2006.
4. BONAMICO, M. et al. Serologic and genetic markers of celiac disease: A sequential study in the screening of first degree relatives. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 42, n. 2, p. 150-154, 2006.
5. BRANDT, K. G. Soroprevalência de doença celíaca entre crianças e adolescentes atendidos no Instituto Materno Infantil de Pernambuco – IMIP. 2001. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2001.
6. DUBÉ, C. et al. The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk western European populations: A systematic review. **Gastroenterology**, v. 128, n. 4, p. 57-67, 2005. Suplemento 1.
7. FERNANDEZ-ARQUERO, M. et al. HLA-Linked Genes Acting As Additive Susceptibility Factors in Celiac Disease. **Hum Immunol**, v. 42, n. 4, p. 295-300, 1995.
8. GUEIROS, A. C. L. N.; SILVA, G. A. P. Soropositividade para doença celíaca em crianças e adolescentes com baixa estatura. **Revista Paulista de Pediatria**, São Paulo, v. 27, n.1, p. 28-32, 2009.
9. KUHN, T. S. **A estrutura das revoluções científicas**. 9. ed. São Paulo: Perspectiva, 2005.
10. MAKI, M.; COLLIN, P. Coeliac disease. **Lancet**, v. 349, p. 1755-1759, 1997.

11. MEEUWISSE, G. W. Diagnostic criteria in celiac disease. **Acta Paediatr Scand**, v. 59, p. 461-463, 1970.
12. MOURA, A. C. **Soroprevalência de doença celíaca em adolescentes e adultos jovens da cidade do Recife**. 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.
13. NICE. National Institute for Health and Clinical Excellence - Clinical guideline 86. **Celiac disease: Recognition and assessment of coeliac disease**. 2009.
14. NIGAN, P. et al. Polymorphism of HLA class I genes in the Brazilian population from the Northeastern State of Pernambuco corroborates anthropological evidence of its origin. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 2, p. 204-209, 2004.
15. PARRA, F. C. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, n. 1, p. 177-182, 2003.
16. PODDAR, U.; THAPA, B. R.; SINGH, K. Clinical Features of celiac disease in Indian Children: are They Different From the West? **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 43, n. 3, p. 313-317, 2006.
17. SANTOS, F. R. et al. The central Siberian origin for Native American Y chromosomes. **Am J Hum Genet**, v. 64, n. 2, p. 619-628, 1999.

2 - REVISÃO DA LITERATURA



2 – Revisão da Literatura

2.1 Introdução

A doença celíaca (DC) é uma enteropatia crônica dependente do glúten. Esse pressuposto norteou os critérios de diagnóstico para DC desde 1970 (MEEUWISSE, 1970). A demonstração de atrofia das vilosidades na biópsia do intestino delgado durante o consumo de glúten e o seu desaparecimento após a retirada dessa proteína da dieta, assim como o desaparecimento de sintomas; confirmam que o indivíduo é portador de DC e que deve permanecer em dieta sem glúten por toda a vida (WALKER-SMITH et al, 1990).

O surgimento dos testes sorológicos na década de 1980 causou uma verdadeira revolução no conhecimento acerca da DC (DIETERICH et al, 1997). De doença rara, que acomete populações europeias e com quadro clínico característico, percebeu-se que a DC é freqüente, polimórfica e acomete pessoas das diversas regiões do mundo (ACCOMANDO; CATALDO, 2004). Demonstrou-se também que a enteropatia dependente do glúten pode variar de alterações discretas na mucosa do intestino delgado à clássica atrofia das vilosidades (MARSH, 1992). Esses elementos trouxeram novos desafios no diagnóstico dessa doença. Situações de dúvida no diagnóstico se multiplicam desde então.

Num dos primeiros grandes estudos populacionais realizados, Catassi et al (1995), na Itália, demonstraram que para cada paciente com diagnóstico de DC existiam até sete com sintomatologia discreta ou se dizendo sem sintomas e, portanto, não diagnosticados pela clínica. Nascia, assim, o conceito de *iceberg* celíaco descrito posteriormente por Maki e Collin em 1997. Na ponta do *iceberg*, acima do nível do mar, se encontravam os pacientes com sintomas, sorologia positiva e atrofia das vilosidades no intestino delgado. Na base, os indivíduos com marcadores genéticos, sorologia negativa e sem enteropatia estabelecida. Entre esses, uma grande quantidade de pacientes com sorologia positiva e sem alterações de biópsia ou com alterações de biópsia e sem manifestações clínicas, ou seja, uma grande “zona de cinza” entre a saúde e a doença celíaca estabelecida (MAKI; COLLIN, 1997).

Os familiares de primeiro grau de pacientes com DC compartilham fatores de risco genéticos e o ambiente, portanto são os indivíduos de maior risco para desenvolver a DC (ROBINSON et al, 1971; HILL et al, 2005). Neles, a frequência de DC é entre 10 e 20 vezes superior àquela da população geral (KOTZE et al, 2001; DUBÉ et al, 2005; ESTEVE et al, 2006). Por esse motivo, é consenso que nesses indivíduos se deva realizar busca ativa da DC por meio de sorologia, mesmo naqueles que se dizem assintomáticos (NICE, 2009; HILL et al, 2005). Nesse grupo, contudo, encontra-se a maior concentração de pacientes pouco sintomáticos e situações de indefinição diagnóstica.

Nos países em desenvolvimento, além das dificuldades descritas acima, as enteropatias parasitárias e infecciosas e o super crescimento bacteriano, que caracterizam a enteropatia ambiental, são muito prevalentes e podem apresentar clínica e alterações histopatológicas semelhantes a DC, especialmente quando a atrofia de vilosidades não está presente (PODDAR et al, 2002). Essas peculiaridades do diagnóstico da DC já foram descritas na Índia, Turquia e Egito, países cuja população tem condições de vida muito semelhantes às que são observadas na maior parte da população brasileira (GROOVER et al, 2007; ABU-ZEKRY et al, 2008; CATASSI; YACHHA, 2008).

Recentemente tem sido sugerido que os genes codificadores das moléculas DQ2 e DQ8 do sistema de histocompatibilidade linfocitária (HLA) poderiam ser utilizados para definição diagnóstica em caso de dúvida (HILL et al, 2005). Os HLA DQ2 e DQ8 são os marcadores genéticos mais fortemente associados a DC (KAUKINEN et al, 2002; ARMSTRONG; ROBINS; HOWDLE, 2009). Na Europa, O HLA DQ2 está presente em cerca de 90% e o DQ8 em 8% dos pacientes celíacos, em contraste com a população geral onde eles estão em 20 a 30% dos indivíduos (HUNT; VAN HELL, 2009). Em populações das Américas, no entanto, o HLA DQ8 está presente em cerca de 17% dos pacientes celíacos, o dobro do descrito em populações europeias (PEREZ-BRAVO et al, 1999; ARAYA et al, 2000; FASANO et al, 2003). Esse fato é explicado por o sistema HLA ser um dos mais polimórficos existentes, refletir a formação de cada povo e, portanto, variar entre as diversas regiões do mundo (NIGAN et al, 2004).

No Brasil, além disso, a população é extremamente miscigenada (PARRA et al, 2003) e, portanto, com características genéticas distintas das populações europeias onde a

maior parte dos estudos em DC foi realizada. Muitos aspectos da DC no Brasil ainda são desconhecidos. Dentre eles, a frequência dos genes HLA nos pacientes celíacos e a distribuição desses genes dentre os familiares de primeiro grau desses pacientes. Assim, a revisão a seguir embasou a tese *“Doença celíaca em pacientes e familiares de primeiro grau no Nordeste do Brasil: genotipagem, aspectos clínicos e histológicos”* e enfoca a distribuição e as características da DC no mundo, especialmente em grupos de risco, seu diagnóstico e associação com os genes codificadores das moléculas DQ2 e DQ8 do sistema HLA.

Foram revisados artigos indexados nas fontes de informação em ciências da saúde: LILACS, MEDLINE, Biblioteca Cochrane, utilizando o banco de dados da Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) da BIREME–OPAS–OMS e do SciELO, no período de 1970 até 2009. Os descritores e o enfoque dos estudos em cada item da revisão estão listados no quadro 1.

Quadro 1: Descritores e enfoque dos estudos utilizados na revisão

Aspectos da revisão	Descritores	Enfoque dos estudos
DC: distribuição mundial ou “a aldeia global da DC”	DC, prevalência	Estudos abordando a distribuição da DC em população geral da Europa, Norte da África, Oriente Médio e Américas.
O caminho da DC nas Américas e no Brasil	HLA, população América. Glúten, DC, inflamação aleitamento materno HLA, polimorfismo, ameríndios Consumo, alimentos, Brasil	Estudos que abordam o perfil HLA das tribos ameríndias, o povoamento das Américas e consumo alimentar no primeiro ano de vida no Brasil e frequência de aleitamento materno.
Grupos de risco e familiares	DC, grupos de risco DC, familiares	Estudos abordando a distribuição da DC dentre grupos de risco, especialmente familiares de primeiro grau de pacientes celíacos.
Critérios de diagnóstico	DC diagnóstico	Consensos diagnósticos em DC, <i>Guideline</i> , artigos discutindo os consensos em DC.
Aspectos clínicos do diagnóstico de DC	DC, sintomas Frequência, DC	Estudos clínicos em DC. Frequência da DC em grupos de pacientes com sintomas específicos
Testes sorológicos	DC, sorologia, diagnóstico Anticorpo antitransglutaminase, DC Anticorpo antiendomíseo, DC	Estudos abordando a técnica da sorologia na DC. Estudos de validação da tTG e EMA.
Histologia do intestino delgado	DC, diagnóstico DC, biopsia DC, histologia	Estudos descritivos da histologia do intestino delgado em DC. Classificação das alterações histológicas. Estudos comparativos entre os resultados das sorologias e biopsias
Genotipagem dos HLA DQ2 e DQ8	DC, HLA DC, genotipagem	Estudos de HLA em DC. Estudos em fisiopatogenia da DC. Genotipagem em grupos de familiares e nas populações europeia e americana.

2.2 Doença celíaca: distribuição mundial ou “a aldeia global da doença celíaca”

A DC é uma das doenças desencadeadas por alimentos mais freqüentes da atualidade. Há poucos anos atrás, era crença que a DC acometia apenas indivíduos de ascendência europeia. Na atualidade, sabe-se que a doença está presente nas Américas (FASANO, 2003), na África (CATASSI, 2006; ABU-ZEKRY et al, 2008), no Oriente Médio (HASHEMI et al, 2008) e já foram relatados casos de DC em países do extremo leste da Ásia (JIANG; ZHANG; LIU, 2009). Estima-se que entre 0,5 e 1% da população mundial seja acometida pela DC (CATASSI; YACCHA, 2008).

Na maioria dos países europeus, a prevalência de DC situa-se entre 0,5 e 0,8% e parece haver um aumento da frequência do sudeste para o norte europeu. As maiores prevalências de DC estão na Inglaterra, Finlândia, Suécia e Hungria, países do norte e as menores na Espanha, Itália e Alemanha (MAKI et al, 2003; ACCOMANDO; CATALDO, 2004; IVARSSON, 2005; MYLEUS et al, 2009). Alguns autores relacionam essa distribuição ao “caminho” que o glúten percorreu desde o período neolítico. Iniciada há cerca de 10000 anos na região do “*crescente fértil*” no sudoeste asiático, a cultura do trigo se expandiu para a Europa, através do mediterrâneo (Norte da África, Grécia e Sul da Europa) e do vale do rio Danúbio na Europa Central; levando cerca de 5000 anos para chegar ao Norte da Europa - menor tempo de exposição ao glúten, menor seleção negativa de genes e maior prevalência da DC. As exceções a essa teoria são a região abaixo do Norte da África, a Sardenha, Irã e Turquia, onde a prevalência da DC é elevada (SAVAS et al, 2007; CATASSI & YACHHA, 2008).

Nas Américas, a DC foi descrita desde o Canadá até a América do Sul, com prevalência semelhante à europeia (ARAYA et al, 2000; DUBÉ et al, 2005; FASANO et al, 2003; CINTALDO et al, 2006; BRANDT; SILVA, 2008). Nos Estados Unidos da América (EUA), Fasano e et al. (2003) realizaram *screening* populacional em 13145 indivíduos, sendo 4126 de população geral (doadores de sangue, escolares, exames médicos de rotina) e 9019 pertencentes a grupos de risco (a maioria – 4508, familiares de primeiro grau) e demonstrou prevalência de DC de 1:133 na população geral e 1:22 em familiares de primeiro grau.

No Brasil, especificamente, os estudos em população geral apontam para uma soroprevalência entre 0,15 e 1,75% (GANDOLFI et al, 2000; MELO et al, 2006; CROVELLA et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2007; MOURA, 2009). As características dos estudos sorológicos em população geral do Brasil estão descritas no quadro 2.

Quadro 2: Soroprevalências para DC encontradas nos diferentes estudos brasileiros

Autor	Cidade (ano)	Número	Origem	Sorologia	Frequência (%)
Gandolfi et al	Brasília (1998)	2045	Doadores de sangue	EMA*	0,15
Melo et al	Ribeirão Preto (2002)	3000	Doadores de sangue	tTG [†] soro EMA*	0,80 0,50
Oliveira et al	São Paulo (2004)	3000	Doadores de sangue	tTG [†] soro	1,50
Crovella et al	Recife (2006)	1074	Universitários (580) Triagem para filariose (494)	tTG [†] soro	0,84
Moura	Recife (2008)	683	Universitários	tTG [†] soro	1,75

*EMA: anticorpo antiendomíseo

† tTG: Anticorpo antitransglutaminase tecidual humana

Alguns pesquisadores justificam o fato do Brasil ter uma frequência semelhante à da Europa por ter sido colonizado por povos oriundos daquele continente que teriam trazido os genes de risco. (GUANDALINI, 2008). Entretanto, como se verá a seguir, curiosamente a explicação não é tão simplista assim.

2.2.1 A doença celíaca nas Américas e no Brasil

“O conhecimento da distribuição geográfica da DC pode ajudar a melhor compreensão da interação entre os fatores ambientais e genéticos envolvidos nessa desordem complexa”

C. Catassi, SK Yachha

Parafrazeando Catassi & Yachha (2008), para entender a distribuição da DC nas Américas e no Brasil é preciso compreender o perfil dos genes HLA de risco para essa doença nas populações americana e brasileira. Assim como, conhecer o caminho que o glúten fez até hoje nesse continente, o padrão de consumo do trigo e de outros fatores ambientais, tais como os agressores a mucosa do intestino delgado.

Os primeiros habitantes das Américas são oriundos de tribos da Sibéria, que chegaram ao Canadá atravessando pelo estreito de Bering e posteriormente migraram para o sul, constituindo as tribos ameríndias que povoaram todo o continente americano (SANTOS et al, 1999; PARRA et al, 2003). Essas tribos não tinham contato prévio com o glúten e as formas selvagens do trigo não eram, ainda, encontradas no continente americano. Portanto, a primeira exposição dos ameríndios ao glúten ocorreu após a chegada dos europeus há 500 anos. Comparativamente, no sudeste da Europa e no Oriente Médio, o cultivo do trigo existe há cerca de 10.000 anos. No Norte da Europa, aonde o cultivo do trigo chegou cerca 5.000 anos depois do sul a prevalência da DC é até duas vezes maior do que no Sudeste (ACCOMANDO; CATALDO, 2004). Portanto, do ponto de vista da evolução, 500 anos é um tempo muito curto para seleção negativa dos genes de risco para DC, tanto os HLA, quanto os não HLA.

Os genes HLA muito utilizados nos estudos genéticos populacionais refletem o processo de miscigenação que originou cada povo, pois são herdados em codominância, persistindo entre as gerações (FERNANDES et al, 2003). O padrão da frequência dos HLA também espelha a evolução, pois ele sofre seleção negativa quando os seus genes estão associados a doenças muito prevalentes (PARHAM et al, 1997; HOLLENBACH et al, 2001).

Estudos em genética populacional encontraram que algumas tribos ameríndias do norte do Canadá (região do primeiro povoamento americano) têm predomínio dos alelos codificadores do HLA DQ8, nos conduzindo a supor que esse seria o perfil HLA de risco para DC original desse continente (MONSALVE; EDIN; DEVINE, 1998). Pelo curto espaço de tempo de exposição ao glúten (e conseqüentemente à DC), é possível que esses genes ainda sejam os predominantes nas Américas. Essa hipótese é corroborada pela descrição do predomínio do HLA DQ8 dentre pacientes celíacos ameríndios e familiares de chilenos (ARAYA et al, 2000).

Atualmente, o consumo de trigo no Brasil é alto e semelhante aos países europeus. Segundo dados do IBGE no Nordeste brasileiro, o consumo de trigo responde por 18% das calorias ingeridas por domicílio e é um dos maiores do Brasil (BRASIL, 2004). O primeiro contato com o glúten é precoce em crianças brasileiras. Estima-se que 60% das crianças sejam desmamadas antes do 6º mês de vida e que 20% das crianças já tenham contato com o glúten nessa idade (BRASIL, 2009). A introdução do glúten entre o quarto e sexto mês e na vigência do aleitamento materno seria fator protetor para DC, bem como, sua introdução anterior a essa idade, como ocorre na maioria das crianças brasileiras, seria fator de risco (ASCHER et al, 1997; FARREL; KELLY, 2002; NORRIS et al, 2005). A exposição precoce e em altas doses ao glúten está relacionada ao aumento na incidência de DC observado em alguns países (WEILE et al, 1995; IVARSSON, 2005).

Além disso, a maioria da população brasileira está exposta a condições ambientais adversas. O desmame precoce conduz à desnutrição nas populações mais carentes que juntamente com as entero-infecções nos primeiros meses de vida modificam a barreira da mucosa intestinal, facilitando a passagem de peptídeos de glúten não completamente digeridos, evento inicial no processo patogênico da DC (KAGNOFF, 2007; HUNT; VAN HEEL, 2009).

De acordo com os pressupostos acima, além da colonização europeia, a população brasileira é vulnerável a DC tanto por suscetibilidade genética, quanto por estar exposta a fatores de risco ambientais conhecidos e determinantes do desencadeamento dessa doença, explicando assim a frequência encontrada em nosso meio.

Dentre os familiares de primeiro grau de pacientes celíacos, esses fatores de risco estão ampliados porque eles compartilham a vulnerabilidade genética e o ambiente com os pacientes (RUBIO-TAPIA et al, 2008). Assim como o diabético tipo 1 (COLLIN et al, 2002; ARAÚJO; SILVA; MELO, 2006; WHITACKER et al, 2008), dentre outros grupos, os familiares de primeiro grau são considerados grupo de risco para DC (DUBÉ et al, 2005). Neles, a frequência da DC é de cerca de 20 vezes a da população geral e por esse motivo esses indivíduos são objeto de numerosos estudos genéticos e de fatores de risco ambientais.

2.2.2 Doença celíaca dentre familiares de primeiro grau

Os estudos iniciais em familiares de primeiro grau de pacientes celíacos foram realizados na Inglaterra na década de 1970, baseavam-se nos achados de biopsia intestinal e demonstravam prevalência de DC de 5,5% (ROBINSON et al, 1971). Na Espanha em 1999, encontraram-se soroprevalência para o EMA de 5,8% e prevalência de DC por biopsia de 5,5% em 675 familiares, frequências muito próximas, demonstrando a correlação do anticorpo antiendomíseo (EMA) com os achados de atrofia vilositária em biopsia (FARRÉ et al, 1999). Na Itália em 2006, a soroprevalência para tTG em 439 familiares de primeiro grau foi de 10,5% e para o EMA de 8,7% (BONAMICO ET AL, 2006). Embora a Itália e a Espanha estejam próximas geograficamente a diferença nas frequências é acentuada. Nos países do Norte da Europa, os estudos em familiares demonstram uma prevalência de cerca de 10%, mais próxima a encontrada na Itália (ROSTAMI et al, 2000; HOGBERG et al, 2003).

Em populações não europeias a frequência de DC entre familiares de primeiro grau também é elevada. Nos Estados Unidos da América do Norte (EUA), Rubio-Tapia e et al. (2008), avaliaram 344 familiares de primeiro grau. Dentre eles, 47 (14%) tiveram tTG positiva, 33 (9,5%) o EMA positivo e 39 (11%) diagnóstico histológico de DC. Também nos EUA, Fasano e et al. (2003). avaliaram 3214 familiares com EMA e posteriormente tTG e encontraram uma soroprevalência de 4,7%. Essa diferença, possivelmente se deve ao uso do EMA como teste inicial o que diminuiria a sensibilidade da triagem e também, ao tamanho da amostra, pois como se observa a frequência tende a diminuir em amostras maiores (FASANO et al, 2003).

Na América Latina, Araya et al (2000) estudaram um grupo de 126 familiares de primeiro grau de pacientes celíacos no Chile e demonstraram uma soroprevalência para o EMA de 4,8%. No Brasil, o primeiro estudo em familiares foi feito por Kotze et al (2001), em Curitiba. Esses autores avaliaram 115 familiares por meio do EMA IgA e encontraram 18 (15,6%) com EMA positivo (KOTZE et al, 2001). Em 2004, Almeida et al (2008). realizaram um segundo estudo, dessa vez em Brasília e também utilizaram o EMA IgA. Dentre os 188 familiares testados, nove (4,8%) tiveram o EMA positivo e todos apresentaram atrofia vilositária na histologia do intestino delgado. O Quadro 3 sintetiza os resultados dos principais estudos que descrevem a frequência de DC em familiares de primeiro grau.

Quadro 3: Sumário dos estudos em frequência de DC entre familiares de primeiro grau.

Autor (ano)	Local	Número de familiares	Exame	Frequência (%)
Farré (1999)	Espanha	675	EMA† Biopsia (atrofia vilositária)	5,8 5,5
Bonamico (2006)	Itália	439	tTG‡ EMA†	10,5 8,6
Fasano (2005)	EUA*	4508	EMA†	4,5
Groover (2007)	Índia	169	tTG ‡ Biopsia (atrofia vilositária)	13,6 8,6
Esteve (2006)	Espanha	221	tTG‡ e EMA†	7,2
Kotze (2001)	Brasil (Paraná)	115	EMA†	15,6
Almeida (2008)	Brasil (Brasília)	188	EMA†	4,8
Dubé (2005)	Europa EUA América do Sul	2607	Biopsia (atrofia vilositária)	7,6

*EUA: Estados Unidos da América.

†EMA: anticorpo antiendomíseo

‡ tTG: anticorpo antitransglutaminase

Em 2005, doze estudos de prevalência em diversos países da Europa, EUA e América do Sul (incluindo o Brasil) foram analisados em conjunto por Dubé et al (2005). Esses estudos avaliaram entre 92 e 943 pacientes, no total, 2607. Nessa metanálise, quando se considerava a atrofia vilositária para diagnóstico, a prevalência de DC variou de 4 a 12%, com

média de 7,6%. Todavia, se o grau I de Marsh fosse considerado como diagnóstico, a prevalência de DC entre familiares era de 44%.

