

Lucas Malta Almeida

**Prevalência de Doença Celíaca entre usuários idosos do
laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário de
Brasília.**

Brasília, 2012



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Prevalência de Doença Celíaca entre usuários idosos do
laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário de
Brasília.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Lucas Malta Almeida

Orientadora: Prof. Dra. Lenora Gandolfi

Brasília, 2012



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Prevalência de Doença Celíaca entre usuários idosos do
laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário de
Brasília.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Lucas Malta Almeida

Banca Examinadora:

Presidente: Profa. Dra. Lenora Gandolfi, FM/UnB;

Membro: Profa. Dra. Yolanda Galindo Pacheco, FM/UnB;

Membro: Profa. Dra. Inês Cristina dos Santos Modelli, FM/UnB;

Suplente: Profa. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto, FS/UnB.

Brasília, 2012

Dedico este trabalho...

À meus pais Nascimento e Joelize, que me apoiaram em minhas escolhas e decisões e, independentemente de qualquer situação, sempre dispuseram os meios para que pudesse alcançar meus objetivos de vida;

Aos meus irmãos Tárzis e Dener pelo companheirismo e pelos momentos de amizade que estão guardados na memória;

À minha querida esposa e amiga Indiara, que me apoiou e incentivou a realização deste curso e que me foi um alicerce nas frequentes decisões e indecisões que a vida proporciona.

AGRADECIMENTOS

Ao grande e eterno Deus que sempre ofereceu e proporcionou oportunidades de entrar em um caminho e sair dele com grandes conquistas e vitórias, apesar das dificuldades em trilhá-lo e também porque preparou pessoas aptas a me ajudar na busca pelos meus objetivos.

Aos meus pais, Nascimento e Joelice, que são capazes de dar tudo a favor do crescimento e bem estar dos seus filhos, pessoas estas que sempre me deram forças para continuar firme e constante no longo caminho da vida.

Aos meus queridos professores, Dra. Lenora Gandolfi, Dr. Riccardo Pratesi e Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega pelo apoio, acolhimento, ajuda e compreensão em todas as fases do desenvolvimento deste trabalho e também da minha vida, que compartilhei com eles.

Aos colegas do Centro de Pesquisa em Doença Celíaca (CPDC), Márcio Pinha, Felipe Ezequiel, Lucas Medeiros, Prof. Dra. Maria do Carmo, Rosângela, Sandra Maria Ferreira e seu filho Caique Ferreira pela ajuda na coleta dos dados, realização de exames e pela amizade, à Rosa Uenishi, Rodrigo Coutinho, Fernanda Coutinho, Luciana, Daniel, Lucas Biaggini, Dr. Ícaro Batista, Franco e Livia pela responsabilidade e compromisso com o CPDC e à Patrícia Fritsch por acreditar em meu trabalho, por ter aberto uma grande porta de entrada no mestrado e pela longa amizade.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Análises Clínicas por ter colhido material sanguíneo de grande parte dos idosos inclusos neste trabalho.

A todos os idosos que, com bom humor e generosidade, consentiram em participar deste trabalho.

Lista de tabelas.....	pág. VIII
Lista de siglas e abreviaturas.....	pág. IX
Lista de figuras.....	pág. X

SUMÁRIO

1. Resumo.....	pág. 10
2. Abstract.....	pág. 11
3. Introdução.....	pág. 12
4. Objetivo principal.....	pág. 29
4.1 Objetivo secundário.....	pág. 29
5. Materiais e Métodos.....	pág. 30
5.1 Coleta, processamento e armazenamento do sangue.....	pág. 31
5.2 Pesquisa de anticorpos IgA-tTG2.....	pág. 31
5.3 Pesquisa de anticorpos IgA-EMA.....	pág. 32
5.4 Extração de DNA.....	pág. 32
5.5 Tipagem de alelos HLA por PCR-SSP.....	pág. 33
5.6 Eletroforese em gel de agarose e fotodocumentação.....	pág. 35
5.7 Análise Estatística.....	pág. 35
6. Resultados.....	pág. 35
7. Discussão.....	pág. 39
8. Conclusões.....	pág. 48
9. Considerações finais.....	pág. 48
10. Bibliografia.....	pág. 49
13. Anexos.....	pág. 63
13.1 Análise do projeto de pesquisa e parecer do CEP-FM.....	pág. 63
13.2 TCLE.....	pág. 64
13.3 Questionário.....	pág. 66
13.4 Artigo Científico.....	pág. 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências dos *primers reverse* e *forward* de alelos HLA-MHC-II que predisõem à DC de acordo com Olerup *et al.* 1993.

Tabela 2 – Dados clínicos e laboratoriais de nove indivíduos com resultados anormais para IgA-tTG2 (ELISA).

Tabela 3 – Prevalência de DC entre 946 idosos e entre 2034 crianças e adolescentes pertencentes à mesma região geográfica e pertencentes a classe social similar.

Tabela 4 – Avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CEP-FM – Comitê de ética em pesquisa em seres humanos – Faculdade de Medicina

CLSI – *Clinical Laboratory and Standards Institute*

dC – Depois de Cristo

DC – Doença Celíaca

DQA – Alelo que codifica a cadeia α do heterodímero que o inclui

DQB – Alelo que codifica a cadeia β do heterodímero que o inclui

ESPGAN – Sociedade Européia de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica

HLA – Antígeno leucocitário Humano

HLA-DQ2 – Heterodímero do antígeno leucocitário humano codificado pelos alelos

DQA1*02 e DQB1*05

HLA-DQ8 – Heterodímero do antígeno leucocitário humano codificado pelos alelos

DQA1*03 e DQB1*03:02

HUB – Hospital Universitário de Brasília

IELs – Linfócitos Intraepiteliais

IgA – Imunoglobulina de classe A

IgA-EMA – Anticorpos IgA anti-endomísio

IgA-tTG2 – Anticorpos IgA anti-transglutaminase

IgG – Imunoglobulina de classe G

IgG-tTG2 – Anticorpos IgG anti-transglutaminase

IL – Interleucina

LPC – Laboratório de Patologia Clínica

MHC-II – Complexo principal de histocompatibilidade II

MPs – Metaloproteinases

PBS – Tampão fosfato salino

PCR-SSP – Reação em cadeia de polimerase usando iniciadores (*primers*) sequência-específicos

RBC – Tampão de lise de células vermelhas

RPM – Rotações por minuto

TBE – Tampão tris-borato-EDTA

TCLE – Termo de consentimento livre e esclarecido

tTG(s) – Transglutaminase(s)

tTG2 – Transglutaminase humana 2

UA – Unidades arbitrárias

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mucosa intestinal mostrando a variação de suas histologias quando um indivíduo celíaco é exposto ao glúten. **a** – normal (grau 0); **b** – pequenas anormalidades (grau I); **c** – linfócitos intraepiteliais (IEL) em mucosa anormal; **d** – anormalidade moderada (grau II); **e** – anormalidade severa (grau III). Adaptado de Bhatnagar *et al.*, 2005.

Figura 2 – Modelo do Iceberg da Doença Celíaca, mostrando as diversas formas de apresentação desta doença que existem em Celíacos não clássicos. Fonte: Hopper *et al.* 2007, com modificações.

Figura 3 – A modificação pós-tranlacional de peptídeos do glúten e proteínas afins, aumenta suas afinidades pelo heterodímero HLA predisponente à DC. Peptídeos do glúten são um ótimo substrato para a enzima transglutaminase 2 (tTG2) que converte resíduos de glutamina em glutamato na presença de íons Ca^{2+} . Este processo, chamado de desaminação, gera peptídeos com resíduos de aminoácidos com carga negativa (ácido glutâmico (E)), que se ligam com alta afinidade às moléculas HLA-DQ2 e HLA-DQ8. O antígeno é ancorado preferencialmente, nas fendas P4, P6 e P7 no HLA-DQ2 e P1 e P9 no HLA-DQ8, as quais têm preferência por resíduos de aminoácidos com carga negativa, muito embora outros sítios de ligação dos diversos antígenos gerados pela proteólise intestinal e desaminação do glúten possam existir, como mostrado na figura (fragmentos γ ligados nas fendas P1, P4 e P9 do HLA-DQ2 e DQ8, embora a afinidade da ligação ocorra na fenda P4 para o HLA-DQ2 e P1 e P9 para HLA-DQ8. Adaptado de Abadie *et al.* (2011) e Qiao *et al.*, (2009).