Além das altas frequências descritas acima, existe ainda uma grande variabilidade entre os diversos estudos. Essa diferença é originada por diversos motivos: diferenças populacionais, das técnicas sorológicas e dos critérios diagnósticos empregados em cada estudo. Dentre familiares especificamente, se encontra o maior número de indivíduos sem definição diagnóstica se utilizarmos os critérios de diagnóstico vigentes na atualidade (BONAMICO et al, 2006; ESTEVE et al, 2006). Para melhor compreender esse fato, é necessário conhecer de que forma se delimita o diagnóstico da DC na atualidade.

2.3. Diagnóstico da doença celíaca

Nenhum exame isolado é capaz de determinar o diagnóstico de DC (FARRE et al, 1999). Uma combinação entre a clínica, sorologia e achados histológicos tem sido utilizada de diversas formas para esse propósito (HILL et al, 2005).

2.3.1 Critérios de diagnóstico

A DC foi descrita pela primeira vez no século XIX por Samuel Gee, mas a sua relação com o glúten só foi descoberta na década de 1940 por Dicke. Anos depois, com o desenvolvimento da cápsula de biopsia, evidenciou-se a presença da enteropatia e desde então, a sua demonstração é fundamental para o diagnóstico da DC (AURICCHIO; TRONCONE, 2008).

O primeiro critério de diagnóstico de DC, denominado *de Interlaken*, foi elaborado, em 1970, no segundo simpósio de doença celíaca da Sociedade Europeia de Gastroenterologia e Nutrição. Conforme estabelecido então, o achado de atrofia vilositária na biopsia com recuperação da mucosa e melhora clínica após dois anos de dieta sem glúten e reaparecimento da atrofia depois de nova exposição a essa proteína indicava o diagnóstico de DC. A terceira biopsia era realizada três a seis meses após a ingestão de, no mínimo, 10

gramas de glúten ao dia. Ao todo, eram necessários, no mínimo, 30 meses de acompanhamento para definição do diagnóstico (MEEUWISSE, 1970).

Em 1990, após o surgimento dos testes sorológicos, a ESPGHAN publicou novo consenso, vigente até hoje, em que dispensava biopsias subseqüentes, para os indivíduos com atrofia vilositária (Marsh III), sorologia positiva e melhora clínica após a retirada do glúten da dieta. As exceções eram: crianças menores de dois anos, em países em desenvolvimento, pacientes assintomáticos no diagnóstico e quando o resultado da biopsia inicial era duvidoso (WALKER-SMITH et al, 1990).

As apresentações clínica e histológica dos indivíduos diagnosticados por sorologia são extremamente variáveis (BOTTARO et al, 1999; VIVAS et al, 2008). Por esse motivo, naquele momento, surgiram novas diretrizes para situações especiais (MURDOCK; JOHNSTON, 2005, NIH, 2005). Em 2005, a Sociedade Norte-Americana de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica (NASPGHAN) publicou sua orientação para diagnóstico de DC (HILL et al, 2005).

Nesse documento, a NASPGHAN reforça a necessidade de biopsia para diagnóstico embora considerando já o grau II de Marsh associado à sorologia positiva como fortemente indicativo de DC, recomenda a triagem de grupos de risco com a tTG-IgA e sugere o uso dos marcadores HLA DQ2 e DQ8 para elucidação diagnóstica nos casos em que houver dúvidas, situação frequente entre os grupos de risco para DC.

Em 2009, novo consenso na Inglaterra sugere que a genotipagem do HLA deva ser utilizada apenas em situações especiais e por especialistas, devido à dificuldade na sua interpretação (NICE, 2009). Além disso, é possível que, tanto os genes HLA quanto a clínica, sejam variáveis entre os grupos de indivíduos, populações e regiões do mundo e que os consensos de diagnóstico devam ser específicos para cada um desses.

Nesse sentido, serão discutidos a seguir os aspectos clínicos, sorológicos e histológicos da DC, assim como os marcadores genéticos e sua variabilidade dentre os grupos etários e populacionais.

2.3.2. Aspectos clínicos do diagnóstico de Doença Celíaca

A DC é extremamente variável na sua expressão clínica (LEBENTHAL; SHTEYER; BRANSKI, 2008). A maioria dos pacientes celíacos tem formas pouco sintomáticas ou são assintomáticos (BOTTARO et al, 1999; BEATTIE, 2006). Apesar de em crianças observar-se uma maior correlação entre a intensidade dos sintomas e o grau de lesão histológica (SAVAS et al, 2007), é comum o achado de pacientes adultos pouco sintomáticos ou sem sintomas e com alterações histológicas consideráveis (MARSH; CROWE, 1995; VIVAS et al, 2008).

As formas de apresentação da DC são classificadas didaticamente em: gastrointestinal, não gastrointestinal e assintomática (NICE, 2009). Os sintomas gastrointestinais podem variar desde a forma clássica com diarreia, perda de peso e distensão abdominal descrita por Samuel Gee até formas ditas oligossintomáticas, tais como náuseas ocasionais, flatulência e sensação de empachamento (USAI et al, 2007), ou apenas se manifestar como constipação (SHAHBAZKHAN et al, 2003). Os sinais, sintomas e condições mórbidas não relacionados ao trato gastrointestinal estão descritos no quadro 4.

Quadro 4: Sinais e sintomas não gastrointestinais e condições associadas à doença celíaca.

Sinais e sintomas não gastrointestinais	Alopecia Amenorreia Anorexia Fadiga crônica Irritabilidade Aftas de repetição
Condições associadas à doença celíaca	Anemia Infertilidade Miocardite autoimune Neuropatia crônica Osteoporose Tireoidite Epilepsia Aumento de transaminases Baixa estatura Defeito no esmalte dentário Depressão/ desordem bipolar Dermatite herpetiforme Diabetes tipo I Enxaqueca

RaviKumara, Tutthill e Jenkins (2006) revisaram os relatos dos sintomas de crianças, que haviam sido diagnosticados entre os anos de 1999 e 2004, e compararam com aqueles que foram diagnosticados nas duas últimas décadas em Cardiff, País de Gales. Dentre os pacientes diagnosticados há duas décadas, 90% tinham sintomas gastrointestinais, comparados com apenas 42% dos diagnosticados nos últimos cinco anos. Os sinais e sintomas não gastrointestinais desse grupo eram predominantemente úlceras orais, anemia por carência de ferro e baixa estatura. Essa pesquisa reflete a mudança de conhecimento acerca da DC nesse período e também a realidade dos casos diagnosticados agora por triagem sorológica, que representaram 26% dos diagnósticos nesse grupo no período mais recente.

A DC é uma doença polimórfica com sintomas originados em todos os sistemas. Existe um número imenso de estudos, demonstrando a associação da DC com sintomas variados conforme os descritos no quadro 4 (BOTTARO et al, 1999; SALMI et al, 2006; SAVAS et al, 2007; USAI et al, 2007; VIVAS et al, 2008; LURZ et al, 2009). Todavia, como a DC é muito prevalente e a maior parte dos estudos clínicos foi feita sem grupo controle, é possível que a associação entre a DC e alguns sintomas e condições mórbidas seja apenas uma coincidência, pela alta frequência das duas condições na população geral.

Nesse sentido, em 2009, o National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE, 2009) da Inglaterra revisou os estudos clínicos recentes em DC e publicou recomendação sugerindo as situações clínicas em que estaria indicada a triagem sorológica. As gastrointestinais são: diarreia recorrente, dispepsia e síndrome do intestino irritável. Dentre os pacientes com síndrome do intestino irritável 12% tiveram diagnóstico de DC quando pesquisados (SHAHBAZKHAN et al, 2003; BOTTARO et al, 1999, GARAMPAZZI et al, 2007) assim como, de 10 a 40% dos pacientes com dispepsia (EMAMI et al, 2008). Segundo esse consenso, dentre os pacientes com sintomas e condições não gastrointestinais os que têm indicação de submeter-se à sorologia são os portadores de: anemia por carência de ferro, baixa estatura, fadiga crônica e osteopenia (NICE, 2009). Doze a 40% dos pacientes portadores de anemia por carência de ferro tiveram diagnóstico de DC nos diversos estudos (BOTTARO et al, 1999; EMAMI ET AL, 2008), assim como 20 a 30% daqueles com baixa estatura (BOTTARO et al, 1993; BOTTARO et al, 1999), 8% com fadiga crônica e 6% dos adultos com osteopenia (VILPPULA et al, 2008).

Outro aspecto importante da DC é que as manifestações clínicas variam com a idade (LUDVIGSSON et al, 2004). Dentre as crianças predominam as formas gastrointestinais, os sintomas são mais acentuados, ocorre comprometimento nutricional mais frequentemente e as formas assintomáticas são mais raras. Nos adultos predominam os sintomas não gastrointestinais e condições associadas, tais como, osteoporose, anemia e fadiga crônica (VIVAS et al, 2008). Uma das teorias para explicar essa mudança com a idade é que a área de intestino acometida é compensada em parte pelo segmento de intestino não acometido pela DC, com o crescimento intestinal ocorreria uma hipertrofia funcional do intestino saudável (MARSH; CROWE, 1995). Essa compensação depende de fatores genéticos, imunológicos e condições ambientais próprias de cada indivíduo (CATASSI; YACCHA, 2008). Outra teoria seria que diferentes gatilhos ambientais poderiam modificar a apresentação fenotípica da DC tanto na infância quanto na vida adulta (VIVAS et al, 2008).

Nos países em desenvolvimento, no entanto, em população geral ainda predominam as formas gastrointestinais, com 90 a 100% dos pacientes apresentando diarreia e sinais de má-absorção no momento do diagnóstico (BHATNAGAR et al, 2005; PODDAR; THAPA; SINGH, 2006; SAVAS et al, 2007; ABU-ZEKRY et al, 2008). Na Índia, em 2003, foram avaliadas 549 crianças com suspeita de DC, por meio de EMA e/ou tTG e biopsia.

Dentre as 300, que tiveram o diagnóstico de DC, 251(84%) apresentavam diarreia, 274 (91%) desnutrição e 144 (48%) distensão abdominal. Embora predominassem entre os pacientes celíacos, no grupo controle de 210 crianças esses sintomas foram também muito frequentes (PODDAR; THAPA; SINGH, 2006). A presença de outras condições com sintomas semelhantes a DC e a alta exposição a agressores ambientais em população de baixa renda pode estar relacionada a esses achados (CATALDO; MONTALTO, 2007).

A idade do diagnóstico de DC é mais elevada nos países em desenvolvimento (PODDAR et al, 2002; PODDAR; THAPA; SINGH, 2006, ABU- ZEKRY et al, 2008) quando comparada com países desenvolvidos (LUDVIGSSON et al, 2004). Alguns autores acreditam que a suspeição para DC ainda é baixa dentre os profissionais de saúde desses países, pela dificuldade de diagnóstico diferencial da DC com as infecções intestinais, tuberculose, parasitoses e a enteropatia ambiental muito prevalente nessas áreas. Nessas circunstâncias, nos países em desenvolvimento os testes sorológicos seriam fundamentais para o diagnóstico da DC (PODDAR; THAPA; SINGH, 2006; ABU- ZEKRY et al, 2008; CATALDO; MONTALTO, 2007).

A ocorrência de indivíduos assintomáticos ou pouco sintomáticos entre os familiares portadores de DC é muito frequente. No estudo de Gudjónsdóttir et al (2004), na Suécia e Dinamarca, dos catorze novos casos diagnosticados (entre 271 familiares de pacientes celíacos), nove eram assintomáticos e, apenas três apresentavam sintomas digestivos. Também foi encontrada uma frequência elevada de assintomáticos nos familiares estudados na Espanha (onze assintomáticos em 29 casos novos) (FARRÉ et al, 1999) e na Itália (45% de assintomáticos) (BONAMICO et al, 2006). Por esse motivo atualmente é consenso que esses indivíduos se beneficiam da triagem sorológica mesmo quando assintomáticos (HILL et al, 2005; NICE, 2009).

2.3.3 Testes sorológicos

Os testes sorológicos para DC se baseiam no conhecimento que nessa doença são produzidos anticorpos contra proteínas da matriz extracelular e que esses anticorpos

podem ser encontrados no sangue (VALDER et al, 2002; KAGNOFF, 2007). Dietrich et al (1997) demonstraram que a enzima transglutaminase tecidual é o principal antígeno contra o qual os auto-anticorpos eram produzidos na DC. A tTG é uma enzima sintetizada por várias células, mas normalmente é mantida no compartimento intracelular. A tTG é liberada em situações de agressão tecidual, pois atua na reparação dos tecidos e na síntese do colágeno, induzindo a diferenciação das células intestinais epiteliais (DIETERICH et al, 1998).

Na DC, a tTG exerce o papel de modificar os peptídeos de glúten em moléculas reconhecidas pelos linfócitos T, após a sua ligação às células de apresentação de antígenos na submucosa intestinal (KAGNOFF, 2007). Embora a transglutaminase seja na realidade um antígeno localizado no interior do endomíseo (DIETERICH et al, 1997), quando se compara a acurácia das sorologias específicas para tTG e EMA encontram-se diferenças na sensibilidade e na especificidade dos dois testes (REEVES et al, 2006). Essa diferença é explicada pela forma em que o antígeno é exposto em cada técnica (SULKANEN et al, 1998).

O EMA é realizado por imunofluorescência indireta, com esôfago de macaco ou cordão umbilical humano como substrato. A acurácia da técnica é semelhante para os dois substratos. (KOTZE et al, 2001; LASAGNI; FERRARI; LAPINI, 2006). Esse teste, por suas características, é mais elaborado, demorado e caro do que a tTG, que é feita pela técnica da ELISA (BIAGI et al, 2001). A especificidade do EMA varia de 80% a 100% em crianças e de 99% a 100% em adultos (LANDISER; ROSSIPAL; PITTSCHIELER, 1994; VALDIMARSSON et al, 1996). E a sua sensibilidade é menor em crianças mais novas que dois anos de idade do que em adultos e crianças mais velhas (BURGIN-WOLF et al 1991).

A positividade do EMA, ainda, varia proporcionalmente ao grau de lesão do intestino (ROSTAMI et al, 1999; OZGENC et al, 2003; ABRAMS et al, 2004). Em pacientes mais sintomáticos e com atrofia total de vilosidades, a sensibilidade do EMA é próxima a 100%, enquanto que naqueles com sintomatologia menos acentuada e alterações menores de biopsia, a positividade do EMA varia entre 31% e 45%. Esse fato limita a utilização do exame como procedimento de triagem (ROSTAMI et al, 1999; OZGENC et al, 2003, ESTEVE et al, 2006).

A decisão de qual teste utilizar como triagem ainda permanece controversa (ARMSTRONG; ROBINS; HOWDLE, 2009). Em estudo multicêntrico realizado na

Austrália foram avaliados pacientes com sintomas digestivos sugestivos de DC e as técnicas de tTG fração IgA isolada, com tTG IgA+IgG; combinação da tTG com anticorpo antigliadina (AGA) IgA e IgG; e EMA com a biopsia de intestino delgado foram comparadas entre si. Além disso, foram avaliados diversos Kits comercialmente disponíveis. A tTG IgA foi superior ao EMA como triagem para DC, embora houvesse uma variação nos diversos Kits testados. Os autores sugerem que o tTG IgA positivo é suficiente para indicar a biopsia de intestino delgado, em indivíduos sintomáticos, dispensando a realização do EMA (REEVES et al, 2006).

Salmi et al (2006) estudaram 22 pacientes celíacos com EMA negativo e IgA sérica normal (definidos como celíacos pela presença de IgA antitransglutaminase positivo em mucosa de intestino delgado), comparando-os a 155 pacientes celíacos com EMA positivo e 20 controles com outras doenças intestinais, avaliaram os achados histológicos e clínicos nesses pacientes. Os autores encontraram que os indivíduos celíacos com EMA negativa eram mais velhos, tinham sintomas digestivos mais pronunciados, morfologia intestinal semelhante, porém menor número de linfócitos intraepiteliais. Todos os pacientes celíacos com EMA negativo apresentavam IgA antitransglutaminase positivo em mucosa e 3/22 casos evoluíram para linfoma do intestino delgado.

É consenso que tanto a tTG quanto o EMA falham na monitorização de adesão a dieta sem glúten, após o diagnóstico da DC (LUDVIGSSON; BRANDT; MONTGOMERY, 2009). Nessa situação, aparentemente os questionários aplicados por nutricionistas experientes são mais eficazes do que os testes sorológico, incluindo a pesquisa do anticorpo antigliadina (AGA) tradicionalmente utilizado para esse propósito (ARMSTRONG; ROBINS; HOWDLE, 2009). Uma nova geração de testes sorológicos foi desenvolvida para detectar peptídeos homólogos da gliadina deaminada (AGA-d) com alta sensibilidade e especificidade para o acompanhamento de pacientes com DC. Quando comparados com a tTG, o AGA-d é detectado mais precocemente após a nova exposição ao glúten e permanece por mais tempo em circulação, o que seria vantajoso para o acompanhamento em longo prazo da adesão à dieta (LIU et al, 2007).

Pela sua alta sensibilidade e baixo custo, a tTG é recomendada como teste de triagem pela maioria dos autores (CHAN et al, 2001). No entanto, são frequentes as descrições de indivíduos com tTG positivo e sem alterações de mucosa (BONAMICO et al,

2006; ESTEVE et al, 2006; GROOVER et al, 2007; ABU-ZECKRY et al, 2008). Apesar da alta especificidade da tTG, alguns estudos sugerem que ela possa ser falsamente positiva em doenças autoimunes e infecciosas (CROVELLA et al, 2007; SARDY et al, 2007). Do mesmo modo, podem acontecer pacientes com tTG sérica negativa e sintomas de DC e depósitos de tTG na mucosa do intestino (ESTEVE et al, 2006; SALMI et al, 2006). Esse achado seria mais precoce do que a presença de anticorpos no sangue (TOSCO et al, 2008). Um dos fatores, que pode influenciar a sensibilidade da tTG, é a idade. Os títulos de tTG são maiores em pacientes mais velhos (VÉCSEI et al, 2009).

Embora os testes sorológicos sejam muito específicos, a evidência de lesão inflamatória na biopsia do intestino ainda permanece indispensável o diagnóstico da DC (WALKER-SMITH et al, 1990; ARMSTRONG; ROBINS; HOWDLE, 2009). Todavia a avaliação da histologia da mucosa do intestino delgado sofre influência de diversos fatores, como discutíramos a seguir.

2.3.4 Histologia do intestino delgado

O achado de atrofia das vilosidades intestinais ainda é considerado o mais característico da DC. A enteropatia induzida pelo glúten, no entanto, pode variar entre graus diferentes e aparentemente progressivos de alterações na mucosa (ROSTAMI et al, 1999). Em 1992, Marsh descreveu as alterações histológicas próprias da doença celíaca, criando a classificação que é utilizada desde então. Segundo Marsh, as alterações histológicas são classificadas em tipo I (infiltrado linfocitário, predominantemente de linfócitos $\gamma\delta$), tipo II (infiltrado linfocitário com hiperplasia de criptas) e tipo III (as alterações citadas anteriormente e atrofia vilositária) (MARSH, 1992).

A inflamação intestinal induzida pelo glúten desencadeia alterações em células da mucosa tais como: aumento do número de linfócitos intraepiteliais - acima de 30 linfócitos por 100 enterócitos (MARSH; MILLER, 1985), aumento no índice mitótico dos linfócitos acima de 0.2%, diminuição da altura das células epiteliais (modificando-se de colunar para cuboide e, posteriormente, epitélio plano), perda da polaridade nuclear das células epiteliais, diminuição das células *globo* e da borda em escova; e na sua estrutura - alongamento das criptas, atrofia parcial ou total das vilosidades e diminuição da proporção vilosidade: cripta

para menor do que 1:1 (FREEMAN, 2004; GOLDSTEIN, 2004; ARMSTRONG; ROBINS; HOWDLE, 2009).

As alterações nos linfócitos intraepiteliais são mais precoces e desaparecem antes das alterações estruturais de criptas e vilosidades. A contagem dos linfócitos intraepiteliais é de grande utilidade nos casos em que a histologia é de difícil interpretação e um valor acima de 30 linfócitos para cada 100 enterócitos é considerado alterado (FERGUSSON; MURRAY, 1971).

Classicamente a biopsia de intestino delgado (BID) era realizada pela cápsula de Crosby. Atualmente, a endoscopia digestiva alta (EDA) tem sido mais utilizada para esse procedimento. As amostras coletadas pela endoscopia são comparáveis às da cápsula de biopsia, em crianças e adultos (BRANSKI et al, 1998). As vantagens da EDA são a possibilidade de retirar múltiplos fragmentos e visualizar a área a ser biopsiada.

As lesões da DC costumam ser focais (MARSH; CROWE, 1995). Alterações como espessamento de pregas e edema na mucosa do duodeno, visualizadas durante a EDA, sugerem a localização de onde devem ser retirados os fragmentos e aumentam a acurácia do exame (VJERO et al, 2003). Três ou quatro amostras do duodeno distal costumam ser suficientes para a análise histológica (BONAMICO et al, 2006). Recentemente, tem sido sugerido uma técnica para visualizar a região duodenal em imersão de água durante a EDA a fim de localizar a região a ser biopsiada. Essa técnica de biopsia aumentaria a sensibilidade do exame histopatológico para a demonstração de atrofia vilositária (CAMMAROTA et al, 2009).

Pacientes portadores de lesões mínimas de mucosa intestinal com sorologia e marcadores genéticos de HLA positivos podem apresentar resposta clínica, histológica e sorológica à dieta de isenção (KAUKINEN et al, 2001; REEVES et al, 2006; MOHAMED et al, 2008). Tursi & Brandimarte (2003) estudaram 35 adultos com sintomas digestivos cujas biopsias intestinais evidenciavam lesões inflamatórias tipo I (onze pacientes) e tipo II (24 pacientes). Todos apresentaram desaparecimento dos sintomas após oito meses a um ano de dieta e 80% tiveram recuperação histológica no mesmo período (TURSI; BRANDIMARTE, 2003).

Após a retirada do glúten da dieta, crianças normalizam a arquitetura vilositária em período de até um ano, embora os sintomas geralmente melhorem em poucas semanas (UIL et al, 1996). Aparentemente, as crianças normalizam a biopsia mais rapidamente do que os adultos (LANZINI et al, 2005). Contudo, em pacientes com alterações menores de mucosa é difícil avaliar essa resposta.

Em familiares, a ausência de atrofia vilositária em pacientes com sorologia positiva é frequente. Esteve et al, na Espanha (2006), estudaram a relação entre quadro clínico e alterações histológicas em familiares e encontraram correlação entre a gravidade da clínica e o grau de atrofia vilositária. Mesmo assim, 45% dos pacientes com atrofia vilositária nesse grupo eram assintomáticos. Esses autores chamam a atenção para a alta ocorrência de anemia e osteopenia em todos os graus de alteração histológica, inclusive em pacientes cujo único achado na mucosa intestinal era a presença de anticorpos antitransglutaminase locais.

Em países em desenvolvimento, o achado de alterações mínimas em biopsia é muito frequente. Em crianças indianas com diarreia crônica e sorologia positiva para o EMA, cerca de 50% das biopsias de intestino delgado não demonstraram atrofia vilositária e sim alterações mínimas e moderadas na mucosa (BHATNAGAR et al, 2005). No Egito, sete de quinze pacientes com sorologia positiva para tTG tinham alterações mínimas de mucosa (ABU-ZECKRY et al, 2007). Dados semelhantes foram encontrados na Turquia (SAVAS et al, 2007) e têm levantado a necessidade de rever os critérios de diagnóstico da DC nessas populações (CATALDO; MONTALTO, 2009).

Essas dificuldades no diagnóstico de familiares e em países em desenvolvimento são enfocadas nos últimos consensos de diagnóstico de DC. No seu “*Guideline*” (2005) a NASPGHAN sugere o uso da genotipagem do HLA para complementar o diagnóstico nas situações de dúvida. Outros autores corroboram essa conduta (CHANG; GREEN, 2009). No *Guideline* mais recente da Inglaterra de 2009, a genotipagem também é sugerida, mas como situação de exceção e sua interpretação não é especificada (NICE, 2009). As genotipagens dos HLA DQ2 e DQ8 foram descritas inicialmente em pacientes celíacos da Europa e a sua distribuição nas diversas regiões do mundo pode ser variável como se discutirá a seguir.

2.3.5 Genotipagem dos marcadores HLA DQ2 e DQ8

A susceptibilidade a DC é em parte determinada por uma associação comum com o sistema HLA (FERNANDES et al, 2003). Genes localizados no cromossomo 6 e codificadores da série DQ do HLA classe II, mais especificamente do HLA DQ2 (codificado pelos alelos DQA₁*0501 e DQB₁*0201) e DQ8 (codificado pelos alelos DQA₁*0301 e DQB₁*0302) estão fortemente relacionados ao desencadeamento da DC (SOLLID et al, 1989; KAUKINEN et al, 2002; VAN HEEL et al, 2005). Estes genes codificam dímeros na superfície das células apresentadoras de antígenos da submucosa intestinal. Os antígenos alimentares se ligam às moléculas HLA, formando complexos HLA-antígeno, reconhecidos pelos linfócitos T CD4 e, desencadeando a resposta inflamatória na mucosa intestinal (LUNDIN et al, 1993; KAGNOFF, 2007; HUNT; VAN HEEL, 2009). No caso da DC, está demonstrado que a gliadina modificada pela tTG tem alta afinidade pelas moléculas do HLA tipo DQ2 e menor pelas DQ8 (CONGIA et al, 1994; SOLLID, 2000; MAZARELLA, 2003).

O sistema HLA é um dos mais polimórficos existentes. São conhecidos mais de 1500 alelos e eles são herdados em codominância e, portanto são transmitidos diretamente entre as gerações (KLEIN; SATO, 2000). A DC tem perfil de herança poligênica com os genes HLA DQ2 e DQ8 como componente essencial, porém outros genes HLA e não HLA também estão envolvidos (SOLLID, 2000; LOUKA; SOLLID, 2003).

A homozigose dos alelos do HLA DQ2 pode estar associada com o início mais precoce e formas mais graves da DC (ZUBILLAGA et al, 2002). Kaukinen et al (2002), na Finlândia, encontraram que em 59 pacientes com alterações mínimas do intestino delgado e sorologia tTG positiva, a frequência dos alelos do HLA DQ2 e DQ8 (63%) era menor do que aquela observada nos indivíduos com atrofia vilositária total (95-98%). Todavia, todos os indivíduos com EMA positiva (cuja especificidade para DC é maior) foram positivos para os HLA DQ2 e DQ8.

Muitos estudos europeus encontraram os HLA DQ2 e DQ8 em mais de 95% dos pacientes celíacos, conferindo a esses marcadores genéticos uma sensibilidade elevada para a presença da doença (FERNANDEZ-ARQUERO et al, 1995; LIU et al, 2002; KARREL et al, 2003; MAKI et al, 2003). Contudo, 20 a 30% da população geral e até 60% dos familiares de primeiro grau de pacientes celíacos possuem esses genótipos de HLA (MAKI et

al, 2003; ESTEVE et al, 2006; BUTTERWORTH; IQBAL; COOPER, 2005), o que diminuiria o valor preditivo positivo e a especificidade desse exame. Embora, de forma genérica, a genotipagem HLA determine o perfil de autoimunidade individual e a predisposição para doenças específicas (FERNANDES et al, 2003), é possível que o comportamento desses genes seja diferente em grupos raciais distintos. Isso ocorre porque o sistema HLA é extremamente variável entre as populações (POLVI et al, 1998, HOLLENBACH et al, 2001, NIGAN et al, 2004).

Butterworth, Iqbal & Cooper (2005), na Inglaterra, compararam as formas de apresentação clínica e marcadores genéticos em pacientes celíacos de diferentes grupos étnicos (sul-asiáticos e ingleses), residentes na cidade de Birmingham. Nos pacientes ingleses, o genótipo HLA DQ2 foi significativamente mais frequente (97,2%) do que nos sul-asiáticos (83,3%). Esses autores evidenciaram também que as formas de apresentação clínica eram mais graves e o início da doença mais precoce predominaram entre os pacientes sul-asiáticos. Existe uma teoria, ainda em discussão, de que o perfil HLA pode determinar a forma de apresentação clínica da DC. Além disso, é possível que hábitos alimentares, distintos nos dois grupos estejam também interferindo no tipo e gravidade dos sintomas (BUTTERWORTH; IQBAL; COOPER, 2005).

Dentre os estudos realizados em populações da América do Norte, destacamos dois por seu maior grau de importância. No primeiro deles, Johnson et al (2004) acompanharam pacientes portadores de DC em Paris e Nova York e observaram diferenças quanto às formas de apresentação clínica e histológica (menos graves nos pacientes americanos) e na genotipagem entre os dois grupos. O HLA DQ2 foi menos frequente entre os americanos do que nos parisienses (59 e 79%, respectivamente) e o HLA DQ8 teve comportamento inverso e estando presente em 41% dos americanos e 21% dos franceses (JOHNSON et al, 2004). No segundo, Fasano et al (2003) encontraram que 25% de 98 pacientes celíacos eram portadores do HLA DQ8 e 16% sem o DQ2.

Como já citado anteriormente, na América do Sul, Araya et al (2000) estudaram pacientes celíacos chilenos de origem ameríndia e encontraram o genótipo DQ8 em 37% desses indivíduos, frequência muito mais elevada do que a registrada na Europa. Estes resultados foram explicados pelos autores como efeito da miscigenação das tribos Mapuche, originárias da América com os espanhóis, formadora do povo chileno. Porém outra

possibilidade é que esse genótipo seja realmente mais frequente nos primeiros habitantes que povoaram as Américas, como evidenciado em estudos genéticos realizados nas tribos ameríndias do Canadá (primeira região povoada das Américas) e assim explique a frequência mais elevada do HLA DQ8 dentre os pacientes celíacos desse continente (MONSALVE; EDIN; DEVINE, 1998).

Finalmente, embora escassos, os estudos iniciais realizados nas Américas sugerem uma distribuição dos genes HLA DQ diferente da encontrada na Europa. Esse fato pode ter sua explicação na origem da população americana, diferente da europeia. É possível ainda, que esse perfil genético característico, um padrão alimentar diferente do europeu e outros fatores ambientais específicos dessa região determinem formas de apresentação clínicas distintas e características dessa população.

2.4 Considerações finais

O desencadeamento da doença celíaca é dependente da interação de fatores genéticos e ambientais. Sua distribuição geográfica depende da frequência desses fatores em cada região habitada do mundo. Os familiares amplificam a frequência da doença porque compartilham a susceptibilidade genética e os fatores desencadeantes ambientais com os pacientes. Por isso, a família é um grupo considerado de risco para o desenvolvimento da DC.

Dentre familiares, o uso da sorologia como primeiro passo da investigação, independentemente da presença de sintomas, descortina uma realidade clínica e histológica, que remete ao *iceberg* celíaco, descrito por Maki. Nesses indivíduos, a sintomatologia é menos específica e a histologia variável. Ou seja, o grupo, que está sob maior risco da doença, também é o que apresenta maiores dificuldades no diagnóstico. Pelas limitações no conhecimento, os critérios utilizados na atualidade não contemplam todos os pacientes com suspeita de DC. Nesse sentido, os novos estudos objetivam avaliar outros marcadores do diagnóstico.

A sugestão do uso da genotipagem do HLA DQ2 e DQ8 se apoia no fato de que eles têm uma função chave nos mecanismos fisiopatogênicos da DC e que em estudos europeus foram encontrados em, no mínimo, 95% dos pacientes celíacos. Contudo, os estudos em populações não europeias são escassos.

Os mecanismos determinantes das doenças de modo geral são complexos e interligados. Na doença celíaca especialmente, a variabilidade imensa da clínica nos sugere que os mecanismos fisiopatogênicos sejam altamente complexos. Embora inicialmente os conhecimentos descrevessem que o HLA DQ2 é a molécula com maior capacidade de ligação com a gliadina e que o DQ8 também tem essa capacidade, novos estudos já demonstram que existem pacientes celíacos sem os genes codificadores dessas moléculas.

No continente americano, em virtude de características peculiares de sua história e condições ambientais, o perfil dos HLA DQ2 e DQ8 parece ser diferente do que é descrito na Europa. Nos estudos genéticos iniciais de HLA em DC realizados nas Américas, registrou-se maior frequência do HLA DQ8 do que fora descrito anteriormente em populações europeias.

No Brasil, especificamente, além das diferenças populacionais existe a questão ambiental que, ao tempo em que predispõe ao desenvolvimento da doença, dificulta o seu reconhecimento. Nesse contexto, o conhecimento acerca dos marcadores HLA em diferentes regiões do mundo é fundamental para avaliar a viabilidade de sua utilização para o diagnóstico da DC, assim como, permitir melhor entendimento dos mecanismos fisiopatogênicos implicados no seu desencadeamento nas diversas populações.

2.5 Referências

1. ABRAMS, J. A. et al. Seronegative celiac disease: Increased prevalence with lesser degree of villous atrophy. **Dig Dis Sci**, v. 49, n. 4, p. 546-550, Apr. 2004.
2. ABU-ZEKRY, M. et al. Prevalence of celiac disease in Egyptian children disputes the east-west agriculture-dependent spread of the disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 47, n. 2, p. 136-140, Aug. 2008.

3. ACCOMANDO, S.; CATALDO F. The global village of celiac disease. **Dig Liver Dis**, v. 36, n. 7, p. 492-498, 2004.
4. ALMEIDA, P. L. et al. Prevalence of celiac disease among first degree relatives of brazilian celiac patients. **Arq Gastroenterol**, v. 45, n. 1, p. 69-72, Jan./Mar. 2008.
5. ARAUJO, J.; SILVA, G. A. P.; MELO, F. M. de. Soroprevalência da doença celíaca em crianças e adolescentes com diabetes melito tipo1. **J Pediatr**, v. 82, n. 3, p. 210-214, may/june 2006.
6. ARAYA, M. et al. Celiac Disease in a Chilean Population Carrying Amerindians Traits. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 31, n. 4, p. 381-386, Oct. 2000.
7. ARMSTRONG, M. J.; ROBINS, G. G.; HOWDLE, P. D. Recents advances in coeliac disease. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 25, n. 2, p. 100-109, Mar. 2009.
8. ASCHER, H. et al. Influence of Infant feeding and gluten intake on celiac disease. **Arch Dis Child**, v. 76, n. 2, p. 113-117, Feb. 1997.
9. AURICCHIO, R.; TRONCONE, R. Diagnosis of celiac disease . In: FASANO, A.; TRONCONE, R.; BRANSKI, D. R., (Eds). **Frontiers in Celiac Disease. Pediatric Adolesc Med. Basel**, Karger, v. 12, p. 23-31, 2008.
10. BEATTIE, R. M. The changing face of coeliac disease. **Arch Dis Child**, v. 91, n. 12, p. 955-956, 2006.
11. BHATNAGAR, S. et al. Celiac disease with mild to moderate histologic changes is a common cause of cronic diarrhea in Indian children. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 41, n. 2, p. 204-209, 2005.
12. **BIAGI, F. et al. Endomysial and tissue transglutaminase antibodies in celiac sera: a comparison not influenced by previous serological testing. Scand J Gastroenterol, v. 36, n. 9, p. 955-958, Sep. 2001.**
13. BONAMICO, M. et al. Serologic and genetic markers of celiac disease: a sequential study in the screening of first degree relatives. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 42, n. 2, p. 150-154, Feb. 2006.

14. BOTTARO, G. et al. The clinical pattern of subclinical/silent celiac disease: an analysis on 1026 consecutive cases. **Am J Gastroenterol**, v. 94, n. 3, p. 691-696, Mar. 1999.
15. **BOTTARO, G. et al. Changes in coeliac disease behavior over the years. Acta Paediatrica, v. 82, n. 6-7, p. 566-568, Jun./Jul. 1993.**
16. BRANDT, K. G.; SILVA, G. A. P. da. Soroprevalência da doença celíaca em ambulatório pediátrico no Nordeste do Brasil. **Arq Gastroenterol**, v. 45, n. 3, p. 239-242, Jul./Set. 2008.
17. **BRANSKI, D. et al. Histological evaluation of endoscopic versus suction biopsies of small intestinal mucosal in children with and without celiac disease. J Pediatr Gastroenterol Nutr, v. 27, n. 1, p. 6-11, Jul. 1998.**
18. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. **II pesquisa de prevalência de aleitamento materno nas capitais brasileiras e Distrito Federal.** Brasília. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.
19. BRASIL. Ministério do planejamento. **Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003: Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil.** Rio de Janeiro: IBGE, 2004.
20. BURGIN-WOLFF, A. et al. Antigliadin and antiendomysium antibody determination for celiac disease. **Arch Dis Child**, v. 66, n. 8, p. 941-947, Aug. 1991.
21. BUTTERWORTH, J.R.; IQBAL, T. H.; COOPER, B. T. Celiac disease in South Asians resident in Britain: comparison with with Caucasian celiac patients. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, n. 5, p. 541-545, May. 2005.
22. CAMMAROTA, G. et al. Water-immersion technique during standard upper endoscopy may be useful to drive the biopsy sampling of duodenal mucosa n children with celiac disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 49, n. 4, p. 411-416, 2009.
23. CATALDO, F.; MONTALTO, G. Celiac disease in the developing countries: A new and challenging public health problem. **World J Gastroenterol**, v. 13, n. 15, p. 2153-2159, Apr. 2007.
24. CATASSI, C; YACHHA, S. K. The global village of celiac disease. In: FASANO, A.; TRONCONE, R.; BRANSKI, D. (Eds). **Frontiers in Celiac Disease. Pediatric Adolesc Med. Basel, Karger**, v. 12, p. 23-31, 2008.

25. CATASSI, C. Where is celiac disease coming from and why. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 40, p. 279-282, 2006.
26. CATASSI, C. et al. High prevalence of undiagnosed coeliac disease in 5280 Italian students screened by anti gliadin antibodies. **Acta Paediatr**, v. 84, n. 6, p. 672-676, Jun. 1995.
27. **CHAN, A. W. et al. Tissue transglutaminase enzyme-linked immunosorbent assay as a screening test for celiac disease in pediatric patients. Pediatrics**, v. 107, n. 1, p. 8 – 12, 2001.
28. CHANG, M.; GREEN, P. H. Genetic testing before serologic screening in relatives of patients with celiac disease as a cost containment method. **J Clin Gastroenterol**, v. 43, p. 43-50, 2009.
29. CINTALDO, A. et al. HLA DQA1*0501 and DQB1*02 in Cuban celiac patients. **Human Immunol**, v. 67, n. 8, p. 639-642, Aug. 2006.
30. **COLLIN, P. et al. Endocrinological disorders and celiac disease. Endocr Rev**, v. 23, n. 4, p. 464-483, Aug. 2002.
31. **CONGIA, M. et al. A gene dosage effect of the DQA1*0501/DQB1*0201 allelic combination influences the clinical heterogeneity of celiac disease. H Immunol**, v. 40, n. 2, p. 138-142, Jun. 1994.
32. **CROVELLA, S. et al. Speeding up coeliac disease diagnosis in the developing countries. Dig Liver Dis**, v. 39, n. 10, p. 900-902, Oct. 2007.
33. **DIETERICH, W. et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. Nat Méd**, v. 3, n. 7, p. 797-801, Jul. 1997.
34. **DIETERICH, W. et al. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. Gastroenterol**, v. 115, n. 6, p. 1317-21, Dec. 1998.

35. DUBÉ, C. et al. The Prevalence of celiac disease in average risk and at-risk Western European populations: a systematic review. **Gastroenterology**, v. 128, p. 57-67, Apr. 2005. Supplement.
36. EMAMI, M. H. et al. Diagnostic accuracy of IgA anti-tissue transglutaminase in patients suspected of having coeliac disease in Iran. **J Gastroint Liver Dis**, v. 17, n. 2, p. 141–146, Jun. 2008.
37. ESTEVE, M. et al. Spectrun of glúten-sensitive enteropathy in first-degree relatives of patients with celiac disease: clinical relevance of lymphocytic enteritis. **Gut.**, v. 55, n. 12, p. 1739-1745, 2006.
38. FARRÉ, C. et al. Serological Markers and HLA-DQ2 Haplotype among first-degree relatives of celiac patients. **Dig Dis Sci.**, v. 44, n. 11, p. 2344-2349, Nov. 1999.
39. **FARREL, R. J.; KELLY, C. P. Celiac Spure. N Engl J Med., V. 346, n. 3, p. 180-188, Jan. 2002.**
40. FASANO, A. 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.**, v. 163, n. 3, p. 286–292, Feb. 2003.
41. **FERGUSON, A.; MURRAY, D. Quantification of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. Gut., v. 12, n. 12, p. 988-994, Dec. 1971.**
42. **FERNANDES, A. P. M. et al. Como entender a associação entre o sistema HLA e as doenças auto-imunes endócrinas. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, São Paulo, v. 47, n. 5, p. 601- 611, Oct. 2003.**
43. FERNANDEZ-ARQUERO, M. et al. HLA-Linked Genes Acting As Additive Susceptibility Factors in Celiac Disease. **Hum Immunol.**, v. 42, n. 4, p. 295-300, Apr. 1995.
44. **FREEMAN, H. J. Adult celiac disease and the severe “flat” small bowell biopsy lesion. Dig Dis Sci, v. 49, n. 4, p. 535-545, Apr. 2004.**

45. GANDOLFI, L. et al. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. **Am J Gastroenterol.**, v. 95, n. 3, p. 689-692, Mar. 2000.
46. GARAMPAZZI, A. et al. Clinical pattern of celiac disease is still changing. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 45, n. 5, p. 611–614, Nov. 2007.
47. **GOLDSTEIN, N. S. Non-gluten sensitivity-related small bowel villous flattening with increased intraepithelial lymphocytes: not all that flattens is celiac sprue.** *Am J Clin Pathol.*, v. 121, n. 4, p. 546- 550, Apr. 2004.
48. GROOVER, R. et al. Familial prevalence among first-degree relatives of celiac disease in North India. **Dig Liver Dis**, v. 39, n. 10. p. 903-907, Oct. 2007.
49. GUANDALINI, S. Historical perspective of celiac disease. In: FASANO, A.; TRONCONE, R.; BRANSKI, D. (Eds). *Frontiers in Celiac Disease. Pediatric Adolesc Med. Basel*, Karger, v. 12, p. 23-31, 2008.
50. GUDJÓNSDÓTTIR, A. H. et al. The risk of celiac disease in 107 families with at least two affected sibilings. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 38, n. 3, p. 338 – 342, Mar. 2004.
51. HASHEMI, J. et al. Prevalence of celiac disease in Iranian Children with idiopatic short stature. **World J Gastroenterol**, v. 14, n. 48, p. 7376-7380, Dec. 2008.
52. HILL, I. D. 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**, v. 40, n. 1, p. 1-19, Jan. 2005.
53. HOGBERG, L. et al. Familial prevalence of celiac disease: a twenty-year follow-up study. **Scand J Gastroenterol.**, v. 38, n. 1, p. 61-65, Jan. 2003.
54. HOLLENBACH, J. A. et al. HLA Diversity, Differentiation and Haplotype evolution in Mesoamerican Natives. **Human Immunology**, v. 62, n. 4, p. 378–390, Apr. 2001.
55. HUNT, K. A.; VAN HEEL, D. A. Recent advances in coeliac disease genetics. **Gut**, v. 58, n. 4, p. 473-476, Apr. 2009.

56. IVARSSON, A. The Swedish epidemic of coeliac disease explored using an epidemiological approach- some lessons to be learnt. **Best Pract Reserc clin Gastroenterol**, v. 19, n. 3, p. 425-440, 2005.
57. JIANG, L. L.; ZHANG, B. L.; LIU, Y. S. Is adult celiac disease really uncommon in Chinese? **J Zhejiang Univ Sci B**, v. 10, n. 3, p. 168-171, Mar. 2009.
58. **JOHNSON, T. C. et al. Relationship of HLA-DQ8 and severity of celiac disease: comparison of New York and Parisian cohorts.** *Clin Gastroenterol Hepatol.*, v. 2, n. 10, p. 888-894, Oct. 2004..
59. KAGNOFF, M. F. Celiac disease: Pathogenesis of a model immunogenetic disease. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 41-49, Jan. 2007.
60. KARREL, K. et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02(DQ2) heterodímero: results from the european genetics cluster on celiac disease. **Human Immunol**, v. 64, p. 469-77, 2003.
61. KAUKINEN, K. et al. Celiac disease without villous atrophy. Revision of criteria called for. **Dig Dis Sci.**, v. 46, n. 4, p. 879-887, Apr. 2001.
62. **KAUKINEN, K. et al. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease.** *Am J Gastroenterol*, v. 97, n. 3, p. 695- 699, Mar 2002.
63. **KLEIN, J.; SATO, A. Advances in Immunology; The HLA system (first of two parts).** *N Eng J Med*, v. 343, p. 702- 709, 2000.
64. KOTZE, L. M. da S. et al. Antiendomysium antibodies in brazilian patients with celiac disease and their first-degree relatives. **Arq Gastroenterol**, v. 38, n. 2, p. 94-103, abr./jun. 2001.
65. **LANDISER, B.; ROSSIPAL, E.; PITTSCHIELER, K. Endomysial antibodies incoeliac disease: an improved method.** *Gut*, v. 35, n. 6, p. 776-778, Jun. 1994.
66. LANZINI, A. et al. Epidemiological, clinical and Histopathologic characteristics of celiac disease: results of a case-finding population-based program in a Italian community. **Scand J Gastroenterol**, v. 40, n. 8, p. 950-957, Aug. 2005.