Figura 4 – Mucosa intestinal em processo de lesão, que é causada por complexos mecanismos moleculares e inclui características morfológicas como aumento no número de linfócitos intraepiteliais (IELs), atrofia vilositária e hiperplasia de criptas. Existe, também, um aumento no número de células T CD4+ e células plasmáticas na lâmina própria. Os fragmentos do glúten atravessam a membrana epitelial, são reconhecidas e deaminadas pela enzima transglutaminase 2 (htTG 2) e apresentadas pelas células apresentadoras de antígenos (APC) para células T CD4+. Células plasmáticas são recrutadas, por sinalizadores produzidos por células T CD4+, e estimuladas a secretar anticorpos (IgA) contra a gliadina deaminada e contra a htTG 2 anticorpos estes que alcançam o lúmen intestinal como secreção de IgA e a corrente sanguínea, ou formam imuno-complexos com a htTG 2 sob o epitélio intestinal. Adaptado de Sollid e Lundin, 2009.

Figura 5 – Cortes criostáticos transversais de esôfago de macaco *Rhesus* fixados em lâmina (INOVA Diagnostics, inc. San Diego, CA) e incubados com soro sanguíneo (1:5 em tampão PBS) e posteriormente, após lavagens, com anticorpos anti-IgA humano marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). **A** – Endomísio negativo (setas) evidenciando a ausência de anticorpos IgA anti-endomísio neste paciente. **B** – Endomísio positivo (setas) evidenciando a presença de anticorpos IgA anti-endomísio neste paciente. Aumento: 400x. Imagem: Centro de Pesquisa em Doença Celíaca.

Figura 6 – Porcentagem de indivíduos acima de 60 anos de acordo com o sexo e considerando um tamanho amostral de 946 indivíduos.

Figura 7 – Pirâmide Etária separada por sexo dos indivíduos acima de 60 anos de acordo com a frequência de ocorrência dentro de suas respectivas idades (n = 946). **F** – Feminino; **M** – Masculino.

1. Resumo

Introdução: Inicialmente enfocada por Arateus da Capadócia no século II dC e posteriormente novamente descrita por Samuel Gee em 1888 a doença celíaca é uma afecção crônica de origem auto-imune que concomitantemente afeta o sistema gastrointestinal e vários outros órgãos e sistemas e que é induzida pela ingestão de glúten em indivíduos geneticamente predispostos. As anormalidades clássicas da DC são predominantemente caracterizadas por atrofia das vilosidades intestinais, hipertrofias das criptas e infiltração linfocitária da mucosa jejunal secundárias a resposta auto-imune mediada por linfócitos T à enzima transglutaminase 2. **Objetivos:** Determinar a prevalência de DC entre idosos (≥ 60 anos) e comparar com grupo de crianças com prevalência de DC determinada pertencentes a mesma área e com similar nível socioeconômico. **Métodos:** Amostras de sangue de 946 idosos foram testados quanto à presença de anticorpos IgA anti-transglutaminase (IgA-tTG2) e naqueles que tinham níveis anormais destes anticorpos, foi realizado o teste IgA anti-endomísio (IgA-EMA) e tipagem de alelos HLA predisponentes. **Resultados:** Um dentre 946 indivíduos era celíaco diagnosticado por biópsia e dentre os nove pacientes com níveis anormais de IgA-tTG2, nenhum tinha positividade para o teste IgA-EMA e seis tinham alelos HLA-DQ2 ou HLA-DQ8 ou ambos. **Conclusões:** No presente estudo, a prevalência de DC no grupo estudado foi 5,4 vezes maior do que a encontrada em crianças e adolescentes na mesma região geográfica. Sem excluir as outras possíveis causas, a razão mais provável para esta diferença entre os grupos é um aumento da mortalidade entre pacientes celíacos associado com condições ambientais adversas.

Palavras-chave: Doença Celíaca, Epidemiologia, Idosos, Mortalidade.

2. Abstract

Introduction: Initially described by Arateus of Cappadocia in the second century AD and later re-described by Samuel Gee in 1888, celiac disease (CD) is a chronic autoimmune disease that simultaneously affects the gastro-intestinal system and various other organs and systems and is induced by the ingestion of gluten in genetically predisposed individuals. The classical DC clinical picture is predominantly characterized by intestinal villous atrophy, crypt hyperplasia, and lymphocytic infiltration of the jejunal mucosa secondary to autoimmune response to the enzyme transglutaminase 2 mediated by T lymphocytes. **Objective:** The aim of this study was to determine the prevalence of celiac disease (CD) in a group of Brazilian individuals over 60 years of age and compare it with the previously known prevalence in the pediatric population of the same area. To date, the limited number of studies addressing this issue report contradictory results. **Methods:** Blood samples from 946 outpatients aged 60 years or older were tested for immunoglobulin A anti-transglutaminase antibodies by ELISA. All positive sera were further tested for anti-endomysium antibodies. HLA genotyping was performed for all individuals who exhibited discrepant serologic results. **Results:** Among the 946 subjects only one previously diagnosed case of biopsy-proven CD was detected. Among the remaining subjects, nine tested positive for immunoglobulin A anti-transglutaminase antibodies; however, none of them tested positive for immunoglobulin A human anti-endomysium antibodies. HLA genotyping of those nine subjects revealed six individuals positive for DQ2, DQ8 or both alleles. **Conclusions:** In the present study, the prevalence of CD in the studied group was 5.4 times lower than the one found in children and adolescents. Without excluding other possible causes, the most likely reason for this difference is increased CD patient mortality associated with adverse environmental conditions.

Key words: Celiac disease, Epidemiology, Elderly, Mortality.

3. Introdução

A Doença Celíaca (DC) é uma doença autoimune muito presente na população ocidental, e pode ter um histórico antigo que remete aos primeiros séculos depois de Cristo (dC) (Tack *et al.*, 2010). A primeira descrição de uma afecção similar à DC foi feita por Aretaeus da Capadócia no II século dC durante um período de rápido desenvolvimento sócio-econômico, quando a agricultura se espalhou pela fértil região do oriente médio. No entanto nenhuma relação desta afecção com o consumo de trigo e/ou outros cereais foi feita na época (Tommasini *et al.*, 2011). Após este início promissor somente em 1888 Samuel Gee voltou a descrever, com mais detalhes, os típicos sintomas dessa desordem que incluía irritabilidade, diarréia crônica e dificuldades no crescimento denominando-a de “afecção celíaca”, com base no termo grego *koiliakos* que se refere ao abdome, por ser uma desordem do aparelho digestivo que se caracteriza pela presença de muita gordura nas fezes (esteatorréia) (Losowsky, *et al.*, 2008). Já nessa época, foi sugerida, pela primeira vez, uma dieta para tratar esta doença embora Gee tenha falhado na identificação do alimento que causava esta desordem (Tommasini *et al.*, 2011).

As décadas seguintes ao descobrimento da DC foram marcadas por um aumento no número de casos diagnosticados de crianças portadores da DC, que apresentavam abdome distendido, fezes com excesso de gordura e dificuldade em ganhar peso, fatos estes que sugeriram má-absorção de nutrientes pelo intestino. Desde então várias tentativas foram sugeridas para curar a DC por meio de dietas. Esta doença ocorria frequentemente em crianças que passavam de uma dieta baseada exclusivamente em leite para uma baseada em cereais, assim foi sugerido que os cereais poderiam estar desencadeando esta doença sendo que a primeira hipótese, em 1921, foi direcionada para os açúcares presentes nestes alimentos, teoria esta que seria desmentida em 1949 pelo pediatra holandês Wilhelm Karel Dicke (Tommasini *et al.*, 2011). A dieta isenta de glúten foi definitivamente estabelecida como tratamento efetivo da DC a partir de 1940 com os estudos de Dicke, durante o período de escassez de alimentos provocados pela II guerra mundial, que confirmou suas observações anteriores de que a isenção de cereais na dieta levava à melhora clínica dos pacientes celíacos (Auricchio e Troncone, 1996; Losowsky, *et al.*, 2008). Em 1950, Dicke *et al.* sugeriram que o efeito danoso causado em paciente com DC era produzido por uma desconhecida substância presente na farinha de trigo e chamou esta substância de “fator do trigo”.

Posteriormente a presença da DC foi sendo evidenciada por meio da prática

clínica e por meio de testes que conseguiam detectar a presença desta doença, que incluía biópsia intestinal. Com o passar do tempo, o conhecimento da DC foi se tornando comum e testes mais sensíveis e específicos foram desenvolvidos. Já em 1975, evidências sugeriam que haveria, na mucosa intestinal, uma resposta humoral e uma resposta celular contra a gliadina, um dos fragmentos do glúten gerado por sua proteólise no trato gastrointestinal, e também contra outros antígenos que até então eram desconhecidos (Ferguson *et al.*, 1975). Entretanto em 1997, baseado na existência de anticorpos IgA anti-endomísio (IgA-EMA) em pacientes celíacos, um grupo de pesquisadores conseguiu isolar a enzima transglutaminase (tTG) como sendo o principal, ou possivelmente o único auto-antígeno presente no endomísio (tecido conectivo que reveste as fibras da musculatura lisa) e que é reconhecido por anticorpos IgA presentes no soro sanguíneo de celíacos (Dieterich *et al.*, 1997). A DC está associada com uma resposta imunológica mediada pelas imunoglobulinas de classe A (IgA) e/ou imunoglobulina de classe G (IgG) contra fragmentos protéicos do glúten (proteína abundante no trigo), e contra fragmentos de outras proteínas similares ao glúten, encontradas em cereais filogeneticamente próximos ao trigo (centeio e cevada) (Green e Cellier, 2007). Assim, foi descoberto que a DC afeta aproximadamente 1% da população mundial, sendo aparentemente mais afetados indivíduos de descendência caucasiana (van Heel e West, 2006).

Tanto a resposta imunológica celular quanto a humoral contribuem para o desenvolvimento de atrofia nas vilosidades intestinais, hiperplasia de criptas e infiltração linfocitária da mucosa intestinal (Dieterich *et al.*, 1997) (Figura 1) com consequente má-absorção de importantes nutrientes como ferro, folato, cálcio e vitaminas lipossolúveis (D, E, A e K) (Johnson *et al.*, 2008). Estes típicos danos intestinais encontrados em paciente celíacos, que resultam na perda da capacidade absorptiva das vilosidades intestinais e na hiperplasia de criptas, desaparecem totalmente na maioria dos pacientes após a introdução de uma dieta livre de glúten (Fasano e Catassi, 2001).

Estas anormalidades vistas na mucosa intestinal resultantes da DC foram classificadas por Marsh *et al.* (1992), em: Marsh 0, mucosa com vilosidades normais; Marsh I, lesões infiltrativas na mucosa intestinal; Marsh II, lesões hiperplásicas com infiltração linfocitária; Marsh III (a,b e c), atrofia vilositária parcial ou total. Entretanto Bhatnagar *et al.* (2005) propuseram uma modificação para esta classificação sendo: grau 0 com histologia normal (Figura 1a), grau I quando a presença de linfócitos

intraepiteliais (IELs) na mucosa intestinal é maior do que 40 IELs por 100 enterócitos (Figura 1b e c), grau II mucosa moderadamente inflamada com hiperplasia de criptas (Figura 1d) ou grau III com atrofia vilositária, linfócitos intraepiteliais e hiperplasia de criptas (Figura e) (Bathnagar *et al.*, 2005).

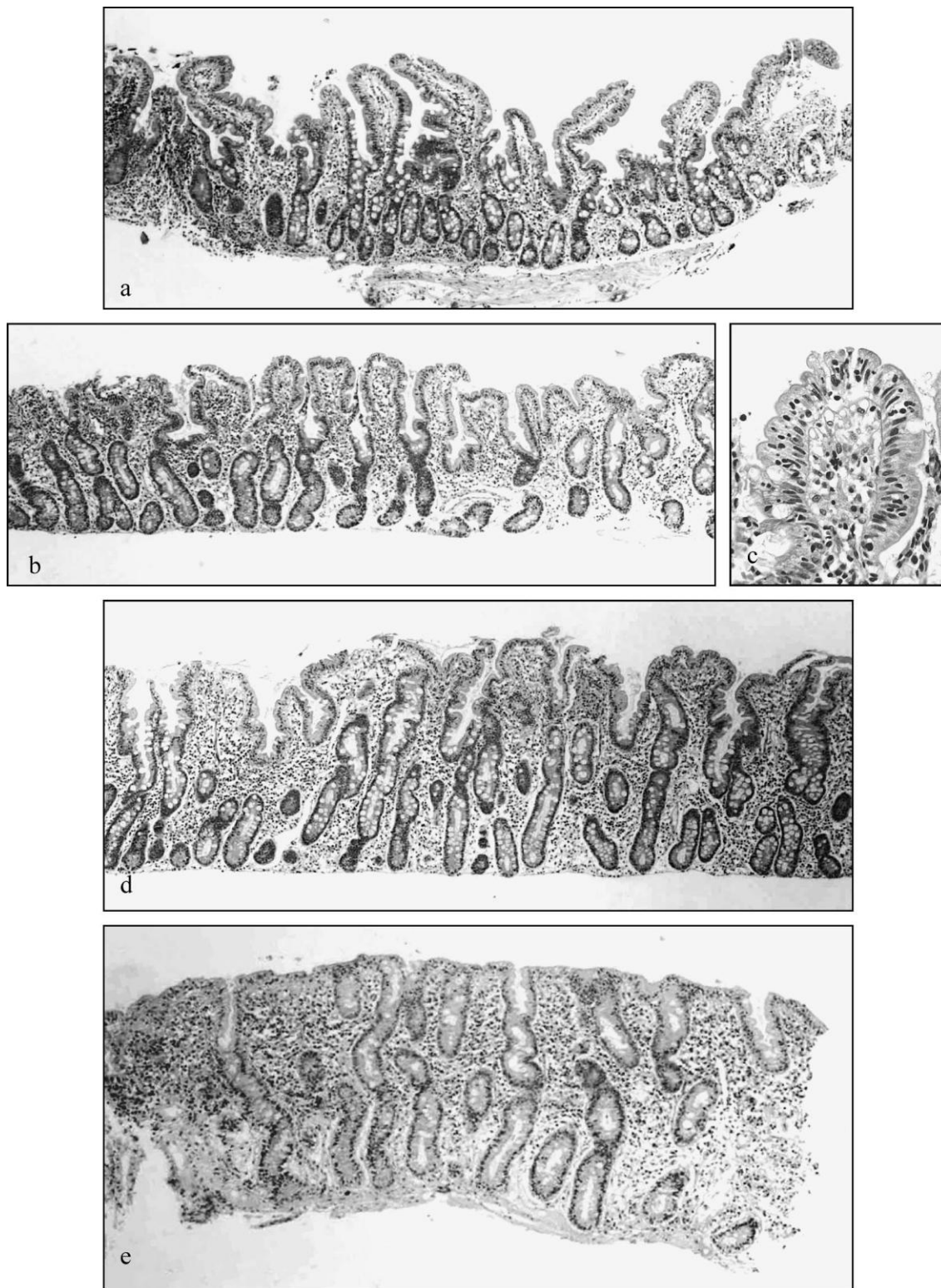


Figura 1 – Mucosa intestinal mostrando a variação de suas histologias quando um indivíduo celíaco é exposto ao glúten. **a** – normal (grau 0); **b** – pequenas anormalidades (grau I); **c** – linfócitos intraepiteliais (IEL) em mucosa anormal; **d** – anormalidade moderada (grau II); **e** – anormalidade severa (grau III). Adaptado de Bhatnagar *et al.*, 2005.

Os sintomas clássicos relacionados com a DC são má absorção, diarreia, esteatorreia que é sugerido pela perda da coloração das fezes e presença de gordura

nelas, perda de peso, atraso no desenvolvimento de crianças (Di Sabatino e Corazza, 2009). Este padrão clássico de DC era o mais frequentemente diagnosticado antes do advento de técnicas sorológicas mais sensíveis e específicas, que permitiram amplos estudos de rastreamento, evidenciando a existência de numerosos pacientes celíacos com sintomatologia mínima, tão somente restrita a vago desconforto abdominal e indefinido mal-estar além de diarreia ocasional (Green e Cellier, 2007). Adicionalmente, em sendo a DC uma doença inflamatória sistêmica que pode potencialmente afetar vários outros órgãos e sistemas, existe um número significativo de pacientes celíacos que não apresenta alterações gastrointestinais importantes, onde os sintomas ocorrem fora do trato gastrointestinal, como o caso da dermatite herpetiforme que é uma manifestação cutânea da DC e afeta cerca de 25% dos celíacos (Collin e Reunala, 2003), da tireoidite, da anemia por deficiência de ferro resistente ao tratamento, osteopenia e/ou osteoporose (Freeman, 2008).