67. LASAGNI, D.; FERRARI, R.; LAPINI, M. Unmasking anti-endomysia antibodies in coeliac subjects positive for anti-smooth muscle antibodies. **Acta Paediatr**, v. 88, n. 4, p. 462- 464, Dec. 2006.
68. LEBENTHAL, E.; SHTEYER, E.; BRANSKI, D. The changing clinical presentation of celiac disease. In: FASANO, A.; TRONCONE, R.; BRANSKI, D. (Eds): *Frontiers in Celiac Disease*. **Pediatric Adolesc Med. Basel**, Karger, v. 12, p. 23-31, 2008.
69. LIU, E. et al. Natural history of Antibodies to deaminated gliadin peptides and transglutaminase in early childhood celiac disease. **J Paediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 45, n. 3, p. 293-300, Sep. 2007..
70. LOUKA, A. S.; SOLLID, L. M. HLA in coeliac disease: Unraveling the complex genetics of a complex disorder. **Tissue Antigens**, v. 61, n. 2, p. 105-117, Feb. 2003.
71. LUDVIGSSON, J. F. et al. Symptoms and signs have changed in Swedish children with coeliac disease. **J Paediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 38, n. 2, p. 181-186, Feb. 2004.
72. LUDVIGSSON, J. F.; BRANDT, L.; MONTGOMERY, S. M. Symptoms and signs in individuals with serology positive for celiac disease but normal mucosa. **BMC Gastroenterol**, v. 9, n. 57, Jul. 2009.
73. LUNDIN, K. E. et al. Gliadin-specific, HLA DQ (alpha1*0501, beta1*0201) restrict T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. **J Exp Med**, v. 178, p. 187-196, 1993.
74. LURZ, E. et al. Clinical presentation of celiac disease and the diagnostic accuracy of serological markers in children. **Eur J Paediatr.**, v. 168, n. 7, p. 839-845, Jul. 2009.
75. MAKI, M.; COLLIN, P. Coeliac disease. **Lancet**, v. 349, n. 9067, p. 1755-1759, Jun. 1997.
76. MAKI, M. et al. Prevalence of Celiac disease among children in Finland. **N Engl J Med.**, v. 348, n. 25, p. 2517-2524, Jun. 2003.
77. MARSH, M. N.; CROWE, P. T. Morphology of the mucosal lesion in gluten sensitivity. **Balliers Clin Gastroenterol.**, v. 9, n. 2, p. 273-293, Jun. 1995.

78. **MARSH, M. N.; MILLER, V. Studies of intestinal lymphoid tissue. VIII. Use of epithelial lymphocyte mitotic indices in differentiating untreated celiac sprue mucosa from other childhood enteropathies.** J Pediatr Gastroenterol Nutr., v. 4, n. 6, p. 931-935, Dec. 1985.
79. **MARSH, M. N. Gluten, Major histocompatibility complex, and the small intestine: a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue').** Gastroenterology., v. 102, n. 1, p. 330 – 354, Jan. 1992.
80. MAZZARELLA, G. An Immunodominant DQ8 restricted gliadin peptide activates small intestinal immune response in vitro cultured mucosa from HLA-DQ8 positive but not HLA-DQ8 negative coeliac patients. **Gut.**, v. 52, n. 1, p. 7-8, Jan. 2003.
81. MELO, S. B. et al. Prevalence and Demographic Characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brasil. **Dig Dis Sci.**, v. 51, n. 5, p. 1020-1025, May. 2006.
82. **MEEUWISSE, G. W. Diagnostic criteria in coeliac disease.** Acta Paediatr Scand., V. 59, 1970.
83. MOHAMED, B. M. et al. The absence of a mucosal lesion on standard histological examination does not exclude diagnosis of celiac disease. **Dig Dis Sci**, v. 53, n. 1, p. 52-61, Jan. 2008.
84. **MONSALVE, M. V.; EDIN, G.; DEVINE, D. V. Analysis of HLA Class I and Class II in Na-Dene and Amerindian population from British Columbia, Canada.** Human Immunology, v. 59, n. 1, p. 48-55, Jan. 1998.
85. MOURA, A. C. **Soroprevalência de doença celíaca em adolescentes e adultos jovens da cidade do Recife.** 2009. Dissertação (Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente) Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2009.
86. **MURDOCK, A. M.; JOHNSTON, S. D. Diagnostic criteria for coeliac disease: time for change?** Eur J Gastroenterol Hepatol, v. 17, n. 1, p. 41-43, Jan. 2005.
87. **MYLEUS, A. et al. Celiac disease revealed in 3% of Swedish 12-year-olds born during an epidemic.** J Pediatr Gastroenterol Nutr, v. 49, n. 2, p. 170-176, 2009.

88. NICE. National Institute for Health and Clinical Excellence - Clinical guideline 86. **Celiac disease: Recognition and assessment of coeliac disease.** May 2009.
89. NIGAM, P. et al. Polymorphism of HLA class I genes in the Brazilian population from the Northeastern State of Pernambuco corroborates anthropological evidence of its origin. **Tissue Antigens**, v. 64, n. 2, p. 204-209, Aug. 2004.
90. NIH consensus development conference on celiac disease, June 28-30, 2004. **Gastroenterol**, v. 128, 2005.
91. NORRIS, J. M. et al. Risk of celiac disease autoimmunity and Timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. **JAMA**, v. 293, n. 19, p. 2343-2350, May. 2005.
92. OLIVEIRA, R. P. et al. High Prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 19, n. 1, p. 43-49, Jan. 2007.
93. **OZGENC, F. et al. Association between anti-endomysial antibody and total intestinal villous atrophy in children with celiac disease. J Postgraduate Med, v. 49, n. 1, p. 21-24, Jan./Mar. 2003.**
94. PARHAM, P. et al. Episodic evolution and turnover of HLA in the indigenous human populations of the Americas. **Tissue Antigens**, v. 50, n. 3, p. 219-232, Sep. 1997.
95. PARRA, F. et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. **PNAS**, v. 100, n. 1, p. 177-182, Jan. 2003.
96. PEREZ-BRAVO, F. et al. Genetic Differences in HLA-DQA1* and DQB1* Allelic Distributions Between Celiac And Control Children in Santiago Chile. **Human Immunology**, v. 60, n. 3, p. 262-267, Mar. 1999.
97. PODDAR, U. et al. Celiac Disease in India: Are True cases of celiac disease? **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 35, n. 4, p. 508-512, Oct. 2002.

98. PODDAR, U.; THAPA, B. R.; SINGH, K. Clinical features of celiac disease in Indian children: Are They different from the west? **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 43, n. 3, p. 313-317, 2006.
99. POLVI, A. et al. HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. **Human Immunol.**, v. 59, n. 3, p. 169-175, Mar. 1998.
100. RAVIKUMARA, M.; TUTHILL, D. P.; JENKINS, H. R. The changing clinical presentation of celiac disease. **Arc Dis child**, v. 91, n. 12, p. 969-971, Dec. 2006.
101. REEVES, G. E. et al. Diagnostic accuracy of celiac serological tests; a prospective study. **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, v. 18, n. 5, p. 493-501, May. 2006.
102. ROBINSON, D. C. et al. Incidence of small-intestinal mucosal abnormalities and of clinical coeliac disease in the relatives of children with coeliac disease. **Gut**, v. 12, n. 10, p. 789-793, Oct. 1971.
103. ROSTAMI, K et al. Sensitivity of antiendomysium and antigliadin antibodies in untreated celiac disease: disappointing in clinical practice. **Am J Gastroenterol.**, v. 94, n. 4, p. 888-894, Apr. 1999.
104. ROSTAMI, K. et al. Should relatives of coeliac with mild clinical complaints undergo a small-bowel biopsy despite negative serology? **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 12, n. 1 p. 51-55, Jan. 2000.
105. RUBIO-TAPIA, A. et al. Predictors of family risk for celiac disease: a population-based study. **Clin Gastroenterol Hepatol**, v. 6, n. 9, p. 983-987, Sep. 2008.
106. SALMI, T. T. et al. Endomysial antibody- negative celiac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. **Gut.**, v. 55, n. 12, p. 1746-1753, Dec. 2006.
107. SANTOS, F. R. et al. The central Siberian origin for Native American Y chromosomes. **Am J Hum Genet.**, v. 64, n. 2, p. 619-628, Feb. 1999.
108. SÁRDY, M. et al. Tissue transglutaminase ELISA positivity in autoimmune disease independent of gluten-sensitive disease. **Clin Chim Acta**, v. 376, n. 1-2, p. 126-135, Feb. 2007.

109. SAVAS, N. et al. Correlation of clinical and histopathological with endoscopic findings of celiac disease in the Turkish population. *Dig Dis Sci*, v. 52, n. 5, p. 1299-1303, May. 2007.
110. SHAHBAZKHANI, B. et al. Celiac disease presenting with symptoms of irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*, v. 18, n. 2, p. 231-235, Jul. 2003.
111. SOLLID, L. M. et al. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ α/β heterodimer. *J Exp Med*, v. 169, p. 345-350, Jan. 1989.
112. SOLLID, L. M. Molecular Basis of celiac disease. *Annu Rev Immunol.*, v. 18, p. 53-81, 2000.
113. SULKANEN, S. et al. Tissue Transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology*, v. 115, p. 1322-1328, 1998.
114. TOSCO, A. et al. Immunoglobulin A anti-tissue transglutaminase antibody deposits in the small intestinal mucosa of children with no villous atrophy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, v. 47, n. 3, p. 293-298, Sep. 2008.
115. TURSI, A.; BRANDIMARTE, G. The symptomatic and Histologic Response to a Gluten-Free diet in patients with borderline enteropathy. *J Clin Gastroenterol.*, v. 36, n. 1, p. 13-17, Jan. 2003.
116. UIL, J. J. et al. Follow-up of treated celiac patients: sugar absorption test and intestinal biopsy compared. *Eur J Gastroenterol Hepatol.*, v. 8, n. 3, p. 219-223, Mar. 1996.
117. USAI, P. et al. Effect of gluten-free diet and co-morbidity of irritable bowel syndrome-type symptoms on health-related quality of life in adult coeliac patients. *Dig Liv Dis*, v. 39, n. 9, p. 824-828, Sep. 2007.
118. VALDER, L. W. et al. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med*, v. 195, n. 5, p. 643-649, Mar. 2002.
119. VALDIMARSSON, T. et al. Is small bowel biopsy necessary in adults with suspected celiac disease and IgA anti-endomysium antibodies? 100% positive predictive value for celiac disease in adults. *Dig Dis Sci.*, v. 41, n. 1, p. 83-87, Jan. 1996.

120. VAN HEEL, D. A. et al. Genetics in celiac disease. **B Prat Res Cin Gastroenterol**, v. 19, p. 323-339, 2005.
121. VÉCSEI, A. et al. Influence of Age and Genetic Risk on Anti-tissue Transglutaminase IgA Titers. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 48, n. 5, p. 544-549, May. 2009.
122. VILPPULA, A. et al. Undetected coeliac disease in the elderly: a biopsy-proven population-based study. **Dig Liver Dis**, v. 40, n. 10, p. 809–813, Oct. 2008.
123. VIVAS, S. et al. Age-related clinical serological, and histopathological features of celiac disease. **Am J Gastroenterol**, v. 103, n. 9, p. 2360-2365, Sep. 2008.
124. VJERO, K. et al. Defining a proper setting for endoscopy in celiac disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol.**, v. 15, n. 6, p. 675-678, Jun. 2003.
125. WALKER-SMITH, J. A. et al. Revised criteria on the diagnosis of celiac disease. Report of working group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. **ArCh Dis Child**, v. 65, n. 8, p. 909-911, Aug. 1990.
126. WEILLE, B. et al. Striking differences in the incidence of childhood celiac disease between Denmark and Sweden: A plausible explanation. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 21, n. 1, p. 64-68, 1995.
127. WHITACKER, F. C. et al. Prevalência e aspectos clínicos da associação de Diabetes melito tipo 1 e doença celíaca. **Arq Brás Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 52, n. 4, p. 635-641, 2008.
128. ZUBILLAGA, P. et al. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genetic markers and clinical presentation in celiac disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 34, n. 5, p. 548-554, May. 2002.

3 - MÉTODO



3 – Método

3.1 Aspectos gerais:

3.1.1 Desenho do estudo

Estudo descritivo, com componente analítico, envolvendo um grupo de casos e outro de comparação que constou de duas fases: a primeira planejada para definição dos casos e grupo de comparação e a segunda para avaliação da associação entre variáveis.

3.1.2 Local e período

O estudo foi realizado nos ambulatórios de gastroenterologia infantil do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC-UFPE), ambos situados na cidade do Recife, que atuam nas áreas de assistência, ensino e pesquisa e atendem populações carentes da região. Pacientes oriundos de clínica privada foram incluídos no estudo, contudo durante a pesquisa foram atendidos em um dos dois serviços acima.

O recrutamento dos casos foi realizado de maio de 2007 a maio de 2008. A coleta dos dados foi realizada de agosto de 2007 a julho de 2009.

3.1.3 População

Familiares de primeiro grau de crianças e adolescentes portadores de doença celíaca recrutados nos ambulatórios de gastroenterologia infantil do IMIP, do HC-UFPE, do Hospital da Restauração (HR) do Recife e clínicas privadas de gastroenterologia infantil, pediatria e endocrinologia da cidade do Recife. Das 66 famílias, que participaram dessa pesquisa, 46 (70%) eram provenientes dos hospitais públicos e 20 (30%) de clínicas privadas.

3.1.4 Estimativa do tamanho amostral

O tamanho amostral foi calculado objetivando a análise da associação dos HLA DQ2 e DQ8 com a DC, utilizando a calculadora Statcalc do pacote estatístico EPI-INFO, segundo a fórmula proposta para estudo do tipo caso-controle, de acordo com os seguintes parâmetros:

- Nível de confiança de 95% e poder de 80%;
- Frequências dos HLA DQ2 e DQ8 de 58% no grupo de comparação, conforme os dados de Esteve et al (2006) e de 83% nos casos, conforme os dados de Butterworth, Iqbal e Cooper (2005);
- Proporção de um caso para três no grupo de comparação.

Adotando esses critérios, a amostra foi prevista para 160 indivíduos, sendo 40 casos e 120 no grupo de comparação. Ao término da pesquisa, 73 casos e 126 controles familiares haviam sido incluídos na análise.

3.2 Critérios de inclusão dos casos e do grupo de comparação

3.2.1 Casos

Foram considerados *casos* os portadores de doença celíaca, incluindo os *casos-índice* e os *novos casos* identificados dentre os familiares de primeiro grau desses pacientes.

Sendo:

- *Casos-índice*: portadores de doença celíaca acompanhados nos ambulatórios que preenchiam um dos critérios abaixo:
 1. Biopsia de intestino delgado com sinais de atrofia vilositária em vigência de dieta com glúten, seguida de normalização do padrão da biopsia após dois anos (no mínimo) de dieta de isenção de glúten e nova biopsia alterada após três a seis meses da reintrodução do glúten na dieta.
 2. Sorologia positiva para anticorpo antitransglutaminase humana (tTG) ou antiendomíseo (EMA) acompanhada de biopsia de intestino delgado

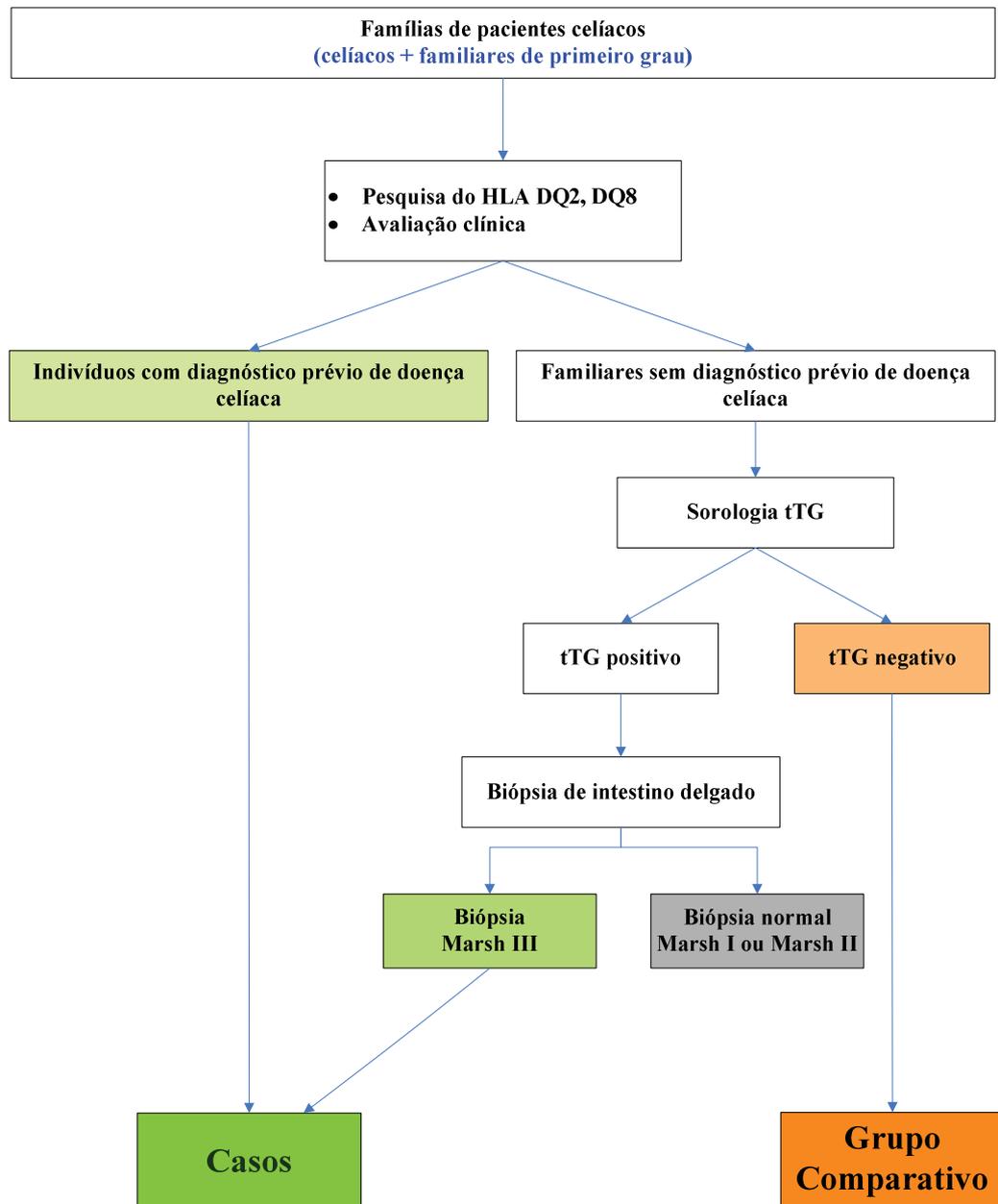
com sinais de atrofia vilositária (Tipo III da classificação de Marsh) [MARSH, 1992].

- *Casos novos*, os familiares maiores do que 18 meses que apresentaram sorologia positiva para o tTG e biopsia com sinais de atrofia vilositária.

3.2.2 Grupo de comparação

Foi considerado pertencente ao grupo de comparação, o familiar em primeiro grau de paciente com DC, maior de 18 meses, cuja sorologia foi negativa para o tTG, em consumo de glúten.

O fluxograma demonstrando a distribuição dos sujeitos da pesquisa encontra-se na figura 1.



HLA: antígeno de histocompatibilidade tecidual linfocitária

tTG: anticorpo antitransglutaminase

Figura 1: Fluxograma da pesquisa

3.3 Aspectos éticos

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Materno Infantil Fernando Figueira – IMIP, sob o número 893, no dia 10 de novembro de 2006 e cumpriu as determinações da Declaração de Helsinque [WORLD MEDICAL ASSOCIATION, 1997] e normas da resolução 196 do Conselho Nacional de Saúde.

As famílias participantes foram esclarecidas verbalmente sobre os objetivos, operacionalização e os aspectos éticos da pesquisa. Em seguida, um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de cada participante da pesquisa (ANEXO C).

A coleta de sangue para os exames foi realizada com o máximo de cuidado para não causar sofrimento desnecessário. Apenas os pacientes com sorologia positiva para DC foram submetidos à endoscopia digestiva para biopsia intestinal, sendo que nesses casos existe indicação clínica formal para tais procedimentos [HILL et al, 2005].

Os familiares diagnosticados como portadores de doença celíaca e os que tiveram ao menos uma sorologia positiva sem diagnóstico definido pela biopsia estão em acompanhamento pela pesquisadora e outra médica especialista em gastropediatria, no Ambulatório de Gastroenterologia Infantil do IMIP.

3.4 Operacionalização

3.4.1 Recrutamento

A pesquisadora solicitou aos médicos responsáveis os dados dos pacientes portadores de doença celíaca acompanhados nos ambulatórios de Gastroenterologia Infantil do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC), Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e Hospital da Restauração (HR), assim como, de ambulatórios privados de gastroenterologia infantil da cidade do Recife.

Foram identificados 135 pacientes (*casos-índice*) no período e as respectivas famílias contatadas por telefone e por carta (APÊNDICE C); foram convidadas a comparecer ao ambulatório de pediatria do HC ou do IMIP em data previamente marcada, conforme sua conveniência. Setenta e uma famílias atenderam ao convite e destas 66 foram incluídas. Cinco

famílias foram excluídas porque tinham um caso-índice que não preenchia os critérios de diagnóstico adotados no estudo.

3.4.2 Coleta de Dados

A equipe de coleta era composta pela pesquisadora, por um biólogo e por uma aluna do curso de Medicina, bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) do CNPq.

A pesquisadora aferiu as medidas do peso e estatura, preencheu os formulários clínicos e identificou os tubos para coleta de sangue de todos os participantes. A coleta de sangue foi realizada pelo biólogo auxiliado pela aluna, que também foi responsável pelo armazenamento dos tubos em recipiente térmico para transporte.

3.4.3 Identificação

Os participantes da pesquisa foram identificados por um número composto por sete dígitos, que eram codificados da seguinte forma:

- Três primeiros dígitos: número de identificação do paciente no banco de dados
- Quarto, quinto e sexto dígitos: número da família
- Sétimo dígito: parentesco (0 – caso-índice, 1 – pai, 2 - mãe e 3 – irmão).

Os tubos de coleta eram identificados com os três primeiros números e o nome de cada participante. Os formulários da pesquisa eram identificados com o número completo. A codificação completa era conhecida apenas pela pesquisadora.

3.4.4 Coleta, transporte e armazenamento do sangue

Os participantes foram submetidos à punção venosa e coleta de cinco ml de sangue. Para esse procedimento utilizou-se agulha e tubo para coleta por sistema de vácuo. Três ml foram coletados em tubo seco e dois ml em tubo com anticoagulante ácido etilendiamino tetra acético (EDTA), sendo os tubos armazenados em caixas térmicas e

transportados pela equipe até o laboratório de virologia do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) da UFPE, no fim de cada turno de coleta.

No laboratório, os tubos com anticoagulante foram encaminhados para o processo de extração do DNA e os tubos sem anticoagulante foram centrifugados e o soro obtido armazenado em Ependorf. Os tubos de Ependorf com soro foram novamente identificados, classificados em caixas numeradas e armazenados a - 18° C em Freezer da pesquisa alocado no LIKA. Esse procedimento foi realizado pela aluna e supervisionado pelos biólogos do laboratório. Semanalmente, a pesquisadora conferia as amostras armazenadas com a lista de coleta do período.

Após o término da coleta de sangue, o soro armazenado e congelado foi transportado para o Laboratório Marcelo Magalhães onde foram realizadas as primeiras sorologias para tTG e posteriormente para o Laboratório de Imunologia do IMIP onde essas sorologias foram repetidas

3.5 Avaliação clínica

A avaliação clínica constou de medidas do peso, da estatura e pesquisa de sintomas e condições associadas à doença celíaca.