Diante do largo espectro de apresentação da DC nos mais diversos grupos e faixas etárias, os vários aspectos desta desordem foram exemplificados e caracterizados através de um modelo de “iceberg” (Figura 2) onde a ponta do iceberg (1º estrato) simboliza a DC clássica, a qual é facilmente diagnosticada pela presença de sintomas gastrointestinais como esteatorréia, diarreia crônica (Leeds *et al.*, 2008) além de problemas na absorção de alimentos (West *et al.*, 2007), evidenciada por dificuldades no crescimento e perda de peso. Já a parte submersa dita atípica ou silenciosa (2º estrato) simboliza o grupo de celíacos não-diagnosticados clinicamente por possuírem outros sintomas que se apresentam fora do trato gastrointestinal, como problemas na tireóide, dermatite herpetiforme, aftas recorrentes, diabetes melitus tipo I, síndrome de Sjögren e anemia (Green *et al.*, 2001; Sanders *et al.*, 2002) além de perda de peso, fadiga, artrite, depressão e problemas neurológicos (Hopper *et al.*, 2007). Mesmo tendo mucosa intestinal com histologia anormal evidenciada por elevado número de linfócitos intraepiteliais, sorologia positiva, ter parentes com DC diagnosticada e alelos HLA predisponentes, muitos destes indivíduos podem ser celíacos assintomáticos (Vereckei *et al.*, 2011). A DC latente (3º estrato) descreve dois grupos de pacientes ambos com alelos HLA predisponentes para a DC, aquele que teve biópsia duodenal normal em algum estágio da vida com dieta regular, sem a exclusão de glúten, e posteriormente desenvolveram atrofia das vilosidades intestinais e aquele grupo que tinha biópsia duodenal compatível com a DC, e após certo tempo (~2 anos) em dieta com glúten, apresentava mucosa duodenal normal (Ferguson, 1993) entretanto é raro encontrar

celíacos latentes (Leeds *et al.*, 2008). Estes pacientes podem ser assintomáticos, ter histologia duodenal com níveis de linfócitos intraepiteliais aumentado, além de serem HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8 positivos (Vereckei *et al.*, 2011).

Existem indivíduos que não possuem alterações histológicas na mucosa intestinal nem aumento no número de linfócitos intraepiteliais além de possuir alelos HLA predisponentes para a DC (4º estrato) (Leeds *et al.*, 2008), são assintomáticos, com sorologia negativa mas com potencial de desenvolver a DC em algum momento de suas vidas (Vereckei *et al.*, 2011). Interessantemente, indivíduos dos grupos representados pelos três estratos mais superficiais do modelo do “iceberg” (Figura 2) podem apresentar vários graus de severidade da doença (WEST *et al.*, 2007). O conhecimento das várias formas de apresentação da DC contribui para um melhor diagnóstico em casos com DC de difícil reconhecimento, demonstra a variabilidade clínica desta desordem nos pacientes afetados e ajuda a entender sua natureza sistêmica (Leeds *et al.*, 2008).

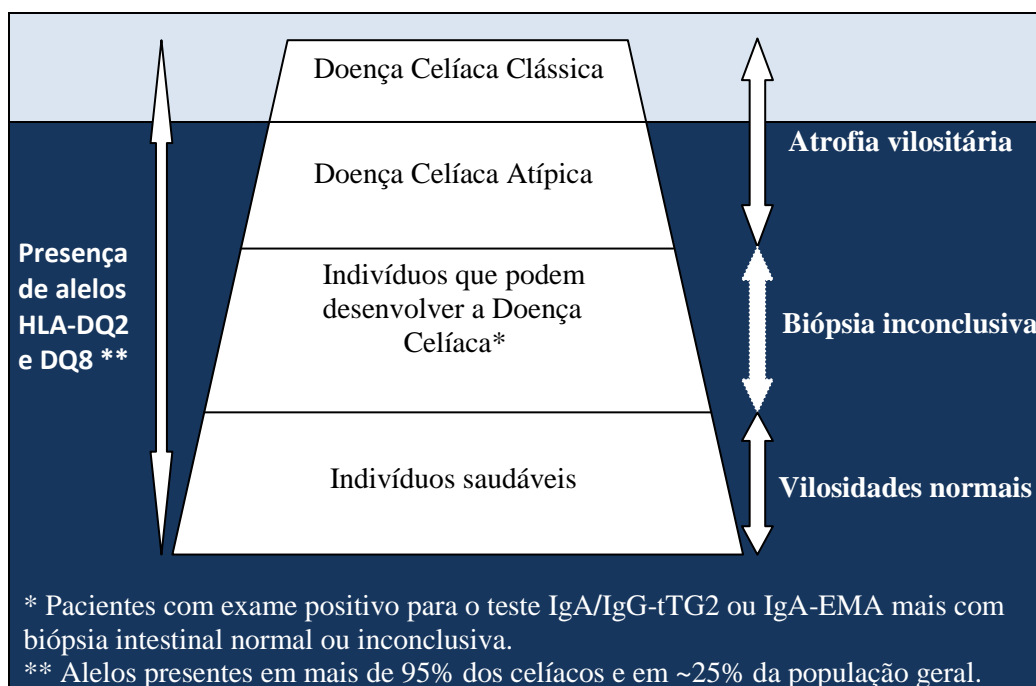


Figura 2 – Modelo do Iceberg da Doença Celíaca, mostrando as diversas formas de apresentação desta doença que existem em Celíacos não clássicos. Fonte: Hopper *et al.* 2007, com modificações.

Os critérios da ESPGAN (1990) (*European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*) para o diagnóstico de DC incluem a presença de anormalidades da mucosa intestinal e uma nítida melhora clínica do paciente em dieta

sem glúten. No caso de pacientes assintomáticos, uma segunda biópsia é requerida para evidenciar a remissão das anormalidades intestinais. Recomendava-se realizar os testes sorológicos (IgA-EMA e IgA, IgG anti-gliadina (teste disponível à época)) nos pacientes suspeitos, entretanto o diagnóstico não poderia ser baseado exclusivamente no resultado dos testes sorológicos, o que evitaria erros de diagnósticos frente a resultados falso-positivos (Walker-Smith *et al.*, 1990).

A identificação da transglutaminase humana 2 (tTG2) como sendo o principal auto-antígeno na DC permitiu a elaboração de teste de ELISA bastante eficiente. O uso combinado do teste IgA anti-transglutaminase (IgA-tTG2) e IgA anti-endomísio (IgA-EMA) demonstrou que a sensibilidade, especificidade e valor preditivo positivo destes dois testes para o diagnóstico da DC alcançam praticamente 100% (Alessio *et al.*, 2011; Hill, 2005). Alessio *et al.* (2011) sugerem que em casos selecionados, uma biópsia intestinal pode ser evitada naqueles pacientes com alta positividade no teste IgA-tTG2 e que tiveram positividade no teste IgA-EMA confirmada e que a dieta sem glúten pode ser prescrita a estes pacientes.

A DC se desenvolve mediante a interface entre fatores ambientais e genéticos do indivíduo, estes últimos fortemente associados a alelos HLA do complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC-II). Uma forte concordância da presença de DC foi observada entre gêmeos monozigóticos (83% a 86%), que possuem perfil genético idêntico. Este mesmo índice de concordância já não é encontrado entre gêmeos dizigóticos (17% a 20%) que possuem perfil genético similar, mas não idêntico, e que presumivelmente foram expostos às mesmas condições ambientais, o que fortalece a evidência de forte associação do componente genético com a DC e que as variações do fenótipo entre gêmeos monozigóticos, que vão ocorrendo ao longo do tempo, sugerem que eventuais modificações epigenéticas levariam a diferentes expressões gênicas (Greco *et al.*, 2002; Nistico *et al.*, 2006). A concordância de DC entre irmãos com alelos HLA predisponentes à DC é bem menor do que entre gêmeos monozigóticos, o que sugere que outras regiões não HLA estão envolvidas (Wolters e Wijmenga, 2009).

Os alelos HLA do MHC-II predisponentes para a DC são: HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (Sollid *et al.*, 1989). O heterodímero HLA-DQ2 aparece em aproximadamente 95% da população celíaca caucasóide e pode se apresentar em *cis*, na grande maioria dos pacientes celíacos, no haplótipo DR3-DQ2 (DQA1*05 e DQB1*02) ou em *trans* pelos haplótipos DR5-DQ7 (DQA1*0505) e DR7-DQ2 (DQB1*0202) e o restante dessa população, 5 a 10% aparece associada ao heterodímero HLA-DQ8 que se apresenta em

cis no haplótipo DR4-DQ8 (DQA1*03 e DQB1*0302) (Green e Cellier, 2007; KARREL *et al.*, 2003; Sollid e Lie, 2005). Pouquíssimos indivíduos portadores de DC confirmada por biópsia, que não possuem todos os alelos necessários para codificar as proteínas dos heterodímeros HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8, possuem apenas um alelo que codifica uma das cadeias protéicas do heterodímero HLA-DQ2 ou mesmo não possuem nenhum alelo dos heterodímeros HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8, apesar de raramente ocorrer tal fato (Karrel *et al.*, 2003) ou então possuem raras combinações de alelos no HLA-DQ2.2 (DQA1*0201 e DQB1*02) ou HLA-DQ7 (DQA*05 ou DQB1*0301) (Sollid e Lundin, 2009). Estima-se que os alelos do HLA são somente responsáveis por 40% do risco de desenvolver a DC (Bevan *et al.*, 1999) e a ausência destes alelos HLA do MHC-II torna a probabilidade de um indivíduo desenvolver a DC próxima de zero (valor preditivo negativo próximo a 100%) (Wolters e Wijimenga, 2008).

O HLA-DQ2 também é encontrado em 25 a 30% da população geral da Europa e muitos indivíduos que apresentam o HLA-DQ2, podem nunca desenvolver a DC (Sollid *et al.*, 1989; Sollid *et al.*, 1993) pois apenas 3% de indivíduos que possuem o HLA-DQ2 na população geral irão desenvolver auto-imunidade coerente com a DC sugerindo que a tipagem de alelos HLA-DQ2 avalia o risco de pessoas virem a desenvolver a DC, mas não prediz o aparecimento dela em algum momento de sua vida, como acontece com outras doenças ligadas a apenas um gene (Liu *et al.*, 2005). A contribuição de alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8 no desenvolvimento de DC entre os filhos de pais afetados com esta doença é de 36,2% e confirmam a necessidade destes alelos para o desenvolvimento da DC além de sugerir que fatores adicionais, que conferem susceptibilidade à DC, precisam ser elucidados (Petronzelli *et al.*, 1997). Esforços pela busca de outros genes que possam estar relacionados com a DC, para esclarecer a fisiopatologia associada com esta doença, estão sendo conduzidos.

A DC se desenvolve como consequência da associação entre um gatilho ambiental (Glúten) e um indivíduo geneticamente predisposto, com a possível participação de outros co-fatores ambientais (Di Sabatino e Corazza, 2009). O glúten é o único fator ambiental conhecido como desencadeador de resposta imunológica em pacientes com DC. É uma proteína abundante no endosperma das sementes de trigo e é formado por uma parte insolúvel em álcool 70% chamada de glutenina e outra solúvel em álcool 70% chamada gliadina, que compõe 40 a 45% das proteínas presentes na semente do trigo e que pode ser separada em α -gliadina (que compõem as gliadinas tipo α , β) e ω -gliadinas (Ziliè *et al.*, 2011). Proteínas semelhantes ao glúten também são

encontradas no endosperma de sementes do centeio e cevada sendo, também, ricas em glutaminas (Q) e prolinas (P) o que as tornam resistentes à digestão intestinal, resultando em uma grande variedade de peptídeos com potencial imunogênico (Rostom *et al.*, 2006). Dentre os vários peptídeos formados após a digestão do glúten no trato gastrointestinal destaca-se a α -gliadina, que é um peptídeo do glúten, com alto conteúdo de resíduos de prolina (P) e glutamina (Q) o que a torna resistente à digestão por enzimas gástricas, pancreáticas e enzimas das bordas em escova presente nas vilosidades intestinais (Kagnoff, 2005; Rostom *et al.*, 2006) fato este que acarreta seu acúmulo no intestino (Green e Cellier, 2007) e leva, em indivíduos geneticamente predispostos, a uma resposta autoimune com consequente dano da mucosa intestinal.

Embora muitos epítomos do glúten sejam estimulatórios, alguns são mais ativos do que outros. A α -gliadina é o peptídeo mais imunogênico presente no glúten e possui uma sequência interna de tamanho relativamente grande chamada 33-mer (resíduo 57 ao 89) que atravessa intacta o epitélio intestinal e se liga com alta afinidade à tTG2 (DIETERICH *et al.*, 1997). A região 33-mer da α -gliadina, mesmo depois de submetida a digestão proteolítica por enzimas gástricas, pancreáticas e das bordas em escova do intestino, permanece intacta por tempo maior que 20 horas de exposição a estas enzimas *in vitro*, funcionando como potente estimulante de células T após ter sido modificada pela enzima tTG2, diferentemente dos outros fragmentos do glúten que são facilmente degradados (Shan *et al.*, 2002). Algoritmos com alto valor preditivo identificaram outros peptídeos tanto do glúten como em proteínas similares ao glúten no centeio e na cevada com potencial efeito estimulatório das células T, no entanto tais peptídeos não foram encontrados na aveia que consequentemente não tem nenhum efeito deletério em pacientes celíacos (Vader *et al.*, 2002).

As tTGs, que são responsáveis pelo aumento do potencial imunogênico dos epítomos do glúten, são encontradas principalmente no citoplasma celular podendo ser liberadas para a matriz extracelular (ME) onde medeiam a interação das integrinas com a fibronectina e liga as proteínas da matriz extracelular. Estas enzimas também são encontradas no plasma sanguíneo e membranas nucleares (Fesus e Piacentini, 2002). Elas fazem parte de uma família de enzimas e são distinguidas por suas propriedades físicas, distribuição tecidual, localização, mecanismos de ativação e diferenças no seu substrato. Possuem muitas funções biológicas que são geralmente atribuídas à sua atividade de modificação de proteínas, deixando-as rígidas e resistentes contra a degradação. Dentre estas funções destacam-se: a coagulação sanguínea, formação da

barreira epitelial, endurecimento do envelope de fertilização, montagem da matriz extracelular além de funcionarem como importante elemento na montagem do citoesqueleto e na modulação da interação de proteínas. É essencial conhecê-las para entender a etiologia de diversas doenças hereditárias do sangue, da pele e várias condições autoimunes, inflamatórias e degenerativas (Lorand e Graham, 2003). A enzima tTG2 está diretamente envolvida na patogênese da DC devido à sua capacidade de modificar os resíduos de glutamina presente nos fragmentos do glúten por meio de um processo chamado desaminação (Figura 3), com consequente formação de resíduos de ácido glutâmico com carga negativa (Sollid e Lundin, 2009) e aumento da afinidade desses peptídeos pelo heterodímero HLA-DQ2 e/ou DQ8 além do que a tTG2 é alvo de uma resposta humoral autoimune que resulta na produção e secreção de anticorpos, principalmente os da classe IgA, contra a tTG2 e a gliadina desaminada (Figura 3) (Rostom *et al.*, 2006). O alto conteúdo de prolina presente na gliadina, que aumenta a resistência deste peptídeo à proteólise intestinal, resulta em uma conformação helicoidal que fortalece sua ligação com os heterodímeros HLA-DQ2 e HLA-DQ8 nas células apresentadoras de antígenos (Figura 3). Adicionalmente, a presença de resíduos de glutamina aumenta a afinidade desta molécula pela tTG2 com consequente aumento do potencial imunogênico deste peptídeo (Di Sabatino e Corazza, 2009).