O peso em kilogramas, a estatura em centímetros e o índice de massa corporal (IMC) foram classificados em percentis segundo as curvas do CDC, 2002 [KUCZMARSKI et al, 2002], utilizando o programa *Nutrition* do pacote EPIINFO, 2000.

Um formulário com perguntas fechadas foi elaborado para pesquisar sintomas e condições associadas à doença celíaca. Os sintomas pesquisados foram perda de peso, sintomas gastrointestinais (náusea, vômito, dor abdominal, diarreia, empachamento, distensão abdominal, flatulência e constipação) e não gastrointestinais (aftas, dor articular, fadiga, irritabilidade, insônia, alopecia e dermatite). Também foram pesquisadas condições associadas (anemia, tireoidite, diabetes tipo I, doenças reumatológicas, osteoporose, convulsões, depressão, dermatite herpetiforme, síndrome de Down e nefropatia crônica).

Foram considerados apenas os sintomas crônicos. Para os sintomas gastrointestinais utilizou-se o Critério de Roma III para definição de cronicidade [TACK et al,

2006]. Para os sintomas não gastrointestinais, considerou-se crônico o sintoma que ocorreu mais de três vezes nos últimos três meses. O formulário da avaliação clínica encontra-se no APÊNDICE D.

Para os casos-índice, foi preenchido um segundo formulário com informações sobre o diagnóstico, tais como: idade, peso, estatura e sintomas no momento do diagnóstico; resultados dos exames sorológicos; número das lâminas, data e resultado(s) da(s) biopsia(s); data de início da dieta sem glúten e densitometria óssea. O formulário de caso-índice encontra-se no APÊNDICE E.

3.6 Laboratório

3.6.1 Pesquisa do anticorpo antitransglutaminase tecidual humana (tTG)

Pesquisou-se o tTG da classe IgA, por meio da técnica Imunoenzimática (ELISA), com Kit comercialmente disponível (Immulisa anti-hu IgA – IMMCO Diagnostics, Buffalo, NY USA). As reações sorológicas foram realizadas no Laboratório Marcelo Magalhães e repetidas no laboratório de Imunologia do IMIP. O soro estocado era descongelado e juntamente com os componentes do Kit mantidos em temperatura ambiente (20-26°) por 30 minutos antes de se iniciar a reação. Procedeu-se à diluição do soro de 1:51, à pipetagem de 110µl da solução em cada poço da micro placa, incubação, lavagem e leitura, segundo as orientações do fabricante

As reações foram realizadas por biólogas experientes na técnica de ELISA, utilizando sistemas automatizados de pipetagem, lavagem e leitura. Considerou-se positivo o paciente que apresentava as duas reações com valor do tTG ≥ 25 UI (ponto de corte estabelecido pelo fabricante).

3.6.2 Genotipagem

O DNA genômico foi extraído de dois ml de sangue total por meio de Kit comercialmente disponível. (Wizard® Genomic DNA Purification - Promega, Madison, USA), seguindo os protocolos padrão. O material obtido desse processo foi identificado e estocado em caixas numeradas a – 20°C no laboratório de virologia do LIKA. Esse procedimento era realizado até 48 horas após a coleta por biólogos desse laboratório. E os tubos congelados também conferidos semanalmente pela pesquisadora.

A genotipagem dos HLA DQ2 (alelos A1*05 e DQB1*02) e DQ8 (alelo B1*0302) foi realizada por amplificação da PCR com sequência de primers-específicos, utilizando Kit comercialmente disponível (EU-DQ Eurospital, Trieste-Italia). Também foi identificado o alelo A1*0201. A detecção dos produtos da PCR foi realizada por visualização em luz ultravioleta em gel de agarose a 2%. Os haplótipos do HLA identificados foram conferidos por meio do Kit PCR-SSP, comercialmente disponível (AllSet -Dynal, BIOTECH.S.A, Oslo, Noruega).

3.6.3 Biopsia de intestino delgado

Os 35 familiares com tTG positiva foram convidados a se submeterem à biopsia de intestino delgado, por meio de endoscopia digestiva alta (EDA), coletando-se quatro a seis fragmentos de mucosa em bulbo e duodeno distal. Os fragmentos foram fixados em solução de formol a 10%, incluídos em parafina, cortados e corados pela hematoxilina-eosina.

As alterações encontradas na BID foram classificadas segundo o critério de Marsh para diagnóstico de doença celíaca em Graus I, II e III segundo os critérios de Marsh (1992). O quadro 1 descreve essa classificação.

Quadro 1: Classificação de Marsh para diagnóstico histológico de doença celíaca [MARSH, 1992].

Marsh 0	Mucosa normal
Marsh I	Lesão infiltrativa. As vilosidades do epitélio estão infiltradas por linfócitos intraepiteliais (> 30 linfócitos/100 enterócitos). Arquitetura normal.
Marsh II	Lesão hiperplásica. Criptas alargadas e infiltradas por linfócitos intraepiteliais
Marsh III	Lesão destrutiva. Sinais de atrofia vilositária (diminuição da altura das vilosidades abaixo da proporção de 1: 1 no comprimento vilosidade/cripta). Infiltrado de linfócitos intraepiteliais.

3.7 Variáveis do estudo

As variáveis do estudo foram classificadas em: de caracterização da amostra, de definição dos casos/grupo de comparação e de análise. A lista de variáveis está descrita no quadro 2.

Quadro 2: Descrição das variáveis do estudo

Tipo	Nome (codificação no banco de dados)	Definição	Categorização	Resultados permitidos
De caracterização da amostra	Sexo (sexo)	Auto-explicativa	Qualitativa, dicotômica	Masculino (1) Feminino (2)
	Idade (idade)	Idade em meses no momento da inclusão no estudo	Quantitativa, discreta	≥18 meses
	Família (fam)	Número da família a que o indivíduo pertence	Quantitativa, discreta	> 0
	Tipo de parentesco (parente)	Relação de parentesco biológico com o caso índice do estudo	Qualitativa, nominal	Caso índice (0) Pai (1) Mãe (2) Irmão (3)
Definidoras de casos e do grupo de comparação	Anticorpo antitransglutaminase (tTG)	Resultado da sorologia tTG, após coleta do sangue. Utilizará o ponto de corte recomendado pelo fabricante = 25U/l	Qualitativa, dicotômica	Negativo (0) Positivo (1)
	Biópsia de intestino delgado (BID)	Resultado da avaliação dos patologistas das lâminas de biópsia do intestino delgado coletadas pela endoscopia e classificadas conforme as alterações descritas na classificação de Marsh para diagnóstico da Doença Celíaca.	Categórica, nominal	Tipo 0 (0) Tipo I (1) Tipo II (2) Tipo III (3)

Tipo	Nome (codificação no banco de dados)	Definição	Categorização	Resultados permitidos
De análise	Percentil do peso (ppeso)	Peso em kilogramas classificado segundo a curva do CDC, 2000	Quantitativa, discreta	0 a 100
	Percentil da estatura (pest)	Estatura em centímetros, classificada segundo a curva do CDC, 2000	Quantitativa, discreta	0 a100
	Percentil do Índice de Massa Corporal (pIMC)	Razão do peso pelo quadrado da estatura, Classificado segundo a curva do CDC, 2000	Quantitativa, discreta	0 a100
	Anticorpo antitransglutaminase (tTG)	Resultado da sorologia tTG, O ponto de corte recomendado pelo fabricante = 25UI/l	Qualitativa, dicotômica	Negativo (0) Positivo (1)
	HLA (HLA)	Resultado da genotipagem para pesquisa dos alelos A1*05, B1*02 e. B1*0302	Qualitativa, categórica.	Ausente (0) Presente (1)
	Alelos (A1*05, A1*05, B1*02 e. B1*0302)	Resultado da genotipagem para pesquisa dos alelos A1*05, B1*02 e. B1*0302	Qualitativa, dicotômica.	Ausente (0) Presente (1)
	HLA DQ2 E DQ8 HLA	Presença ou ausência dos alelos DQB1*0302, DQB1*02 e DQA1*05.	Qualitativa, dicotômica.	A1*05 e B1*02 (2) B1*0302 (8) A1*05 e B1*02 e B1*0302 (28) Ausente (0)

Tipo	Nome (codificação no banco de dados)	Definição	Categorização	Resultados permitidos
De análise	Perda de peso (perdpeso)	Autoexplicativa	Qualitativa, dicotômica	Ausente (0) Presente (1)
	Gastrointestinais (gastrint)	Resposta ao formulário de pesquisa da presença ou ausência das seguintes condições: Náusea Vômito Dor abdominal Diarréia Empachamento Distensão abdominal Flatulência Constipação	Qualitativas, dicotômicas	Ausente (0) Presente (1)
	Não gastrointestinais (ngastrint)	Resposta ao formulário de pesquisa da presença ou ausência das seguintes condições: Aftas Dor articular Astenia, fadiga Irritabilidade Insônia Alopécia Dermatite	Qualitativas, dicotômicas	Ausente (0) Presente (1)
	Condições associadas (conda)	Resposta ao formulário de pesquisa da presença ou ausência das seguintes condições: Anemia Tireoidite Diabetes Osteoporose Epilepsia Depressão Doenças reumatológicas Dermatite Herpetiforme Síndrome de Down Nefropatia crônica	Qualitativas, dicotômicas	Ausente (0) Presente (1)

3.8 Banco de dados

Os dados foram armazenados no banco de dados do pacote estatístico EPIINFO 6.04. A digitação dos dados foi feita pela pesquisadora e os mesmos foram checados pelo programa VALIDATE do EPIINFO.

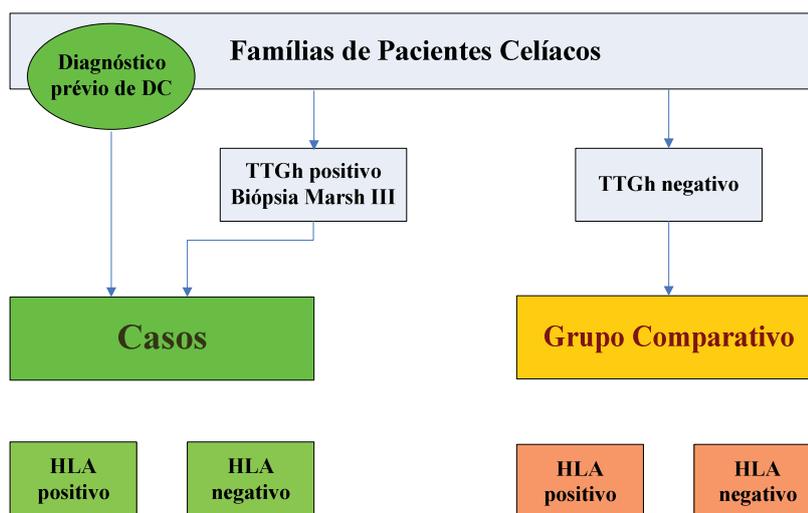
3.9 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram expressas por média e desvio padrão ou mediana e quartis, e as qualitativas, em proporções. As diferenças de frequências e a associação entre as variáveis qualitativas foram testadas pelo teste do qui-quadrado ou exato de Fisher. O nível de significância estatístico adotado nos testes foi de 5%.

3.9.1 Plano de análise:

A Figura 2 demonstra o planejamento da análise estatística com o objetivo de comparar as frequências dos genótipos DQ2 e DQ8 entre os grupos de pacientes e familiares não acometidos por DC.

Figura 2: Plano de análise principal da pesquisa



3.10 Financiamento

Essa pesquisa recebeu financiamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-Brasil). O processo está registrado sob o número 475120/2006-2.

3.10.1 Prestação de contas

Categoria	Data	Discriminação	Valor em Reais
Material de consumo	02/07/2007	Material de coleta	223,03
	19/07/2007	Kits para extração do DNA	262,69
	12/09/2007	Material de coleta	198,35
	12/09/2007	Papelaria	109,18
	08/10/2007	Kits para sorologia	2.138,00
	18/03/2008	Kit para extração de DNA	550,00
	06/05/2008	Kit de sorologia	800,00
	05/09/2008	Kit sorologia	3.072,00
	26/09/2008	Kit sorologia	1.536,00
	11/12/2008	Material de laboratório	3.864,70
Material permanente	10/07/2007	Freezer	2.000,00
	04/12/2008	Termociclador	16.800,00
	04/12/2008	Centrifuga Minispin	3.500,00
	04/12/2008	pHmetro digital	1.553,00
	04/12/2008	Agitador tipo Vortex	1.000,00
Total	-	-	37.606,95

3.11 Referências

1. BUTTERWORTH, J. R.; IQBAL, T. H.; COOPER, B.T. Coeliac disease in South Asians resident in Britain: comparison with Caucasian coeliac patients. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, n. 5, p. 541-545, May 2005.
2. ESTEVE, M. et al. Spectrum of gluten-sensitive enteropathy in first-degree relatives of patients with celiac disease: clinical relevance of lymphocytic enteritis. **Gut**, v. 55, p. 1739-1745, May 2006.
3. HILL, I. D. 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**, v. 40, n. 1, p. 1-19, 2005.
4. KUCZMARSKI, R. J. et al. 2000 CDC growth charts for the United States: Methods and development. **Vital Health Stat**, v. 246, May 2002.
5. MARSH, M. N. Gluten, Major histocompatibility complex, and the small intestine: a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). **Gastroenterology**, v. 102, n. 1, p. 330-354, 1992.
6. TACK, J. et al. Functional gastroduodenal disorders. **Gastroenterol**, v. 130, p. 1466-1479, 2006.
7. WORLD MEDICAL ASSOCIATION. Declaration of Helsinki: Recommendation guiding physicians in biomedical research involving human's subjects. **JAMA**, Chicago, v. 277, p. 925-926, Mar. 1997.

4 - ARTIGO I



4 – Artigo original I

Doença celíaca em familiares de primeiro grau no Recife, Nordeste do Brasil, aspectos clínicos e histológicos³

Celiac disease among first-degree family members in Recife, northeastern Brazil: clinical and histological characteristics.

Margarida M Castro-Antunes^{*†}, Roberta Magalhães[‡], Josemar M M Nobre[§], Bruna P Silva^{||}, Giselia A P Silva^{*¶}.

* Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Centro de Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

† Ambulatório de Gastroenterologia Infantil do Instituto de Medicina Integral de Pernambuco Professor Fernando Figueira (IMIP).

‡ Laboratório Marcelo Magalhães, Pernambuco.

§ Laboratório de Imunologia do Instituto de Medicina Integral de Pernambuco Professor Fernando Figueira (IMIP).

|| Aluna do PIBIC/ CNPq

¶ Departamento Materno Infantil do Centro de Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Conflitos de interesse: nada a declarar.

Esse estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil – CNPq (Processo: 475120/2006-1).

Correspondência para Margarida M Castro-Antunes
Av. Beira Rio, 240/2402 Ilha do Retiro Recife-PE CEP: 50750-400
Fone: 081 34468660.
Endereço eletrônico: margarida.mmcastro@gmail.com

³ Artigo formatado de acordo com as normas da revista Jornal de Pediatria Rio de Janeiro

Resumo:

Objetivo: Determinar a prevalência da doença celíaca e descrever as alterações histológicas, manifestações clínicas e condições associadas de um grupo de familiares de primeiro grau de pacientes celíacos na cidade de Recife, Nordeste do Brasil. **Método:** O estudo foi realizado em ambulatórios de gastroenterologia da cidade de Recife. Foram incluídos no estudo 174 familiares de primeiro grau, submetidos à pesquisa do anticorpo antitransglutaminase IgA, por meio do kit Immulisa™, IMMCO Diagnostics, Inc, Buffalo, NY, USA e considerou-se positivo o valor >25 UI/ml. Os pacientes com sorologia positiva foram convidados a realizar biópsia do intestino delgado (classificadas segundo Marsh) e avaliação do peso, estatura, manifestações clínicas e condições associadas à doença celíaca. Foram utilizados o teste do Qui-quadrado e Fisher para avaliar as diferenças, considerando-se significativo o valor de $p < 0,05$. **Resultados:** O anticorpo antitransglutaminase foi positivo em 20,1% (35/174) dos familiares (IC95%: 14,6; 26,5). Não se observou diferença na positividade da sorologia quanto ao grau de parentesco, nem quanto ao sexo. Vinte e dois pacientes submeteram-se a biópsia. Treze apresentaram alterações histológicas grau III de Marsh, sete grau I e dois grau zero, conferindo uma prevalência estimada de doença celíaca de 11,5%. Todos, exceto um, pacientes eram sintomáticos, o único paciente sem sintomas tinha baixa estatura. **Conclusão:** A prevalência de doença celíaca nesse grupo de familiares foi elevada. Todos os novos casos identificados tinham sintomas ou condições associadas. A frequência elevada de pacientes com sorologia positiva e sem atrofia de biópsias sugere a necessidade de acompanhamento clínico para definição do diagnóstico nesse grupo de indivíduos.

Descritores: Doença celíaca, familiares, diagnóstico, biópsia de intestino delgado, anticorpo antitransglutaminase, sintomas.

Abstract:

Objective: To determine the prevalence of celiac disease and describe the histological abnormalities, clinical manifestations and associated conditions among a group of first-degree members of the families of celiac patients in the city of Recife, northeastern Brazil. **Method:** This study was conducted in pediatric gastroenterology outpatient clinics in the city of Recife, and it included 174 first-degree family members. They were investigated for IgA antitransglutaminase antibodies, by means of the Immulisa™ kit (IMMCO Diagnostics, Inc, Buffalo, NY, USA) and values >25 IU/ml were considered positive. Serologically positive patients were invited to undergo small-intestine biopsy (classified according to Marsh) and evaluations of weight, height, clinical manifestations and conditions associated with celiac disease. The chi-square and Fisher tests were used to evaluate the differences. P-values < 0.05 were considered significant. **Results:** 20.1% (35/174) of the family members were positive for antitransglutaminase antibodies (95% CI: 14.6; 26.5). No difference in the rate of positive serological findings was found in relation to degree of kinship or sex. Twenty-two patients underwent biopsies. Thirteen presented histological abnormalities of Marsh grade III, seven grade I and two grade 0. All except one of the patients were symptomatic, with a estimated prevalence of celiac disease of 11,5%. The only asymptomatic patient presented short height. **Conclusion:** The prevalence of celiac disease among this group of family members was high. All of the new cases identified presented associated symptoms or conditions. The high frequency of serologically positive patients without atrophy in biopsies suggests that clinical follow-up is needed in order to define the diagnosis among this group of individuals.

Introdução:

A doença celíaca (DC) é determinada por alterações inflamatórias e auto-imunes desencadeadas pelo glúten em indivíduos geneticamente susceptíveis [1]. Ela acomete entre 0,5 e 1% da população mundial e o seu tratamento é a dieta de isenção de glúten por toda a vida. No Brasil, embora inicialmente tida como rara, os novos estudos sorológicos evidenciaram que a DC está presente em 0,15 a 1,75 % da população geral [2,3,4 e 5]. Essa frequência é semelhante à encontrada na maioria dos países europeus [6].

Os familiares de primeiro grau de pacientes celíacos compartilham fatores de risco genéticos e ambientais para DC, portanto, são os indivíduos de maior risco para desenvolver essa doença [7]. Neles, a frequência de DC é de dez a vinte vezes maior que a da população geral. Por esse motivo, é consenso que, nesses indivíduos, se deva realizar busca ativa por meio de sorologia, mesmo nos que se dizem assintomáticos [8,9].

Segundo o critério de 1990, da Sociedade Europeia de Gastroenterologia e Nutrição (ESPGHAN), o diagnóstico da DC se baseia na presença de: atrofia vilositária em biópsia de intestino delgado (Marsh III), clínica e sorologia durante o consumo de glúten; e normalização desses parâmetros após a retirada dessa proteína da dieta. [10]. Contudo, utilizando-se esses parâmetros, são frequentes as situações de indefinição diagnóstica. Em 2005, a NASPGHAN publicou uma orientação diagnóstica revisando o critério da ESPGHAN e abordando as situações especiais de diagnóstico [8]. Essa orientação recomenda realizar sorologia em indivíduos de grupos de risco, mesmo que assintomáticos, após os três anos de idade.

Em muitos dos familiares com sorologia positiva para DC não se evidencia atrofia vilositária na biópsia do intestino delgado. Muitos deles, além disso, têm sintomas inespecíficos ou são assintomáticos [11]. Embora, atualmente, alterações inflamatórias mínimas (Grau I de Marsh) ainda não sejam suficientes para o diagnóstico de DC, alguns autores sugerem que os pacientes em que foram evidenciadas essas alterações, se tiverem sorologia positiva e sintomas, deveriam ser submetidos a um teste com dieta de isenção de glúten e acompanhamento [12, 13].

Outro aspecto do diagnóstico é que no Brasil, como em outros países em desenvolvimento, as entero-infecções e a desnutrição crônica são muito frequentes e podem determinar alterações na mucosa intestinal que se confundem com as da enteropatia celíaca [14,15]. A população brasileira, pela sua miscigenação, tem características genéticas diferentes da europeia onde a maioria dos estudos foi realizada e, portanto, pode também ter formas de apresentação clínica e histológica características. Baseado nesses pressupostos, o objetivo desse estudo foi determinar a prevalência da DC e descrever as alterações histológicas, manifestações clínicas e condições associadas de um grupo de familiares de primeiro grau de celíacos na cidade de Recife, Nordeste do Brasil.

Pacientes e Método

População, local e desenho do estudo

A pesquisa foi realizada em ambulatórios de gastroenterologia infantil de Recife, Nordeste do Brasil, no período de agosto de 2007 a março de 2009. Pacientes com diagnóstico pregresso de doença celíaca foram identificados como casos-índice e os seus familiares de primeiro grau, maiores do que dezoito meses, convidados a participar da pesquisa. Considerou-se caso-índice o indivíduo cujo diagnóstico havia sido firmado conforme o critério da ESPGHAN de 1990 [10], independentemente do tempo de acompanhamento. Os familiares que aceitaram participar do estudo foram submetidos à coleta de cinco ml de sangue, avaliação de peso e estatura e respondiam a um questionário que investigava sintomas. Os familiares que tiveram sorologia positiva foram convidados a submeter-se a biópsia intestinal.

Sorologia

Três ml de sangue foram acondicionados em tubo seco para realização da sorologia. O sangue coletado foi centrifugado e o soro obtido nesse processo, armazenado em ependorf a -18°C . A pesquisa do anticorpo antitransglutaminase tecidual (tTG) no soro foi feita pela técnica de ELISA semi-quantitativa com kit comercialmente disponível (ImmuLisaTM, IMMCO Diagnostics, Inc, Buffalo, NY, USA). O exame foi realizado em

duplicata em duas leitoras distintas e foi considerado positivo o indivíduo cujas duas leituras foram maiores do que 25 UI/ml, conforme estabelecido pelo fabricante.

Biopsia intestinal

Quatro a seis fragmentos de mucosa foram coletados em bulbo e duodeno distal por meio de endoscopia digestiva alta (EDA). A avaliação histopatológica, realizada após coloração por hematoxilina-eosina, utilizou a classificação de Marsh para diagnóstico de DC [16].