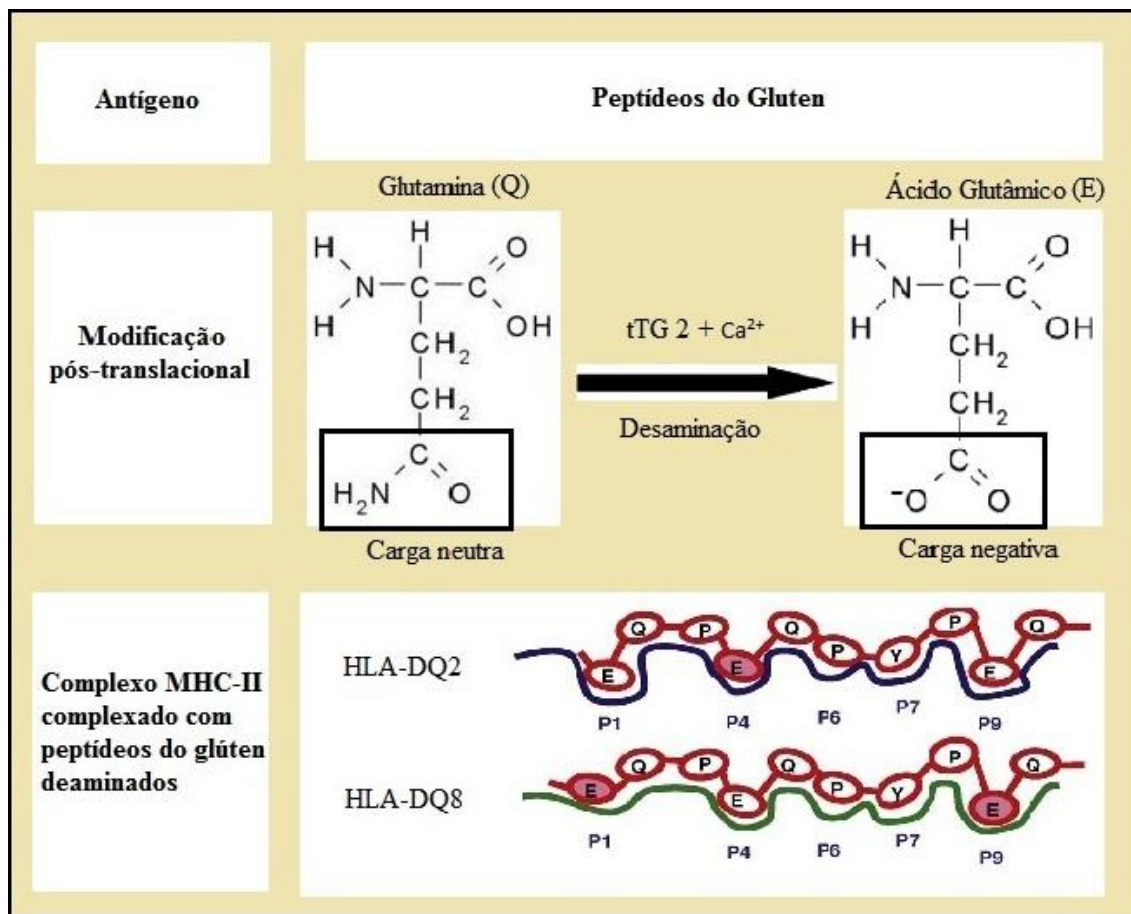


Figura 3 – A modificação pós-translacional de peptídeos do glúten e proteínas afins, aumenta suas afinidades pelo heterodímero HLA predisponente à DC. Peptídeos do glúten são um ótimo substrato para a enzima tTG2 que converte resíduos de glutamina em glutamato na presença de íons Ca^{2+} . Este processo, chamado de desaminação, gera peptídeos com resíduos de aminoácidos com carga negativa (ácido glutâmico (E)), que se ligam com alta afinidade às moléculas HLA-DQ2 e HLA-DQ8. O antígeno é ancorado preferencialmente, nas fendas P4, P6 e P7 no HLA-DQ2 e P1 e P9 no HLA-DQ8, as quais têm preferência por resíduos de aminoácidos com carga negativa, muito embora outros sítios de ligação dos diversos antígenos gerados pela proteólise intestinal e desaminação do glúten possam existir, como mostrado na figura (fragmentos γ ligados nas fendas P1, P4 e P9 do HLA-DQ2 e DQ8, embora a afinidade da ligação ocorra na fenda P4 para o HLA-DQ2 e P1 e P9 para HLA-DQ8. Adaptado de Abadie *et al.* (2011) e Qiao *et al.*, (2009).

Os peptídeos imunogênicos ricos em glutamina e prolina desencadeiam uma resposta imunológica na mucosa intestinal que é iniciada e mediada tanto pelo sistema imune inato quanto pelo adaptativo.

O primeiro evento de uma resposta imunológica contra o glúten requer o acesso de peptídeos à lâmina própria intestinal. O acesso destes peptídeos é dificultado pela sua permeabilidade seletiva e pela presença de enzimas das bordas em escova das vilosidades intestinais que hidrolisam fragmentos protéicos em aminoácidos, di ou tri-

peptídeos antes de serem transportados através do epitélio (Giccocioppo *et al.*, 2005). A desaminação de fragmentos protéicos do glúten (Figura 3) e o aparecimento de seu consequente potencial antigênico é suportado não apenas pelo gradiente proximal e distal de lesões celíacas observadas ao longo do intestino, mas principalmente pela falta de resposta imunológica evidenciada quando o fragmento mais imunogênico do glúten (α -gliadina) é experimentalmente digerido *in vitro* pela prolil endopeptidase (PEP) extraído da bactéria *Flavobacterium meningosepticum* (Shan *et al.*, 2002). Entretanto exposições prolongadas de fragmentos do glúten a altas concentrações desta enzima são necessárias para que a concentração de gliadina com potencial imunogênico atinja baixos valores a ponto de não mais causar uma resposta imune (Matsiak-Budinik, 2005).

A resposta inata pode ser ativada por peptídeos derivados do glúten, como a gliadina, e proteínas similares, que em pacientes com DC ativa, atravessam os enterócitos de sua mucosa não tratada dentro de vacúolos e complexos de golgi, fato não observado em indivíduos saudáveis (Zimmer *et al.*, 1998). Esta resposta é caracterizada pela expressão de interleucina 15 (IL-15) por enterócitos que é um importante fator de ativação e crescimento de população de linfócitos T CD8+ e linfócitos T $\gamma\delta$. Estes linfócitos T, ativados pela interleucina 15 (IL-15), se infiltram no epitélio intestinal e produzem um receptor de superfície (NKG2D) com potencial para reconhecimento de enterócitos em situação de *stress* (Vereckei *et al.*, 2011) resultando numa das manifestações iniciais da DC, ou seja, aumento do número de linfócitos intraepiteliais. Estes linfócitos (CD8+, $\gamma\delta$, $\alpha\beta$ e *Natural Killers*) estão aptos a reconhecer e lesionar os enterócitos por meio de resposta celular citolítica (Bauer *et al.*, 1999). Uma hipótese levantada para o início do processo imuno-patológico da DC é a desestruturação da barreira intestinal devido a infecções intestinais de repetição e cirurgias permitindo a entrada de peptídeos do glúten potencialmente imunogênicos na mucosa intestinal (Rostom *et al.*, 2006).

Como já citado, os peptídeos do glúten, em especial a α -gliadina, precisam ser modificados pela tTG2 num processo chamado de desaminação (Figura 3) para aumentar sua capacidade de se ligar aos heterodímeros HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (Dieterich *et al.*, 1997). Embora peptídeos nativos possam desencadear uma baixa resposta imunológica, os resíduos de glutamina (Q) presentes no glúten e proteínas similares, ao sofrerem um processo de desaminação pela tTG2 (Figura 3) resulta na formação de resíduos de ácido glutâmico em sítios específicos, que os tornam aptos a se

ligar com alta afinidade aos heterodímeros HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (Abadie *et al.*, 2010).

A variação na afinidade da tTG2 por diversos peptídeos é mensurada por meio de sua capacidade de se ligar a tais moléculas e foi sugerido que a especificidade da tTG2 na seleção de epítomos do glúten específicos para o reconhecimento por células T e as reações de desaminação dos peptídeos do glúten na DC ocorrem em ambientes levemente ácidos (Fleckestein *et al.*, 2002).

Estas modificações em epítomos do glúten promovem, também, a resposta adaptativa que é mediada pelas células T CD4+ na lâmina própria, células que reconhecem certos peptídeos derivados do glúten, quando eles são apresentados pelos heterodímeros HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8 nas células apresentadoras de antígenos (Ciccocioppo *et al.*, 2005) (Figura 4). A interação da gliadina com os macrófagos e células apresentadoras de antígenos, via moléculas de HLA MHC-II predisponentes à DC, inicia o processo de sinalização imunológica que resulta no estabelecimento de um processo inflamatório com conseqüente infiltração de células mononucleadas (linfócitos intraepiteliais) na submucosa intestinal (Figura 4). Células T CD4+ interagem com células apresentadoras de antígenos, incluindo macrófagos, levando a um processo autoimune adaptativo antígeno-específico (FASANO; SHEA-DONOHUE, 2005). Estas células produzem citocinas pro-inflamatórias e interferon- γ . O interferon- γ pode desencadear uma elevada expressão de heterodímeros HLA-DQ por células apresentadoras de antígenos, que conseqüentemente irão apresentar peptídeos do glúten modificado os quais irão contribuir ao desenvolvimento e progressão da resposta específica ao glúten mediada por células T (Ciccocioppo *et al.*, 2005). Células T CD4+ específicas a epítomos do gluten são importantes em todos os aspectos da patogênese da DC e auxiliam na indução de células B à produção de anticorpos anti-tTG2 e anti gliadina (Figura 4), visto que a tTG2 pode se complexar com o glúten e ser internalizado por células B, os quais apresentam este antígeno via HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8 e assim recebem estímulos de células T-CD4+ para se diferenciarem em células plasmáticas secretoras de IgA e IgG (Sollid *et al.*, 1997). Durante a cascata de reações inflamatórias resultante do reconhecimento de peptídeos imunogênicos derivados do glúten e proteínas afins, há a liberação de metaloproteinases (MPs) e outros mediadores que causam o típico dano tecidual observado no intestino de celíacos que inclui dano nas vilosidades intestinais e hiperplasia de criptas. Quando o glúten é removido da dieta, os valores de auto-anticorpos voltam ao seu nível normal e o dano

intestinal é restaurado completamente (Sollid e Lundin, 2009).