Avaliação clínica

As medidas de peso e estatura foram realizadas pelo mesmo examinador e classificados em percentis de acordo com a curva do CDC, 2000 [17]. O índice de massa corpórea (IMC) foi calculado utilizando a razão do peso pelo quadrado da estatura. Para pesquisa de sintomas e condições associadas utilizou-se formulário com respostas fechadas. Os sinais e sintomas foram agrupados em três categorias: 1. Perda de peso 2. Gastrointestinais - dor abdominal, diarreia, constipação, distensão abdominal, flatulência, empachamento. 3. Não-gastrointestinais - aftas, dor articular, fadiga, irritabilidade, insônia, alopecia, dermatite. As condições mórbidas avaliadas foram: anemia, osteoporose, dermatite herpetiforme, tireoidite, convulsão, depressão, doenças reumatológicas, síndromes genéticas e nefropatia crônica.

Análise estatística

As frequências estão descritas em porcentagem com os seus respectivos intervalos de confiança de 95% e as idades em mediana e quartis. Utilizou-se o teste do Qui-quadrado e Fisher para testar diferenças entre as frequências. Considerou-se o valor do $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

Aspectos éticos

Um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os participantes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Fernando Figueira – IMIP e cumpriu as determinações da

Declaração de Helsinque. Os indivíduos que tiveram diagnóstico de DC ou sorologia positiva foram encaminhados para acompanhamento em ambulatório especializado.

Resultados

Cento e noventa e nove familiares de 66 casos-índice de DC foram identificados e 174 (87,4%) aceitaram participar e foram incluídos no estudo. Todas as famílias apresentavam apenas um indivíduo com diagnóstico prévio de DC. Os familiares eram 78 homens (44,8%) e 96 mulheres (55,2%). Quanto ao tipo de parentesco com o caso-índice eram 49 pais, 63 mães e 62 irmãos. A idade dos pais variou entre 23 e 56 anos, mediana de 38 anos (P25: 33; P75: 42) e a dos irmãos de vinte meses a 27 anos, mediana de treze anos (P25: 8; P75: 17 anos). Observa-se predomínio do sexo feminino na população estudada ($p=0,05$).

Sorologia:

O tTG foi positivo em 35/174 dos familiares conferindo uma soropositividade de 20,1% (IC 95%: 14; 26). Os resultados das sorologias segundo o tipo de parentesco e sexo estão descritos na tabela 1. Não se observa diferença nas frequências da soropositividade da tTG quanto ao parentesco com o caso-índice, nem quanto ao sexo.

Tabela 1: Frequência do anticorpo antitransglutaminase segundo sexo e grau de parentesco com o caso-índice.

	tTG* presente n=35		tTG* ausente n=139		Total N= 174	P
	N	% (CI95% [†])	n	%	N	
Parentesco						
Pai	12	24,5 (14,0 – 37,9)	37	75,5	49	0,31
Mãe	14	22,2 (13,2- 33,7)	49	77,8	63	
Irmão (ã)	9	14,5 (7,3 – 25,0)	53	85,5	62	
Sexo						
Masculino	14	17,9 (10,6 – 27,6)	64	82,1	78	0,51
Feminino	21	21,9 (14,4 – 31,0)	75	78,1	96	
Total	35	20,1 (14,6 – 26,5)	139	79,9	174	

*tTG: Anticorpo antitransglutaminase tecidual humana IgA

[†]IC95%: Intervalo de confiança de 95%

Histologia do Intestino delgado:

Dos familiares com sorologia positiva, 22/35 (62,8%) aceitaram submeter-se à endoscopia com biópsia. Dentre eles, 20/22 (90,9%) tiveram biópsias alteradas, sendo sete compatíveis com o grau I de Marsh e 13 com o Grau III. Considerando-se como celíaco o paciente com biópsia alterada e sintomas, observamos uma frequência presumível de DC de 11,5% (IC95%: 7,3; 17,4). A Figura 1 demonstra a sequência e distribuição dos resultados das sorologias e biópsias.

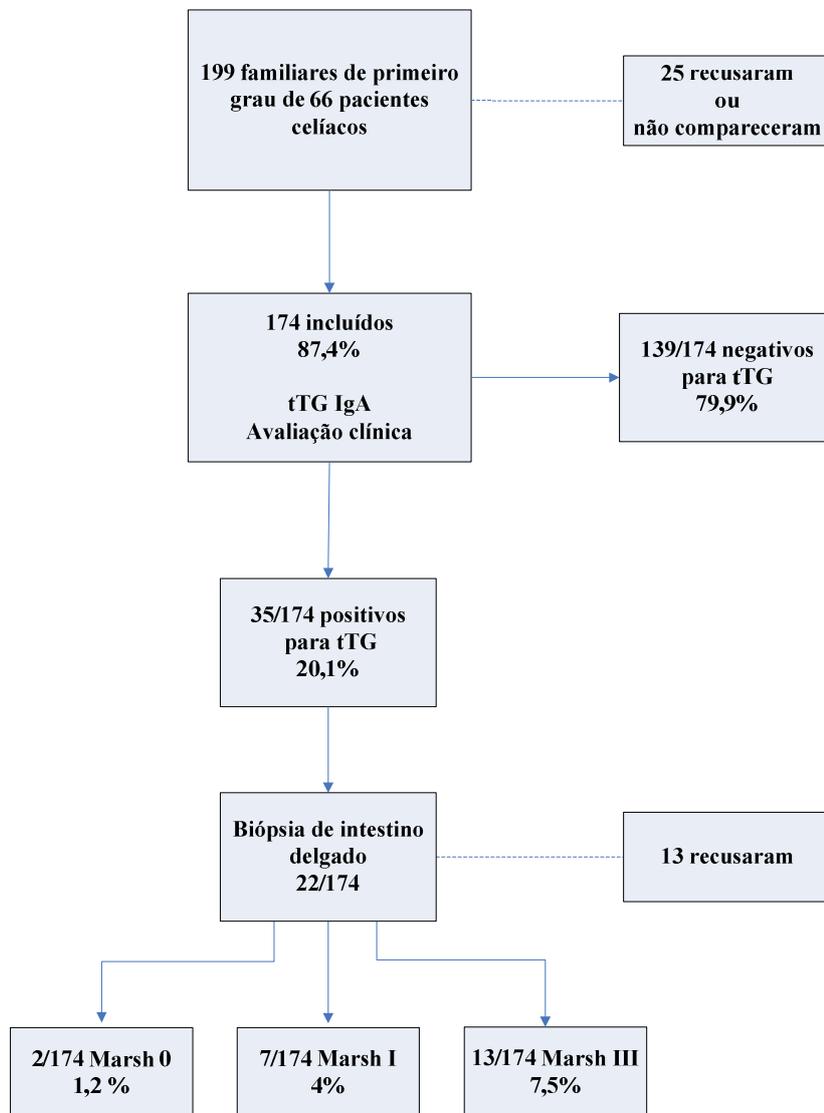


Figura 1: Fluxograma da pesquisa com a distribuição dos resultados das sorologias e biópsias, classificadas segundo Marsh.

Sintomas:

Um dos dois familiares com tTG positiva e biopsia normal era assintomático e o outro apresentava dor e distensão abdominal, diarreia, empachamento, flatulência, constipação, dor articular, fadiga, irritabilidade, alopecia e doença reumatológica sem diagnóstico definido. Na tabela 2 estão descritos a idade, parentesco, resultado da tTG, classificação da estatura, IMC e alterações histológicas; descrição dos sintomas e condições associadas nos 20 familiares que tiveram biopsia alterada.

Tabela 2: Idade, parentesco com o caso índice, resultado do anticorpo anti-transglutaminase, percentis da estatura e índice de massa corporal, classificação histológica e características clínicas dos 20 familiares de primeiro grau com biópsia alterada.

Paciente	Idade (anos)	parentesco	tTG [†]	pEst [‡]	pIMC [§]	Marsh	Sintomas e condições mórbidas
1	29	Pai	32	2	96	I	Assintomático
2	36	Mãe	30	39	58	I	Alopecia, tireoidite autoimune.
3	33	Pai	199	21	81	I	Dor articular, fadiga.
4	11	Irmã	32	32	16	I	Constipação, aftas recorrentes
5	46	Mãe	28	8	67	I	Diarréia, aftas recorrentes, dor articular.
6	35	Mãe	25	36	84	I	Dor e distensão abdominal, diarréia, empachamento, flatulência, dor articular, fadiga, irritabilidade, insônia, anemia.
7	29	Mãe	29	1	80	I	Náuseas, dor e distensão abdominal, flatulência, constipação, aftas recorrentes, fadiga, insônia, anemia.
8	2	Irmão	69	33	8	III	Perda de peso, diarréia, distensão e dor abdominal, vômitos, aftas recorrentes.
9	14	Irmã	207	73	56	III	Constipação, fadiga, irritabilidade.
10	33	Mãe	27	18	89	III	Dor e distensão abdominal, empachamento, constipação, aftas recorrentes, fadiga, dor articular.
11	44	Mãe	68	14	94	III	Dor e distensão abdominal, vômito, náuseas, empachamento, constipação, aftas recorrentes, tireoidite.
12	42	Pai	175	9	51	III	Dor abdominal, empachamento, flatulência, constipação, fadiga.
13	17	Irmã	30	0	18	III	Perda de peso, dor articular, fadiga, anemia, doença reumatológica, osteoporose.
14	47	Pai	45	18	64	III	Flatulência, irritabilidade
15	45	Mãe	81	3	79	III	Dor abdominal, empachamento, distensão abdominal, constipação, dor articular, fadiga, alopecia, anemia.
16	28	Mãe	113	20	52	III	Perda de peso, náusea, constipação, dor articular, fadiga, irritabilidade, depressão.
17	14	Irmã	26	53	25	III	Perda de peso, náuseas, empachamento, distensão abdominal, flatulência, constipação, aftas recorrentes, fadiga, irritabilidade.
18	11	Irmã	33	49	48	III	Constipação, aftas recorrentes, alopecia.
19	36	Pai	55	73	76	III	Dor e distensão abdominal, diarréia, empachamento, flatulência, aftas recorrentes, dor articular, insônia.
20	46	Mãe	25	2	72	III	Dor e distensão abdominal, dor articular, fadiga.

* CI: caso-índice, [†] tTG: Anticorpo anti-transglutaminase humana, [‡] pEst: Classificação da estatura em percentis, de acordo com o CDC 2000, [§] pIMC: Classificação do IMC em percentis, de acordo com o CDC 2000, ^{||} Alterações de biópsia classificadas segundo Marsh.

Discussão

Nesse estudo, observou-se uma soroprevalência de 20,1% e uma prevalência de DC estimada em 11,5%, em familiares de pacientes celíacos. Essa frequência é elevada e semelhante às da Europa e América do Norte [13,18]. Os dois estudos brasileiros em familiares, que temos conhecimento até o momento, foram realizados no centro-sul do Brasil e encontraram a prevalência máxima de 4,8%. Ambos utilizaram o EMA para triagem inicial [19,20]. Acreditamos que a diferença nas soroprevalências entre esses e o presente estudo tenha sido acentuada pelo fato que o EMA, embora mais específico, é menos sensível do que o tTG [21].

Optamos pela tTG IgA como teste único para triagem dos familiares pela sua alta sensibilidade, baixo custo e facilidade técnica. A maior causa de falso-negativo da tTG IgA é a deficiência de IgA. Na população brasileira a deficiência de IgA ocorre em cerca de 0,1%, uma das menores relatadas no mundo [22] e mesmo considerando a maior frequência dentre celíacos, essa possibilidade nesse grupo é baixa.

Uma das maiores limitações operacionais do estudo foi a dificuldade de retorno dos familiares provenientes de zonas afastadas da cidade do Recife. Por esse motivo, 13/ 34 (37%) dos pacientes com sorologia positiva não se submeteram a biópsia. É provável que alguns desses pacientes sejam portadores de DC e que a frequência desse grupo seja ainda maior do que a observada.

A frequência da DC em cada região geográfica reflete o perfil dos fatores de risco ambientais e marcadores genéticos daquela região [23]. Os genes de histocompatibilidade (HLA) DQ2 e DQ8 são os mais conhecidos e são considerados indispensáveis para o desencadeamento da DC [24, 25, 26]. Embora, até o momento, não tenhamos conhecimento de dados referentes à prevalência desses genes em população geral do Recife é provável que eles sejam frequentes por dois motivos. O primeiro é que foi encontrada alta prevalência do HLA DQ8 em tribos indígenas do continente americano, demonstrando que eles eram frequentes na população original dessa região [27]. E o segundo é houve pouco tempo para seleção negativa desses genes, pois o glúten chegou às Américas

há apenas 500 anos trazido pelos colonizadores europeus, tempo curto se comparado a Europa onde ele já está a cerca de 10.000 anos [23].

A introdução precoce do glúten e não concomitante ao aleitamento materno é fator de risco para o desencadeamento da DC [28,29]. O primeiro contato com o glúten é precoce em crianças brasileiras. Cerca de que 60% das crianças sejam desmamadas antes do 6º mês de vida e 20% das crianças já têm contato com o glúten nessa idade [30] e o consumo de trigo no Brasil é alto e semelhante aos países europeus. [31]. Além disso, a maioria da população brasileira está exposta a condições ambientais adversas. As entero-infecções nos primeiros meses de vida modificam a barreira da mucosa intestinal, facilitando a passagem de peptídeos de glúten não completamente digeridos, evento inicial no processo patogênico da DC [1].

Outro dado encontrado no estudo foi que dentre os 22 pacientes que se submeteram a biopsia, sete tiveram alterações mínimas (grau I de Marsh). Nesses casos podemos levantar a possibilidade de um falso-positivo da sorologia, da coleta do fragmento não ter sido realizada numa área acometida do intestino delgado ou a doença celíaca encontrar-se numa fase inicial onde ainda não há atrofia vilositária. Nessa população é relevante considerar o diagnóstico diferencial com a enteropatia ambiental, endêmica nessas regiões e que podem ter apresentação clínica e histológica semelhante a DC. Dados semelhantes foram encontrados na Índia, Egito e Turquia países onde a população vive em condições comparáveis a do Brasil [14, 32, 33]. Nesse contexto, a sorologia e o acompanhamento da resposta clínica à dieta de isenção de glúten seriam imprescindíveis para o diagnóstico.

Todos, exceto um, os pacientes diagnosticados no estudo eram sintomáticos e o que se dizia assintomático tinha baixa estatura. Possivelmente, por serem sintomas de menor intensidade e pouco específicos, não os motivou a procurar diagnóstico. Embora, muitos estudos já tenham demonstrado que uma parcela elevada de pacientes com constipação, dispepsia e síndrome do intestino irritável são portadores de DC não diagnosticada a suspeição diagnóstica nessas situações ainda é baixa [34, 35].

Esses dados reforçam a necessidade de busca ativa por sorologia nos familiares de pacientes celíacos, inclusive em populações não-europeias. Em países em desenvolvimento

a sorologia e o acompanhamento são fundamentais para diagnóstico em familiares. Sugerimos ainda que, nos que tiverem biopsia inconclusiva e que sejam pouco sintomáticos devem ser considerados teste com dieta de isenção de glúten e novas biopsias para avaliação.

Referências

1. Kagnoff MF. Celiac disease: Pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Invest* 2007; 117: 41-9.
2. Gandolfi L, R. Pratesi R, Cordoba JCM, et al. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 689-92.
3. Crovella S, Brandão L, Guimarães, Lima Filho JL, Arraes LC, Ventura et al. Speeding up coeliac disease diagnosis in the developing countries. *Dig Liver Dis* 2007; 39:900-2
4. Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA 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(1): 43-9.
5. Melo Sbc, Fernandes Mf, Peres LC, Troncon LEA. Prevalence and Demographic Characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brasil. *Dig dis Sci.* 2006; 57, 1020-25.
6. Accomando S, Cataldo F. The global village of celiac disease. *Digestive liver dis* 2004; 36: 492-8.
7. Bonamico M, Ferri M, Mariani P et al. Serologic and genetic markers of celiac disease: a sequential study in the screening of first degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42(2): 150-4.
8. Hill ID, Dirks MH, Liptak GS 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.
9. NICE. National Institute for Health and Clinical Excellence - Clinical guideline 86. Celiac disease: Recognition and assessment of coeliac disease. May 2009.
10. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J. et al. Revised criteria on the diagnosis of celiac disease. Report of working group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. *ArCh Dis Child.* 1990; 65: 909-11.

11. Esteve M, Rosinach M, Fernandes-Banares F et al. Spectrum of gluten-sensitive enteropathy in first-degree relatives of patients with celiac disease: clinical relevance of lymphocytic enteritis. *Gut*. 2006; 55(12): 1739-45.
12. Tursi A, Brandimarte G. The symptomatic and Histologic Response to a Gluten-Free diet in patients with borderline enteropathy. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36: 13-7.
13. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, 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.
14. Groover R, Puri AS, Aggarwal N, Sakhuja P. Familial prevalence among first-degree relatives of celiac disease in North India. *Dig Liver Dis* 2007; 39: 903-7.
15. Cataldo F, Montalto G. Celiac disease in the developing countries: A new and challenging public health problem. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 2153-9.
16. 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.
17. Kuczmarski RJ, Ogden CL, Guo SS, ET AL. 2000 CDC growth charts for the United States: Methods and development. National Center for Health Statistics. *Vital Health Stat* 11 (246). 2002.
18. Dube C, Roston A, Sy R, Cranney A, Saloojee N, Garrity C et al. The Prevalence of celiac disease in average risk and at-risk Western European populations: a systematic review. *Gastroenterology*. 2005 Apr; 128.
19. Kotze LMS, Utiyama S R R, Nishiara RM, Zeni MPB, Sena MG, Amarante HMS. Antiendomysium antibodies in brazilian patients with celiac disease and their first-degree relatives. *Arq Gastroenterol* 2001; 38: 94 – 103.
20. Almeida PL, Gandolfi L, Modelli IC, Martins RC, Almeida RC, Pratesi R. Prevalence of celiac disease among first degree relatives of brazilian celiac patients. *Arq Gastroenterol* 2008; 45: 69-72
21. Biagi F, Pezzimenti D, Campanella J, Vadacca GB, Corraza GR. Endomysial and tissue transglutaminase antibodies in celiac sera: a comparison not influenced by previous serological testing. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36: 955-8.
22. Carneiro-Sampaio MM; Carbonare SB; Rozentraub RB; de Araujo MN; Riberiro MA; Porto MH. Frequency of selective IgA deficiency among Brazilian blood donors and healthy pregnant women. *Allergol Immunopathol (Madr)* 1989; 17: 213-6.

23. Catassi C, Yachha SK. The global village of celiac disease. In: Fasano A, Troncone R, Branski D (eds): *Frontiers in Celiac Disease*. Pediatric Adolesc Med. Basel, Karger 2008; 12: 23-31.
24. Lundin KEA, Scott H, Hansen T et al. Gliadin-specific, HLA DQ (alpha1*0501, beta1*0201) restrict T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med* 1993; 178: 187-96.
25. Sollid LM, Markussen G, EK J, Gjerde H, Vartdall F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ α/β heterodímero. *J Exp Med* 1989; 169: 345-50.
26. Sollid LM. Molecular Basis of celiac disease. *Ann Rev Immunol* 2000; 18: 53-81.
27. Monsalve MV, Edin G, Devine DV. Analysis of HLA Class I and Class II in Na-Dene and Amerindian population from British Columbia, Canada. *Human Immunology* 1998; 59: 48-55.
28. Ivarsson A. The Swedish epidemic of coeliac disease explored using an epidemiological approach- some lessons to be learnt. *Best Pract Reserc clin Gastroenterol* 2005; 19; 425-40.
29. Norris JM, Barriga K, Hoffenberg EJ, Taki I, Miao D, Haas JE et al. Risk of celiac disease auto immunity and Timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *JAMA* 2005; 293; 2343-50.
30. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. II pesquisa de prevalência de aleitamento materno nas capitais brasileiras e Distrito Federal. Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2009.
31. Brasil. Ministério do planejamento. Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003 - Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Editora do IBGE, 2004.
32. Bhatnagar S, Gupta SD, Mathur M, Phillips AD, Kumar R, Knutton S et al. Celiac disease with moderate histologic changes is a common cause of cronic diarrhea in Indian children. *J Pediat Gastroenterol Nutr* 2005; 41: 204-209.
33. Abu-Zekry M, Kryszak D, Diab M, Catassi C, Fasano A. Prevalence of celiac disease in Egyptian children disputes the east-west agriculture-dependent spread of the disease. *J Pediat Gastroenterol Nutr* 2008; 47: 136-40.

34. Usai P; Manca R; Cuomo R; Lai MA; Boi MF. Effect of gluten-free diet and co-morbidity of irritable bowel syndrome-type symptoms on health-related quality of life in adult coeliac patients. Dig Liver Dis 2007; 39(9): 824-8.
35. Giangreco E; D'agate C; Barbera C; Puzzo L; Aprile G; Naso P et al. Prevalence of celiac disease in adult patients with refractory functional dyspepsia: value of routine duodenal biopsy. World J Gastroenterol 2008; 14(45): 6948-53.

5 - ARTIGO II



5 – Artigo original II

Distribuição das frequências dos HLA DQ2 e DQ8 em pacientes celíacos e seus familiares de primeiro grau em Recife, Nordeste do Brasil⁴

Frequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 among celiac and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil

*‡Margarida Maria Castro-Antunes, MD, †§Sergio Crovella, PhD, †Lucas André Cavalcanti Brandão, BSc, †Rafael Lima Guimarães, BSc, †||Valentina Zanin, BSc, *Maria Eugênia de Faria Motta, PhD, *Giselia Alves Pontes da Silva, PhD.

* Pós-graduação em Saúde da criança e do adolescente do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

† Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA)

§ Instituto de Medicina Integrada de Pernambuco Professor Fernando Figueira (IMIP)

‡ Departamento de Genética, da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

|| Serviço de Genética do Hospital Infantil Burlo Garofolo, Trieste (Itália)

Correspondência para: Margarida Maria de Castro Antunes, Avenida Beira Rio, 240/2402 Ilha do Retiro. Recife-PE Brasil CEP 50750-400 Tel: +55 81 34468660.

Email: margarida.mmcastro@gmail.com

Esse estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil. (CNPq) (Processo No. 475120 /2006-1).

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse

⁴ Artigo formatado de acordo com as normas da revista Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition

Resumo:

Objetivo: O objetivo deste estudo foi avaliar as frequências de genótipos os HLA DQ2 e DQ8 e os alelos A1*05, A1*0201, B1*0201 e B1*0302 entre indivíduos com doença celíaca e familiares de primeiro grau em Recife, Nordeste do Brasil. **Métodos:** A Genotipagem do HLA DQ2 DQ8 foi realizada em 73 pacientes celíacos e 126 familiares. Os alelos DQA1*05, DQA1*0201, DQB1*02 e DQB1*0302 foram identificados pela sequência de *primers* específicos usando o kit de EU-DQ do laboratório de Eurospital, Trieste, Itália e com dupla checagem pelo kit de SPP (Dynal). **Resultados:** Entre os 73 casos, 50 (68,5%) tinham o genótipo DQ2, 13 (17,8 %) tinham o DQ8, cinco (6,8 %) tinham DQ2 e DQ8 e cinco não tinham nenhum destes genótipos. Entre os cinco indivíduos negativos, quatro tinham o alelo B1*02 e um nenhum dos alelos estudados. O B1*02 foi o alelo mais frequente em ambos os grupos (94 % dos pacientes e 89 % nos controles familiares). **Conclusões:** No presente estudo, a doença celíaca esteve associada com os genótipos DQ2 e DQ8. O genótipo DQ2 predominou, mas a distribuição das frequências foi diferente da encontrada na população europeia e mais próxima às das Américas. As frequências muito altas dos genótipos HLA DQ2 e DQ8 encontradas nos familiares dificulta o uso da genotipagem HLA para rotina diagnóstica da doença celíaca neste grupo.