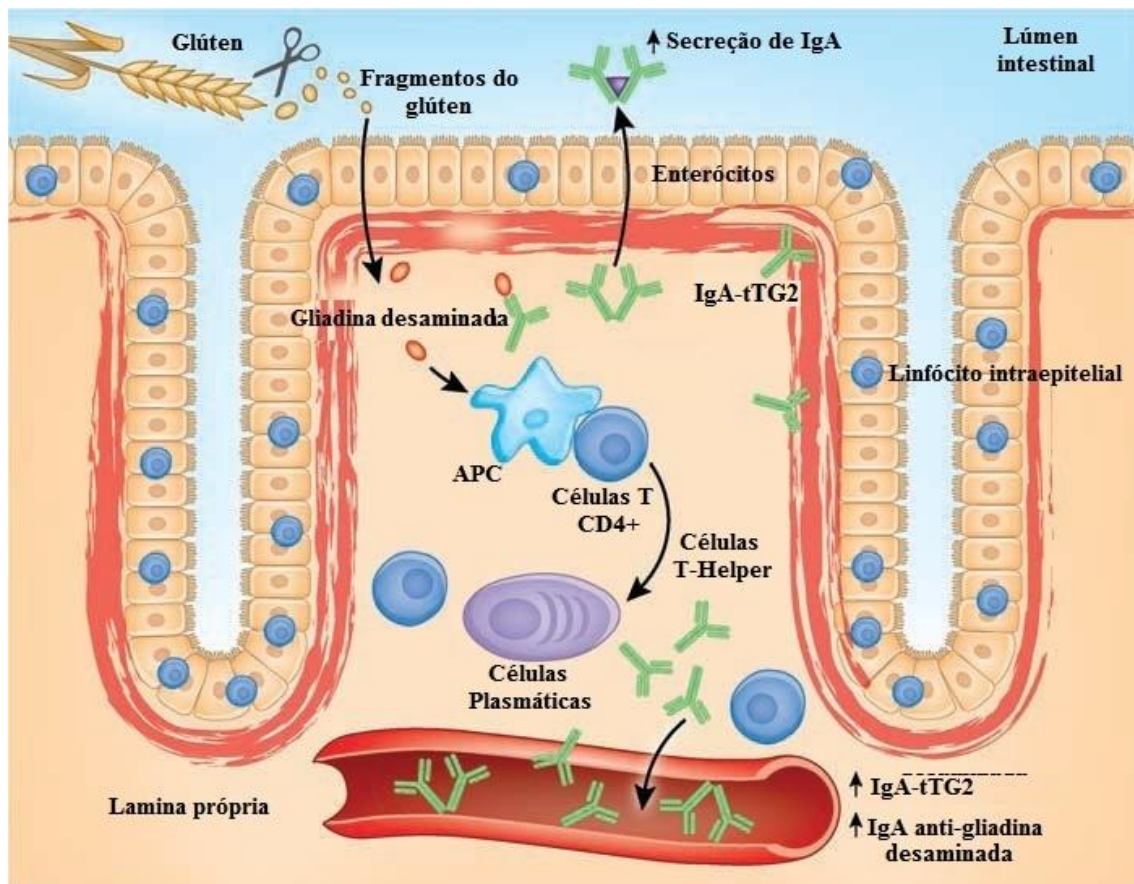


Figura 4 – Mucosa intestinal em processo de lesão, que é causada por complexos mecanismos moleculares e inclui características morfológicas como aumento no número de IELs, atrofia vilositária e hiperplasia de criptas. Existe, também, um aumento no número de células T CD4+ e células plasmáticas na lâmina própria. Os fragmentos do glúten atravessam a membrana epitelial, são reconhecidas e desaminadas pela enzima tTG2 e apresentadas pelas células apresentadoras de antígenos (APC) para células T CD4+. Células plasmáticas são recrutadas, por sinalizadores produzidos por células T CD4+, e estimuladas a secretar anticorpos (IgA) contra a gliadina desaminada e contra a tTG2, anticorpos estes que alcançam o lúmen intestinal, como secreção de IgA, e a corrente sanguínea, ou formam imuno-complexos com a tTG2 sob o epitélio intestinal. Adaptado de Sollid e Lundin, 2009.

Baseado nesta resposta imunológica com produção de anticorpos IgA/IgG-tTG2 e anti-gliadina foi possível desenvolver testes mais sensíveis e específicos que pudessem detectar a presença da DC em indivíduos com risco de desenvolvê-la e naqueles que se enquadram no grupo de assintomáticos, latentes e indivíduos saudáveis (Figura 2). O diagnóstico de DC é baseado em testes sorológicos para a detecção de anticorpos presentes no soro sanguíneo (Rashtak e Murray, 2009). Os anticorpos da classe IgA tem uma especificidade maior na detecção de DC do que os anticorpos da classe IgG, sendo que os testes que se baseiam na presença destes últimos anticorpos

devem ser usados somente na detecção de pacientes que possuam deficiência de IgA (Sollid e Lundin, 2009), a qual está associada com a DC (Macgowan *et al.*, 2008). Os resultados dos testes sorológicos, IgA/IgG-tTG2 e IgA-EMA que são os mais sensíveis e específicos exames para identificar indivíduos portadores da DC (Hill, 2005) direcionam à tomada de decisão para realizar a biópsia. A biópsia intestinal pode, além de confirmar o diagnóstico de DC, trazer informações a respeito do grau de dano intestinal e acompanhar a resposta ao tratamento (Rashtak e Murray, 2009). O teste IgA-EMA (Chorzelski *et al.*, 1984) é o mais sensível e específico dentre os testes sorológicos de diagnóstico de DC sendo que sua sensibilidade e especificidade são maiores que 95% (Hill, 2005; James e Scott, 2000) sugerindo que seu epítipo é, de alguma forma, específico para anticorpos desenvolvidos na DC (Caja *et al.*, 2011) ou seja, seu valor preditivo positivo (probabilidade de que um indivíduo tenha a doença, face à um resultado positivo) e valor preditivo negativo (probabilidade de que um indivíduo não tenha a doença, face à um resultado negativo) é próximo de 100%. Por meio da técnica de imunofluorescência, níveis elevados de anticorpos IgA anti-endomísio (IgA-EMA), podem ser detectados, como pode ser observado na figura 5.