Palavras-chave: doença celíaca, HLA, familiares; genotipagem; diagnóstico.

Abstract:

Aims: The aim of this study was to evaluate the frequencies of the HLA genotypes DQ2 and DQ8 and the alleles A1*05, A1*0201, B1*0201 and B1*0302 among individuals with celiac disease and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil. **Methods:** HLA DQ2 DQ8 genotyping was performed on 73 individuals with celiac disease and 126 first-degree relatives. The alleles DQA1*05, DQA1*0201, DQB1*02 and DQB1*0302 were identified by sequencing specific primers using the EU-DQ kit from the Eurospital Laboratory, Trieste, Italy and double checked by the All Set SPP kit (Dynal). **Results:** Among the 73 cases, 50 (68.5%) had the genotype DQ2, 13 (17.8%) had DQ8, five (6.8%) had DQ2 and DQ8, and five did not have any of these genotypes. Among the five negative individuals, four had the gene B1*02 allele and one did not have any of the alleles studied. B1*02 was the most frequent allele in both groups (94% in the patients and 89% in the control relatives). **Conclusions:** In this study, celiac disease was associated with the genotypes DQ2 and DQ8. DQ2 predominated, but the distribution of the frequencies was different from what had been found in European population and was closer to what has been found in the Americas. The quite high frequencies of the HLA genotypes DQ2 and DQ8 found in first-degree relatives would make it difficult to use these HLA genotypes for routinely diagnosing celiac disease in this group.

Key words: celiac disease; HLA; relatives; genotyping; diagnosis.

Introdução

O processo inflamatório e auto-imune que caracteriza a doença celíaca (DC) é desencadeado pelo glúten em indivíduos geneticamente predispostos, na presença de agressores ambientais que interferem na integridade do intestino delgado [1]. Dentre os marcadores genéticos, os genes dos antígenos de histocompatibilidade linfocitária (HLA) são os mais estudados e estão fortemente implicados no desenvolvimento da doença [2]. A presença dos genes codificadores das moléculas HLA classe II DQ2 e DQ8 explicam cerca de 40% da ocorrência da DC em populações europeias [3]. A associação entre o genótipo DQ2 e a DC está baseada na alta afinidade da molécula DQ2 do HLA das células apresentadoras de antígeno da mucosa intestinal pelos peptídeos derivados do glúten [4].

Em estudo multicêntrico realizado na Europa, observou-se que o genótipo HLA DQ2 está presente em 86 a 93 % dos pacientes celíacos, enquanto de 3 a 8 % são portadores de DQ8 sem DQ2 [5]. Esses marcadores também são carregados por muitos indivíduos sem DC: 40 a 65 % dos familiares de primeiro grau de celíacos e 18 a 30 % da população em geral europeia [6-8]. No entanto, em populações não europeias, são observadas frequências diferentes. Nos Estados Unidos foi relatada uma proporção maior de HLA DQ8 e menor de DQ2 do que na Europa [9]. Frequências semelhantes às observadas nos Estados Unidos foram descritas em populações asiáticas [10], cubanas [11] e chilenas [12].

Alguns autores têm sugerido que os genótipos HLA DQ2 e DQ8 não são apenas indicadores de vulnerabilidade genética, mas também podem ser usados para diagnosticar a doença celíaca em situações de indefinição diagnóstica [13, 14]. Entre familiares, tal como entre outros grupos em risco, está indicada a busca ativa de novos casos

utilizando testes sorológicos. Estes grupos de apresentam a maior concentração de casos com diagnósticos indefinidos e seriam os maiores candidatos à genotipagem [7, 15]. No entanto, a frequência a HLA genótipos DQ2 e DQ8 entre os familiares é maior do que a da população geral e também varia entre as diferentes regiões do mundo. Assim, seu uso no diagnóstico também deve ser avaliado nas diversas populações.

O sistema HLA é extremamente polimórfico e reflete o processo de formação de cada povo [16]. A população brasileira é intensamente miscigenada, com diferenças acentuadas entre as regiões. Na Região Nordeste do Brasil, os marcadores genéticos da DC ainda não foram estudados. Estudos recentes demonstraram que as frequências da DC nas Américas e no Brasil são semelhantes ao que tem sido descrito em Europa [17-19]. Este conhecimento tem aumentado o número de novos casos de DC diagnosticados no Brasil, especialmente entre os grupos de risco. Por esse motivo, também têm sido maior a necessidade de conhecimento sobre os marcadores genéticos e ambientais nas diversas populações. O presente estudo pretende avaliar as frequências dos alelos codificadores dos HLA DQ2 e DQ8 dentre os pacientes com doença celíaca e seus familiares não acometidos no Nordeste do Brasil.

Método

Desenho e população de estudo

Este estudo foi realizado em ambulatórios de gastroenterologia pediátrica da cidade de Recife, Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil, entre Agosto de 2007 e Maio de 2008. Crianças e adolescentes com diagnóstico de celíaca doença, juntamente com os seus familiares de primeiro grau (pais, mães e irmãos) foram convidados a participar do estudo.

Um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os participantes. O estudo tinha sido previamente aprovado pela o Comitê de ética em pesquisa em seres humanos do Instituto de Medicina Integral Fernando Figueira (IMIP), sob o número 893, em 10 de Novembro de 2006, e o trabalho foi realizado em conformidade com os princípios da Declaração de Helsinque.

O estudo teve um desenho transversal observacional com componente analítico para comparar as frequências dos HLA DQ2 e DQ8 entre casos e controles familiares. Todos os familiares de primeiro grau que aceitaram participar no estudo foram submetidos a sorologia para pesquisa do anticorpo antitransglutaminase tecidual humana (tTG) e aqueles com resultados positivos foram convidados a se submeter a biopsia intestinal.

Foram considerados casos os indivíduos cujo diagnóstico de DC havia sido feito de acordo com os critérios da ESPGHAN de 1990 [20], independentemente do tempo de seguimento, e familiares com tTG positiva e sinais de atrofia vilositária na biopsia intestinal. O grupo controle era composto por familiares cuja sorologia para tTG foi negativa. Os familiares com sorologia positiva e sem sinais de atrofia foram excluídos da análise.

Sorologia:

Após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas e o soro obtido, armazenado em tubos de Eppendorf a - 18°C. A pesquisa da tTG sérica foi realizada utilizando a técnica de ELISA semi-quantitativa por kit comercialmente disponível

(ImmuLisa™, IMMCO diagnóstico, Inc, Buffalo, NY, EUA). Valores inferiores a 20 EU/ml foram considerados negativos, conforme sugerido pelo fabricante.

Genotipagem dos HLA DQ2 e DQ8:

O DNA genômico foi extraído de dois ml de sangue usando o kit Genome Wizard DNA (Promega), seguindo o protocolo padrão. A genotipagem dos HLA DQ2 (alelos A1 * 05 e DQB1 * 02) e DQ8 (alelo B1 * 0302) foi realizada utilizando o kit EU-DQ do Laboratório Eurospital (Trieste, Itália). Os produtos da PCR foram detectados através de eletroforese em gel de agarose de 2 % e sua leitura foi feita sob luz ultravioleta. Foi feita uma segunda pesquisa dos haplótipos do HLA, utilizando o kit de PCR-SSP AllSet (Dynal, BIOTECH S.A, Oslo, Noruega).

Análise estatística:

As frequências dos genótipos HLA e dos alelos foram descritas como porcentagens com seus respectivos intervalos de confiança. As variáveis contínuas foram descritas como medianas e percentis. As frequências dos grupos foram comparadas através do teste qui-quadrado ou Fisher. O nível de significância adotado foi de 5 % ($p < 0,05$). Os dados foram armazenados e analisados usando o pacote de software do EpiInfo 6.04.

Resultados

Cento e oitenta e dois familiares de 66 pacientes foram identificados e 161 familiares (88.4 %) foram incluídos no estudo. Sete familiares com sorologia positiva para tTG e atrofia vilositária na biopsia foram incluídos no grupo de casos, enquanto 126 familiares de primeiro grau com sorologia negativa constituíram o grupo controle.

As características dos 73 casos estão descritas na tabela 1. Entre os 126 controles, 68 (54 %) eram mulheres e 58 eram homens; quanto ao tipo de parentesco com o caso-índice: 33 (26,2 %) eram pais, 45 (35,7 %) eram mães e 48 (38,1 %) eram irmãos. A Idade dos pais variou entre 23 e 56 anos, com uma mediana de 38 anos (P25/75: 33/43 anos) e a idade dos irmãos variou entre 20 meses e 27 anos, com mediana de 13 anos (P25 / P75: 8/16 anos).

Tabela 1: Sexo, idade e características clínicas dos 73 pacientes celíacos no momento do diagnóstico.

	Pacientes (n = 73)	
	n	%
Sexo		
Masculino	37	50,7
Feminino	36	49,3
Idade do diagnóstico (anos)		
Menos de 2	8	11,0
2 a 6	35	47,9
7 a 12	17	23,3
13 a 21	6	8,2
Mais de 21	7	9,6
Características no diagnóstico		
Forma clássica *	29	39,7
Sintomas gastro-intestinais leves	21	28,8
Sintomas não gastro-intestinais [†]	8	11,0
Diagnóstico por triagem sorológica [‡]	15	20,5

* Forma clássica: diarreia, distensão abdominal e desnutrição associada.

[†] Sintomas e condições não gastro-intestinais descritos nesse grupo: baixa estatura, redução da densidade mineral óssea.

[‡] Indicações de triagem sorológica nesse grupo: familiares de primeiro grau, diabetes tipo 1. Ambos os grupos utilizaram a tTG para triagem.

Os genótipos HLA DQ2 ou DQ8 estiveram presentes em 68 dos 73 pacientes celíacos (93,2 %; 95 % CI: 84 – 97 %) e 99 dos 126 controles (78,6 %; 95 % CI: 70 – 85 %). A distribuição da frequência dos genótipos HLA DQ2 e DQ8 nos dois grupos estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Frequência dos genótipos DQ2 e DQ8 nos pacientes e controles familiares.

HLA	Pacientes (%)		Controles (%)		χ^2	p
	n (%)	CI	n (%)	CI		
Ausente	5 (6.8)	2.5 – 15.9	27 (21.4)	14.8 – 29.8	7.28	0.006*
DQ2	50 (68.5)	56.4 – 78.5	66 (52.4)	43.3– 61.2	4.94	0.026*
DQ8	13 (17.8)	10.1 – 28.8	20 (15.9)	10.1 – 23.6	0.13	0.72
DQ2 + DQ8	5 (6.8)	2.5 – 15.9	13 (10.3)	5.8 – 17.3	0.68	0.41
Total	73 (100)	-	126 (100)	-	-	-

* p < 0,05

Entre os cinco pacientes que não apresentaram os genótipos DQ2 ou DQ8, quatro tinham o alelo B1 * 02 e um não tinha nenhum dos alelos pesquisados com o kit Eu-DQ. A tabela 3 descreve a idade, sexo, sintomas e sinais no momento do diagnóstico dos cinco pacientes sem HLA DQ2 ou DQ8.

Tabela 3: Características dos pacientes sem HLA DQ2 ou DQ8, segundo sexo, idade, sintomas no diagnóstico e alelos presentes na genotipagem.

Paciente	Sexo	Idade	Sinais e sintomas	Alelos
1	F	3 anos	Diarreia, dor e distensão abdominal e desnutrição	B1*02
2	F	8 anos	Diarreia, distensão abdominal e perda de peso	B1*02
3	F	14 anos	Constipação, dor e distensão abdominal, aftas e fadiga	B1*02
3	F	14 anos	Constipação, dor e distensão abdominal, aftas e fadiga	B1*02
4	M	22 meses	Diarreia, vômitos, distensão abdominal e desnutrição	B1*02 A1*0201
5	F	2 anos	Diarreia, dor e distensão abdominal e desnutrição.	Negativo †

† Para os quatro alelos investigados (A1*0201, A1*05, B1*02 e B1*0203)

As frequências dos alelos A1*0201, A1*05, B1*02 e B1*0302 nos pacientes celíacos e controles são descritos na tabela 4. O alelo B1*02 foi o mais frequente nos dois grupos e foi encontrado em 93% dos pacientes e 88% dos controles. Não foram observadas diferenças na distribuição de cada alelo entre os dois grupos.

Tabela 4: Frequências dos alelos A1*0201, A1*05, B1*02 e B1*0302 nos pacientes e controles familiares.

Alelo	Pacientes (n=73)		Controles (n= 126)		Total (n=199)		χ^2	p
	+	%	+	%	+	%		
A1*0201	10	13,7	15	11,9	25	12,5	0.14	0.33
A1*05	55	75,3	84	66,7	139	69,8	1,65	0.19
B1*02	68	93,2	111	88,1	179	89,9	1.31	0.25
B1*0302	18	24,7	33	26,2	51	25,6	0.06	0.81

Discussão

Conforme descrito em outras regiões do mundo, a maioria dos pacientes celíacos deste estudo (93,2 %) tinha os genótipos DQ2 e DQ8. Todavia, o HLA DQ2 estava presente em apenas 75,3 % dos nossos pacientes e o HLA DQ8 sem associação com DQ2 em 17,8% e estas proporções diferem daquelas descritas em populações europeias [21]. Diferenças nas frequências dos genótipos HLA DQ2 e DQ8 em populações não-europeias já haviam sido descritas anteriormente. Butterworth e cols [10], na Inglaterra, demonstraram que pacientes de origem asiática tinham menor frequência do HLA DQ2 do que os de origem britânica. Essa diminuição na frequência do HLA DQ2 e aumento do DQ8 também foram descritas em pacientes celíacos nos Estados Unidos (82 % do DQ2 e 16% do DQ8) e em Cuba (86 % do DQ2) [11,17].

Na América do Sul, Araya e cols, estudando pacientes celíacos chilenos com ascendência ameríndia, verificaram que o genótipo DQ8 predominava dentre este grupo. Estes resultados possivelmente podem ser explicados pelas origens da população chilena, formada pela miscigenação do povo Mapuche com espanhóis [12]. No Brasil, a miscigenação é tão grande que é equivocado identificar a ascendência genética por características físicas [22, 23].

Portanto é impossível determinar a composição do grupo do nosso estudo em termos de ascendência genética.

Outro dado descrito nesse estudo foi a presença de 79 % dos genótipos DQ2 e DQ8 dentre familiares não afetados, que é uma das frequências mais elevadas descritas dentre controles familiares até o momento. Os alelos A1*0201, A1*05, B1*02 e B1*0302 isolados foram ainda mais frequentes do que os genótipos DQ2 e DQ8 entre os familiares. Levantamos a possibilidade de que estes dados foram superestimados devido às características peculiares a este grupo de controles. Nós acreditamos que uma das maiores limitações para este estudo é que, entre os controles familiares, pode haver alguns pacientes. Essa possibilidade se justifica pelas características da DC que pode se manifestar em qualquer momento da vida, o que limita a avaliação feita em um momento único. No entanto, os demais estudos de HLA entre familiares utilizam desenhos semelhantes ao nosso e constataram uma frequência de até 59.5 % dos HLA DQ2 e DQ8 entre os controles familiares em populações europeias [7, 15].

Até o presente momento, não conhecemos dados sobre a distribuição de HLA DQ na população geral do Recife. No entanto, o fato de que as frequências dos marcadores genéticos entre familiares refletem e amplificam os da população geral, nos permite hipotetizar que em nossa região, uma grande proporção dos indivíduos pode carrear esses marcadores. Isso porque, uma das teorias que explica as diferenças dos HLA entre as populações é a da seleção negativa dessas moléculas durante a evolução humana [16]. Esta seleção foi afetada pelos diferentes estímulos antigênicos a que cada população foi exposta [24]. No caso da doença celíaca, ela depende principalmente da exposição ao glúten e possivelmente também outros fatores ambientais [25].

Recife está localizada no Nordeste do Brasil, uma região que foi inicialmente povoada por tribos indígenas, como o restante das Américas. Estas tribos provêm de locais onde não havia cultivo do trigo (povos que vieram da Ásia e chegaram aqui através do Estreito de Bering) [26]. Além disso, diferentemente da Europa e do Oriente Médio (próximo ao crescente fértil), onde o glúten existe há mais de 10.000 anos, esse alimento chegou às Américas com os colonizadores europeus há 500 anos [25, 27]. Conseqüentemente, em nossa região houve menos tempo para seleção negativa dos genes de susceptibilidade para a DC, o que manteria a sua frequência elevada na população.

Outra observação do presente estudo foi que cinco (6,8 %) dos 73 pacientes celíacos não tinham nenhum dos genótipos DQ2 e DQ8, embora quatro deles tivessem ao menos o alelo B1*02. Dentre estes doentes, apenas um não apresentava a forma clássica da doença celíaca no diagnóstico, contudo, mesmo nesse paciente foram observados vários sintomas gastrointestinais. Tais conclusões são concordantes com vários estudos anteriores que demonstraram que apenas um dos alelos A1*05 ou B1*02, codificaria metade da molécula DQ2 conferindo predisposição para DC [2, 5, 21].

Encontramos o alelo A1* 0201 em nove pacientes: um deles foi negativo para DQ2 e DQ8, mas tinha o alelo B1*02. Estes achados são concordantes com dados europeus. Em um estudo multicêntrico realizado na Europa em 2002, 61 de 1008 pacientes celíacos estudados não apresentou os genótipos DQ2 e DQ8 genótipos. Trinta e quatro dos 61 pacientes tinham o gene A1*0201 em associação com B1*02[21]. Foi sugerido pelos autores que o genótipo A1*0201-B1*0201 seria capaz de codificação para uma molécula de DQ2 com menor afinidade para gliadina.

No nosso estudo, o paciente que não apresentou quaisquer dos alelos investigados havia sido diagnosticado em conformidade com os critérios da ESPGHAN, com sintomas clássicos, testes sorológicos positivos e sinais de atrofia vilositária na biopsia. Esse paciente deverá ser acompanhado clinicamente.

Nós encontramos que os genótipos DQ2 e DQ8 conferiram vulnerabilidade para DC nesse grupo. No entanto, a distribuição das frequências dos genótipos DQ2 e DQ8 foi diferente daquelas encontradas em populações europeias e semelhante aos achados de outros estudos realizados nas Américas. As altas frequências dos genótipos HLA DQ2 e DQ8 encontrados em familiares dificultariam o seu uso rotineiro para o diagnóstico da DC nesse grupo. No futuro, será necessário investigar os genótipos HLA DQ2 e DQ8 na população geral do Recife, para alcançar uma melhor compreensão desses marcadores nessa região.

Referências

1. Hunt KA, van Heel DA. Recent advances in coeliac disease genetics. *Gut* 2009; 58: 473-6.
2. Kagnoff M F. Celiac Disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J. Clin. Invest* 2007; 117:41-49.
3. Bevan S, Popat S, Braegger CP et al. Contribution of the MHC region to the familial risk of celiac disease. *J Med Genet* 1999; 36: 687-90.

4. Lundin KEA, Scott H, Hansen T et al. Gliadin-specific, HLA DQ (alpha1*0501, beta1*0201) restrict T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med* 1993; 178: 187-96.
5. Polvi A, Arranz E, Fernandes-Arquero M et al. HLA-DQ2-negative celiac disease in Finland and Spain. *Human Immunol* 1998; 59: 169-75.
6. Farré C, Humbert P, Vilar P et al. Serological Markers and HLA-D2 Haplotype among first-degree relatives of celiac patients. *Dig Dis Sci* 1999; 11: 2344-49.
7. Bonamico M, Ferri M, Mariani P et al. Serologic and genetic markers of celiac disease: a sequential study in the screening of first degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42(2): 150-4.
8. Sollid LM. Molecular Basis of celiac disease. *Ann Rev Immunol* 2000; 18: 53-81.
9. Johnson TC, Diamond B, Memeo L et al. Relationship of HLA-DQ8 and severity of celiac disease: Comparison of New York and Parisian cohorts. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2 (10): 888-94.
10. Butterworth JR, Iqbal TH, Cooper BT. Coeliac disease in South Asians residents in Britain: Comparison with white Caucasian coeliac patients. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17: 541-5.
11. Cintaldo A, Sorrell L, Galvan JA et al. HLA DQA1*0501 and DQB1*02 in Cuban celiac patients. *Human Immunol* 2006; 67: 639-42.
12. Araya M, Mondragon A, Perez-Bravo F et al. Celiac Disease in a Chilean Population Carrying Amerindians Traits. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31: 381-86.
13. Chang M, Green PHR. Genetic testing before serologic screening in relatives of patients with celiac disease as a cost containment method. *J Clin Gastroenterol* 2009; 43: 43-50.
14. Hill ID, Dirks MH, Liptak GS 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.
15. Esteve M, Rosinach M, Fernandes-Banares F et al. Spectrum of gluten-sensitive enteropathy in first-degree relatives of patients with celiac disease: clinical relevance of lymphocytic enteritis. *Gut*. 2006; 55(12): 1739-45.
 16. Nigan P, Dellalibera E, Mauricio-da-Silva L et al. Polymorphism of HLA class I genes in the Brazilian population from the northeastern state of Pernambuco corroborates anthropological evidence of its origins. *Tissue Antigens* 2004; 64: 204-9.
 17. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, 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.
 18. Gandolfi L, R. Pratesi R, Cordoba JCM, et al. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 689-92.
 19. Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA 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(1): 43-9.
 20. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J et al. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990; 65: 909–911.
 21. Karrel K, Louka AS, Moodie SJ et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02(DQ2) heterodímero: results from the European genetics cluster on celiac disease. *Human Immunol* 2003; 64: 469-77.
 22. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR et al. Color and genomic ancestry in Brazilians. *PNAS* 2003; 100: 177-82.
 23. Carvalho-Silva DR, Santos FR, Rocha J et al. The Phylogeography of Brazilian Y-chromosome lineages. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 281-6.

24. Hedrick PW, Thomson G: Evidence for balancing selection at HLA. *Genetics* 1983; 104: 449-56.
25. Catassi C. Where is celiac disease coming from and why. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 40; 279-82.
26. Santos F, Pandya A, Tyler-Smith C et al. The central Siberian origin for native American Y chromosomes. *Am J Hum Genet* 199; 64: 619-28.
27. Accomando S, Cataldo F. The global village of celiac disease. *Digestive liver dis* 2004; 36: 492-8.

*6 - CONSIDERAÇÕES
FINAIS E
RECOMENDAÇÕES*



6 – Considerações finais e Recomendações

6.1 Considerações finais

A elaboração e execução deste projeto de pesquisa buscavam responder dúvidas relacionadas ao diagnóstico da doença celíaca em familiares de primeiro grau de pacientes celíacos acompanhados nos ambulatórios de gastropediatria do Recife. Atendia assim a uma necessidade de estudar aspectos específicos regionais em um grupo de risco, de uma doença que é mundial.

A pesquisa, planejada inicialmente para ser um estudo exploratório e descritivo com análise de marcadores HLA, necessitava de uma etapa anterior de definição diagnóstica dentro do próprio estudo. Era preciso definir os casos dentro de um grupo de risco. Essa etapa que gerou o primeiro artigo original evidenciou os seguintes dados:

- A alta prevalência de DC entre os familiares dessa região, comparável aos dados europeus.
- O subdiagnóstico dentro desse grupo, pois todos os novos casos identificados no estudo eram sintomáticos. Esse dado deve ser ainda mais valorizado, pois essas pessoas convivem com um familiar celíaco e conhecem a existência da doença.
- O fato de um terço dos pacientes com sorologia positiva ter biopsia sem sinais de atrofia vilositária; dado já demonstrado em outros estudos em familiares e também descrito em países em desenvolvimento.

A genotipagem dos antígenos HLA DQ2 e DQ8, descrita no segundo artigo, demonstrou um padrão distinto do europeu e com uma alta frequência de HLA DQ8, como não havia sido descrita até então. Chama atenção ainda o grande número de controles com os genes de risco, maior do que o descrito nos demais estudos. A discussão do artigo foi estruturada buscando as origens genéticas do povo que habita essa região, bem como a história dos fatores ambientais que poderiam ter influenciado a persistência dos genes HLA DQ2 e DQ8 nesse grupo.

Embora não tenha sido objetivo desse estudo a validação da genotipagem para o diagnóstico da DC; é possível prever que ele teria um valor preditivo positivo muito baixo pela alta frequência em indivíduos sem a doença. Esse perfil de distribuição dificulta o seu uso para diagnóstico dentro desse grupo e dessa região.

Algumas *limitações* aconteceram durante a realização da pesquisa e podem refletir nos achados da mesma. Dentre as que foram percebidas devem ser consideradas:

1. A dificuldade de acesso de algumas famílias ao serviço o que gerou perdas, que podem ter interferido nos resultados.
 - Devido à impossibilidade de comparecimento de todos os constituintes da família, possivelmente eram escolhidos para participar aqueles com algum sintoma e que desejava fazer o exame. Esse viés pode ter levado a superestimar a frequência no grupo e também o achado de sintomas e condições associadas.
2. As respostas ao formulário podem ter tido o viés do gênero.
 - As mulheres eram nitidamente mais propensas a relatar sintomas do que os homens. Esse fato é percebido na avaliação global dos questionários, inclusive e principalmente, dos indivíduos com sorologia negativa, embora esses questionários não tenham sido analisados nos dois artigos por não ser objetivo dos mesmos.
 - Do mesmo modo, não encontramos predomínio do sexo feminino dentre os indivíduos positivos, como é descrito na maioria dos estudos. Esse fato deve ter sido causado pelo fato de que os homens, que atenderam ao recrutamento, serem mais sintomáticos e, portanto, com maior chance de estarem doentes.

- Pelo mesmo motivo, as mulheres que tiveram sorologia positiva aceitaram submeter-se a biópsia mais facilmente que os homens. Dentre as treze recusas, apenas uma era mulher.

Uma das observações importantes é que muitos dos familiares com diagnóstico de DC, apesar de sintomáticos, não se apercebiam doentes. Outros, apesar de se saberem doentes, recusaram a EDA para evitar o diagnóstico. A vivência dessa pesquisa trouxe à tona a dúvida do benefício do diagnóstico de uma doença para indivíduo que não se sente doente. O tratamento da DC é para toda a vida. Contudo as taxas de adesão a dieta em adolescentes e adultos são baixas. As complicações mais importantes da DC estão relacionadas à diminuição da massa óssea e a um risco moderado de malignidade. Mesmo sem considerar as outras complicações esses sérios agravos à saúde já justificariam o sacrifício de viver sem glúten num mundo onde ele é onipresente. Além disso, embora ainda escassos, alguns estudos sugerem uma melhora na qualidade global de vida de pacientes que aderem a dieta de isenção de glúten.

Por outro lado, nos primeiros estudos sobre as alterações em mucosa intestinal ocasionadas pela DC, observou-se que mesmo em indivíduos não tratados, com o tempo se estabelecem mecanismos compensatórios no intestino residual não acometido pela doença. Esses mecanismos na maioria dos casos manteriam o indivíduo estável e sem sintomas ou com poucos sintomas. Esse equilíbrio pode ser quebrado por eventos que interferem na integridade do intestino, como por exemplo, as gastroenterites agudas virais.

Na imagem do Iceberg celíaco, também está contida uma grande zona de indefinição entre a saúde e a doença, desafio para a clínica médica da criança e do adulto. O pensamento médico ocidental, sempre foi conduzido por duas motivações principais diagnosticar e tratar. Porém, em diversos momentos da história se questionou o benefício do tratamento em algumas situações clínicas específicas. No caso da DC ainda não estão claros os benefícios do tratamento em indivíduos adultos assintomáticos. Acreditamos que os anos que virão trarão respostas para essas perguntas em novos estudos e na sedimentação das inúmeras informações sobre doença celíaca, transformando-as em conhecimento e benefício para os pacientes.

6.2 Recomendações

Considerando os resultados desse estudo, observamos a dificuldade em diagnosticar a DC dentre familiares e utilizando os consensos atualmente vigentes. Esses conhecimentos reforçam a necessidade de individualizar o diagnóstico em cada grupo e em cada região do mundo. Nesse contexto, recomendamos que:

1. Os familiares de primeiro grau de pacientes celíacos devem ser submetidos a sorologia para pesquisa de DC rotineiramente.
2. Dentre familiares do Nordeste não se justifica o uso rotineiro da genotipagem dos HLA DQ2 e DQ8 para diagnóstico de DC.
3. A resposta à retirada do glúten deve ser acompanhada, clinicamente nos pacientes com sintomas e por biópsia nos assintomáticos, tendo em vista a possibilidade de confusão diagnóstica da DC com outras doenças nos países em desenvolvimento.

Sugerimos a realização de novos estudos que avaliem:

- A necessidade de repetir as sorologias periodicamente nos familiares não acometidos numa primeira triagem.
- A resposta clínica e qualidade de vida nos pacientes portadores de DC em dieta de restrição de glúten.
- Complicações tardias da DC em pacientes assintomáticos.
- Fatores de risco e de proteção para DC em países em desenvolvimento.

7 - APÊNDICES



Apêndice A – Carta de apresentação do Artigo original I ao JPGN

Frequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 among celiac and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil

Margarida Maria Castro-Antunes, Sergio Crovella, Lucas André Cavalcanti Brandão, Rafael Lima Guimarães, Valentina Zanin, Maria Eugênia de Faria Motta, Giselia Alves Pontes da Silva.

Word Count: 2951

Dear Dr Eric Sibley:

We would like to submit the enclosed material for possible publication in JPGN, as original article. It has not been submitted for publication nor has it been published in whole or in part elsewhere. I attest to the fact that all authors listed on the title page have contributed significantly to preparing the manuscript, attest to the validity and legitimacy of the data and its interpretation, and agree to its submission to JPGN.

The authors have declared that no conflict of interest exists and the study was funded by the Brazilian National Council of Technological and Scientific Development (CNPq). Copyright transfer and the signatures of all authors are attached with the manuscript.

Best regards,

Margarida Maria de Castro-Antunes

Department of Postgraduate Studies on Children and Adolescents' Health, Federal University of Pernambuco (UFPE).

Apêndice B – Termo de consentimento Livre e Esclarecido

Número: _____ - _____ - _____
(Form) (fam) (par)

I. Dados de identificação do sujeito da pesquisa:

Nome do paciente: _____

Nome do responsável legal: _____

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.): _____

Documento de identidade: _____

Pesquisadoras responsáveis:

Giselia Alves Pontes da Silva CRM: 3640 – Cremepe

Margarida M de Castro Antunes CRM-12414 – Cremepe – Fone: 99653037

E-mail: margarida.mmcastro@gmail.com

II. Informações sobre a pesquisa:

Título: Marcadores genéticos de histocompatibilidade linfocitária em familiares de primeiro grau de pacientes celíacos

1. A pesquisa será realizada em familiares de pacientes portadores de doença celíaca.
2. Esse estudo poderá trazer contribuições para o diagnóstico da doença celíaca, inclusive em crianças sem sintomas, para tentar prevenir as complicações dessa doença (desnutrição, anemia, osteoporose, infertilidade entre outras) por meio do tratamento precoce.
3. Será coletado 5 ml de sangue para pesquisa de marcadores genéticos e anticorpo anti-transglutaminase. A coleta de sangue será feita com o máximo de cuidado para não causar dor e será coletada a menor quantidade necessária de sangue.
4. Os indivíduos que tiverem esses exames positivos serão chamados para completar a investigação da doença. Aqueles que tiverem diagnóstico de doença celíaca serão encaminhados para acompanhamento e tratamento da doença.
5. Garantimos que todas as informações obtidas serão confidenciais, que os dados referentes a seu filho ou a você podem ser excluídos do estudo a qualquer momento em que você julgar necessário, que ele ou você não sofrerão nenhuma restrição de tratamento, caso haja negação para participar do estudo, e que a divulgação de qualquer informação que permita identificá-lo, um de seus familiares, ou pessoas que moram em sua casa, pode implicar em processo judicial contra nós.
6. A participação no estudo é inteiramente voluntária e não existirá nenhuma taxa, nem recompensa financeira para os participantes e suas famílias.
7. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa em seres humanos do Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira – IMIP sob o número 892 de 10/11/2006.

III. Consentimento da participação do sujeito

Eu, _____, responsável pelo menor _____, declaro que fui devidamente informado pela pesquisadora Margarida Maria de Castro Antunes sobre a pesquisa *Marcadores genéticos de histocompatibilidade linfocitária em familiares de primeiro grau de pacientes celíacos*, estou consciente das condições sobre a minha participação no estudo descritas no item anterior e concordo com a participação na pesquisa.

Recife, ____ de _____ de _____.

Assinatura do responsável.

Apêndice C – Carta de convocação para a pesquisa

Prezado (a) Senhor (a): _____

O (a) seu (sua) filho (a) _____ está convidado a participar de estudo sobre a doença celíaca, juntamente como os seus familiares de primeiro grau – pai, mãe e irmãos e/ou filhos. Esse estudo será realizado no IMIP e Hospital das Clínicas da UFPE em Recife – PE

Para maiores informações favor entrar em contato com Dra. Margarida Antunes no telefone (81) **92930861** ou comparecer ao Ambulatório de Pediatria do IMIP numa sexta-feira pela manhã.

Solicitamos que, se possível, venham os dois pais e os irmãos do paciente.

Atenciosamente,

Margarida Antunes.

E-mail: margarida.mmcastro@gmail.com

Identificação: _____

Formulário da pesquisa: marcadores genéticos de histocompatibilidade em familiares de primeiro grau de pacientes celíacos

Data: / / (dd/mm/aaaa)

- Os campos **com grifo** serão preenchidos posteriormente
- Nos formulários aplicados às crianças e adolescentes a pergunta será dirigida ao responsável e trocado o termo você do início da frase por ele (a).

Identificação:

- Nome: _____
- Número do formulário: **{form}**
- Número da família: **{fam}**
- Parentesco com o caso índice **{parente}**: (0 - caso índice, 1-pai, 2-mãe, 3-irmão, 4- filho, 5-meio irmão, 6- gêmeo dizigótico, 7- gêmeo monozigótico, 8- gêmeo sem informação, 9 - outros).
- Nome do caso índice:

Nome	do	caso	índice:

- Endereço: _____

- Fone: _____
- Data de nascimento: / / Idade em meses **{idmeses}**:
- Sexo **{sexo}**: (1-masculino, 2-feminino).

Exame físico:

- Peso: , kg **{peso}**.
- Percentil do peso {ppeso}**: ,
- Altura: , cm **{altura}**.
- Percentil da estatura {pest}**: ,
- IMC **{imc}**:
- Percentil do imc {pimc}**: ,

Antecedentes (Só para crianças menores de 12 anos):

- Tipo de parto **{parto}**: normal (1) cesárea (2) não informada (9) não se aplica (8)
- Peso do nascimento **{pnasc}**: g
- Ele nasceu antes do tempo? **{prem}**: (1-sim, 0-não, 9-não sabe, 8-não se aplica)
- Ficou internado no berçário ou UTI neonatal quando nasceu? **{uti}**:
- Ele mamou no peito? **{aleit}**:
- Por quanto ele mamou no peito **{tleit}**?
 não fez
 um mês
 de 2 a 4 meses
 de 5 a 6 meses
 mais de 6 meses
 não sabe/não informou
 não se aplica

- Quando a senhora começou a oferecer água e/ou chá e/ou leite na mamadeira e ou chuchinha? **{aleitexcl}**:

- não fez
- um mês
- de 2 a 4 meses
- de 5 a 6 meses
- mais de 6 meses
- não sabe/não informou
- não se aplica

- Com que idade a senhora ofereceu a ele outros alimentos diferentes de leite? **{dieta}**:

- não fez
- um mês
- de 2 a 4 meses
- de 5 a 6 meses
- mais de 6 meses
- não sabe/não informou
- não se aplica

- Ele esteve internado no primeiro ano de vida? **{inter}**:

- não esteve
- uma vez
- duas vezes
- mais de duas vezes
- não sabe/não informou
- não se aplica

- Se sim a pergunta 20: qual a causa do(s) internamento(s):

- Diarréia
- Vômitos
- Desidratação
- Cirurgia
- Pneumonia
- outras doenças respiratórias
- outras causas. Qual? _____

Sintomas:

- Nos últimos três meses você tem tido perda de peso **{perdpeso}**? sim
 não não informado não se aplica

- Você tem tido enjôo/ náusea mais de três vezes ao mês **{náusea}**? sim não não informado não se aplica

- Você tem tido vômitos **{vomito}**? sim não não informado não se aplica

Se a resposta da questão 31 for sim responder a questão 32

- Você tem tido vômitos mais de três vezes nos últimos três meses **{vomito}**? sim não não informado não se aplica

33. Você tem tido dor na barriga {dorabd}? 1 sim
 0 não 9 não informado 8 não se aplica
Se a resposta da questão 33 for sim responder a questão 34

34. Você tem dor na barriga por mais de três meses ou mais de três dias no mês {dorabd}? 1 sim
 0 não 9 não informado 8 não se aplica

35. Você tem tido diarreia e/ou fezes amolecidas ou líquidas mais de três vezes ao dia {diarreia}? 1 sim 0 não 9 não informado 8 não se aplica
Se a resposta da questão 35 for sim responder a questão 36

36. Você tem diarreia todos os dias há mais de um mês e/ou mais de três vezes nos últimos dois meses {diarreia}? 1 sim 0 não 9 não informado 8 não se aplica

37. Você tem tido empachamento ou dificuldade de fazer a digestão {empach}? 1 sim 0 não 9 não informado 8 não se aplica
Se a resposta da questão 37 for sim, responder às questões 38:

38. Você tem empachamento ou dificuldade de fazer a digestão todos os dias e/ou mais de três vezes nos últimos três meses {empach}? 1 sim
 0 não 9 não informado 8 não se aplica

39. Você tem tido barriga inchada {distabd}? 1 sim
 0 não 9 não informado 8 não se aplica
Se a resposta da questão 39 for sim, responder à questão 40:

40. Você teve barriga inchada todos os dias há mais de um mês e/ou mais de três vezes nos últimos três meses {distabd}? 1 sim 0 não 9 não informado 8 não se aplica

41. Você tem tido aumento de gases {flatu}? 1 sim
 0 não 9 não informado 8 não se aplica
Se a resposta da questão 41 for sim, responder à questão 42

42. Você teve aumento de gases todos os dias há mais de um mês e/ou mais de três vezes nos últimos três meses {flatu}? 1 sim 0 não 9 não informado 8 não se aplica

43. Você tem tido intestino preso e/ou dificuldade para evacuar e/ou fezes duras e/ou fezes grossas ou grandes {const}? 1 sim 0 não 9 não informado 8 não se aplica
Se a resposta da questão 43 for sim, responder à questão 44:

44. Você tem intestino preso todos os dias no último mês e/ou mais de três vezes nos últimos três meses {const}? 1 sim 0 não 9 não informado 8 não se aplica

45. Você tem tido aftas na boca {afta}? 1 sim
 0 não 9 não informado 8 não se aplica
Se a resposta da questão 45 for sim, responder à questão 46:

46. Você teve afta mais de três vezes nos últimos três meses {afta}? 1 sim 0 não 9 não informado 8 não se aplica

47. Nos últimos três meses você tem sentido dor nas juntas, mais uma vez por mês? {dorart} 1 sim
 2 não 9 não informado 8 não se aplica

48. Nos últimos três meses, você sente falta de disposição e/ou dificuldades para fazer suas atividades e/ou tarefas diárias {fadiga}? 1 sim
 0 não 9 não informado 8 não se aplica

49. Nos últimos três meses, você fica irritado sem motivo {irritab}? 1 sim 0 não 9 não informado 8 não se aplica

50. Nos últimos três meses, você tem dificuldade para dormir e/ou falta de sono {insônia}? 1 sim
 0 não 9 não informado 8 não se aplica

51. Nos últimos três meses, seu cabelo tem caído muito e/ou tem locais da cabeça com falta de cabelo {alopecia}? 1 sim 0 não 9 não informado 8 não se aplica

52. Você tem tido bolhas na pele (Dermatite herpetiforme) {dermat}: 1 sim 0 não 9 não informado 8 não se aplica

• Condições associadas:
Alguma vez o médico ou enfermeiro ou dentista lhe falou que você tinha uma das doenças abaixo:
1- sim, 0- não, 9- não informado, 8- não se aplica

53. Anemia
54. Tireoidite
55. Diabetes Que toma insulina
56. Reumatismo/doenças reumatológicas
57. Osteoporose
58. Epilepsia ou convulsão
59. Depressão
60. Dermate herpetiforme
61. Síndrome de Down
62. Doença nos rins

Identificação: _____-_____

Formulário da pesquisa: marcadores genéticos de histocompatibilidade em familiares de primeiro grau de pacientes celiacos

Data: / / (dd/mm/aaaa)

- > Os campos **com grifo** serão preenchidos posteriormente
- > Nos formulários aplicados às crianças e adolescentes a pergunta será dirigida ao responsável e trocado o termo você do início da frase por ele (a).

Identificação:

Nome: _____

Endereço: _____

Fone: _____

Hospital: _____

Número do registro no hospital: _____

1. Data de nascimento: / /

Diagnóstico:

Data do resultado da 1ª biópsia: ____/____/____

2. Idade do diagnóstico em meses: _____

3. Início da dieta sem glúten: _____

4. Peso no diagnóstico: _____ kg

5. Estatura do diagnóstico: _____ cm

Sintomas: Assinale os prévios ao diagnóstico

Gastro-intestinais:

- Perda de peso
- Dor abdominal
- Diarréia
- Flatulência
- Distensão abdominal
- Constipação
- Aftas
- Outros _____

Extra-intestinais:

- Dor articular
- Astenia
- Irritabilidade
- Insônia
- alterações dentárias
- alopecia
- Outros _____

Sorologias

1. Anticorpo anti-transglutaminase (TTG): _____ (valor em UI/L)
 2. Anticorpo anti-endomíseo {EMA}: _____ (valor em ui/l)
 3. Anticorpo anti-gliadina IGA (AGA IGA) _____ (valor em UI/L)
 4. Anticorpo anti-gliadina IGG (AGA IGG) _____ (valor em UI/L)
 5. HLA {DQ2}: _____ DQA*105(1) ___ DQB1*02(2) ___ negativo (3) ___ não informado (4)
 6. HLA {DQ8}: _____ DQB1*0302(1) ___ negativo (3) ___ não informado (4)
 7. Biópsia intestinal {biópsia}: _____ tipo 0(0) ___ tipo I(1) ___ tipo II(2) ___ tipo III(3)
 8. Linfócitos intra-epiteliais {linfoc}:
 - ___ menos de 20/100 enterócitos (1)
 - ___ de 20 a 30/100 enterócitos (2)
 - ___ mais de 30/100 enterócitos (3)
 9. Hemoglobina {hb}: _____ mcg/dl
- Cintilografia óssea {cintilog}: ___ normal (0) ___ Osteopenia(1) ___ osteoporose(2) ___ não informado (9)

1 biópsia:

Data: _____

Laudos: _____

Médico: _____

Laboratório: _____

Numero: _____

2 biópsia:

Data: _____

Laudos: _____

Médico: _____

Laboratório: _____

Numero: _____

1 biópsia:

Data: _____

Laudos: _____

Médico: _____

Laboratório: _____

Numero: _____

8 - ANEXOS



Anexo A – Comprovação de submissão do Artigo original II

Dec 08, 2009

Dear Dr. castro-antunes,

Your submission entitled "Frequency distribution of HLA DQ2 and DQ8 among celiac and first-degree relatives in Recife, northeastern Brazil" has been assigned the following manuscript number: JPGN-NA-09-236.

If you have not already done so, please fax a copyright transfer form with all authors' signatures (or multiple forms signed individually) to 215 521 8488. Please be sure to include the manuscript number on the form: JPGN-NA-09-236. A copy of the form can be obtained via the link below.

Copyright Transfer Form (PDF)

You may check on the progress of your submission at any time by logging in to Editorial Manager as an author.

Thank you for submitting to the Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition.

Regards,

Jodie Strusz
Managing Editor
Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition
<http://jpgn-na.edmgr.com>

Anexo B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira

Instituto Materno Infantil
Prof. Fernando Figueira
Escola de Pós-graduação em Saúde Materno Infantil
Instituição Civil Filantrópica

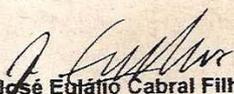


CÓPIA

DECLARAÇÃO

Declaro que o Projeto de pesquisa nº. 893, intitulado **“Sorologia anti-transglutaminase e perfil de histocompatibilidade linfocitária em portadores de doença celíaca e seus familiares”**, apresentado pela Pesquisadora **Giselia Alves Pontes da Silva**, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira – IMIP, em Reunião Ordinária de 05 de outubro de 2006.

Recife, 10 de novembro de 2006.


Dr. José Ebrálio Cabral Filho
Coordenador do Comitê de Ética
em Pesquisa em Seres Humanos do
Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira

UTILIDADE PÚBLICA MUNICIPAL - Dec. Lei 9851 de 03.11.67
UTILIDADE PÚBLICA ESTADUAL - Dec. Lei 5013 de 14.05.84
UTILIDADE PÚBLICA FEDERAL - Dec. Lei 86238 de 30.07.81
INSCRIÇÃO MUNICIPAL 05.897-1
INSCRIÇÃO ESTADUAL Isento
CNPJ: 10.968.301/0001-29

Rua dos Coelhos, 300 Boa Vista
Recife - PE - Brasil CEP 50.070-550
PABX: (81) 2122.4100
Fax: (81) 2122.4722 Cx. Postal 355
e-mail: imip@imip.org.br
home page www.imip.org.br

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)