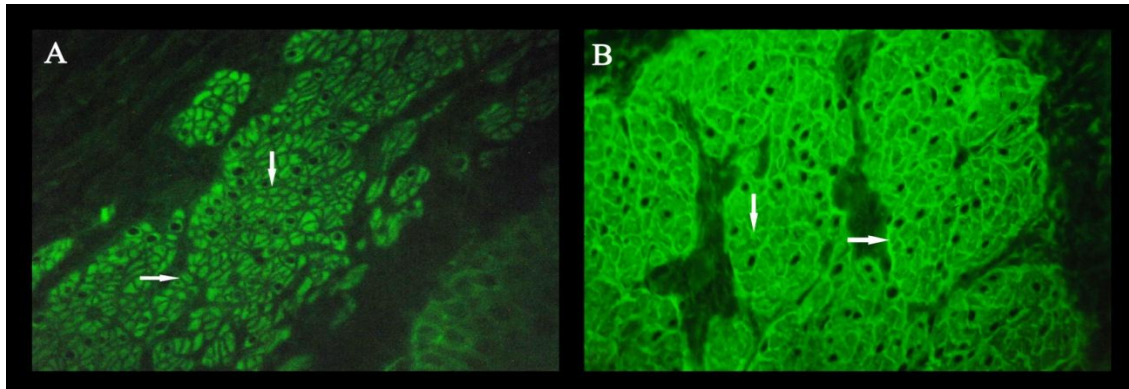


Figura 5 – Cortes criostáticos transversais de esôfago de macaco *Rhesus* fixados em lâmina (INOVA Diagnostics, inc. San Diego, CA) e incubados com soro sanguíneo (1:5 em tampão PBS) e posteriormente, após lavagens, com anticorpos anti-IgA humano marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC). **A** – Endomísio negativo (setas) evidenciando a ausência de anticorpos IgA anti-endomísio neste paciente. **B** – Endomísio positivo (setas) evidenciando a presença de anticorpos IgA anti-endomísio neste paciente. Aumento: 400x. Fonte: Centro de Pesquisas em Doença Celíaca

Inicialmente, a DC era considerada uma doença com baixos índices de prevalência, e era diagnosticada com base na apresentação dos sintomas clássicos da DC, no entanto casos atípicos e assintomáticos foram sendo diagnosticados, graças a

testes sorológicos com alta sensibilidade e especificidade (Hill, 2005). Exemplificando, estudo de prevalência feito nos Estados Unidos da América (EUA), baseado em aspectos puramente clínicos de pacientes, detectaram frequência de DC na população geral de 1:4600 (Talley *et al.*, 1994). Entretanto, com o advento de testes sorológicos, foi possível detectar, na Europa, que a prevalência de DC variava entre 1:250 e 1:300 (Ascher e Kristiansson, 1994; Catassi *et al.*, 1994) fato que demonstrou que a DC não era rara na Europa. Estudos em população geral da Finlândia, Itália e Inglaterra encontraram uma prevalência da DC de aproximadamente 1 para 100 indivíduos (VAN HELL e WEST, 2006; West, 2003; Mäki *et al.*, 2003) e demonstraram que a prevalência na Finlândia aumentou significativamente de 1,05% (final da década de 70) para 2% (início do ano 2000) (Lohi *et al.*, 2007). Na Suécia foi encontrada prevalência de ~1% entre crianças (Carlsson *et al.*, 2001). Depois que a prevalência de DC em população geral dos Estados Unidos (EUA) foi estimada em 1:133 indivíduos sugerindo que a DC ocorre em pacientes com e sem sintomas gastrointestinais (FASANO *et al.*, 2003) e que tinham sugerido que a prevalência geral entre crianças nos EUA era de 1% (Hoffenberg *et al.*, 2003) foi então evidenciado que a DC era comum neste país, principalmente entre indivíduos de descendência caucasiana. Estes dados mostraram-se muito similares àqueles encontrados em países da Europa como na Inglaterra onde a DC afeta aproximadamente 1% de sua população geral entre 44 e 76 anos.

Entretanto, em determinadas populações de origem não européias, foram encontradas prevalências de DC bastante aumentadas, como no caso de um povo de descendência árabe na região ocidental do Sahara, que tem prevalência de 5,6% em sua população geral, sendo considerada a maior prevalência de DC do mundo. É provavelmente devida ao alto nível de consanguinidade e ausência de uma seleção natural desde que a introdução do glúten deu-se tardiamente nesta população (Catassi *et al.*, 1999). No norte da Índia foi encontrada prevalência de 1:310 (Sood *et al.*, 2006) evidenciando que a prevalência de DC não é rara em povos de descendência diferente da européia. Todos estes dados corroboram para uma alta prevalência de DC no mundo, mas principalmente naquelas populações com forte descendência caucasóide (West *et al.*, 2003). Doenças auto-imunes, que também englobam a DC, são consideradas a terceira categoria mais comum de doenças nos EUA depois do câncer e doenças do coração (Fasano e Shea-Donohue, 2005). Estudos em vários estados brasileiros demonstraram que há uma prevalência de DC que varia de 1:119 até 1:417 (Crovella *et al.*, 2007; Melo *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2006; Pratesi *et al.*, 2003).

Em Brasília a prevalência encontrada em população geral foi de 1:293, sendo 1:473 em adultos e 1:184 em crianças. Esta diferença na prevalência de DC entre adultos e crianças foi inesperada e inexplicada (Pratesi et al., 2003).

Atualmente, não há cura para a DC e sim controle. O único tratamento conhecido é a dieta livre de glúten e proteínas afins, e deve ser receitada a todos os pacientes com DC confirmada (Sollid e Lundin, 2009). Infelizmente manter a aderência a uma dieta sem glúten não é fácil, principalmente em pacientes de baixo poder sócio-econômico, resultando na volta das condições associadas à DC (Green e Cellier, 2007).

Todos os testes de prevalência em população geral são realizados com os seguintes testes: IgA-EMA, apesar de sua alta especificidade tem a desvantagem de ser um teste qualitativo e ser efetuado sobre cortes criostáticos de esôfago de macaco *Rhesus* (Rashtak e Murray, 2009) que é uma espécie em risco de extinção; IgA-tTG2, baseado no ensaio *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), é preferentemente usado no rastreamento de novos casos de DC, por ser economicamente viável e ser um teste quantitativo, além do que, o resultado do teste anti-tTG2 poderá ser reforçado com a presença de anticorpos IgA-EMA para o diagnóstico de DC (Tack et al., 2010). O teste anti-tTG, apesar de sua alta sensibilidade (que varia entre 77% e 100%), não é tão específico quanto o teste IgA-EMA (Hill *et al.*, 2005) por isso a ação conjunta destes dois testes pode gerar resultados mais fidedignos.

A DC, apesar de ser mais frequentemente diagnosticada na infância e na adolescência, pode se desenvolver em qualquer idade (Sollid e Lundin, 2009), inclusive em idosos. Não há uma idade definida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para classificar os idosos, no entanto as Nações Unidas tem concordado em agrupá-los em grupo com mais de 60 anos. Estudos em população idosa na Finlândia demonstraram um alto número de celíacos e celíacos não diagnosticados (52 a 74 anos de idade), sugerindo que a DC pode ser desenvolvida em idades avançadas (Vilpulla *et al.*, 2008). É obscuro se o número de casos não detectados em população idosa é devido a um atraso no diagnóstico, ou resultado do desenvolvimento da doença celíaca em idades avançadas, ou por ambas as razões (Vilpulla *et al.*, 2009). Estes estudos de Vilpulla *et al.* (2008 e 2009) evidenciam que possa existir um aumento progressivo da prevalência com o aumento da idade, o que seria esperado em se tratando de uma doença que pode eclodir em qualquer fase da vida. A DC pode não se desenvolver em indivíduos geneticamente susceptíveis e possivelmente seja precipitada, mesmo em idades tardias, por fatores ambientais ainda não determinados (Freeman, 2008).

4. Objetivo principal

Determinar a prevalência de DC em um grupo de idosos (≥ 60 anos) residentes no Distrito Federal por meio de testes sorológicos (IgA-tTG2 e IgA-EMA).

4.1 Objetivo Secundário

Comparar a prevalência de DC encontrada no presente estudo com a prevalência detectada em estudo anterior, em crianças e adolescentes de 1 a 15 anos, que foi efetuado na mesma região geográfica e em população de mesmo nível sócio-econômico.

5. Materiais e Métodos

Para a realização deste trabalho, amostras de sangue de 946 pacientes com idade acima de 60 anos foram coletadas no Laboratório de Patologia Clínica (LPC) do Hospital Universitário de Brasília (HUB), durante o período compreendido entre maio de 2010 e julho de 2011. Foram incluídos pacientes atendidos no LPC com idade igual ou acima de 60 anos. Aqueles pacientes encaminhados pelo Serviço de Gastroenterologia do HUB foram excluídos da pesquisa. Antes da coleta da amostra, todos os pacientes responderam a um questionário (anexo 3) focalizando principalmente a presença de patologias comumente associadas à DC, a presença de outras doenças auto-imunes e se estavam ou não, em dieta sem glúten.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília sob o nº 005/2010 e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi explicado a cada participante, esclarecendo-os sobre os objetivos, riscos e benefícios da pesquisa.

Todos os pacientes que consentiram em participar do estudo dependem do Sistema Público de Saúde para fazerem prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças, eram provenientes do entorno e cidades satélites do Distrito Federal (o que garante a aleatoriedade na coleta dos dados durante o estudo) e oriundos de migrações internas das várias regiões e estados brasileiros. Esta população pode ser considerada como representativa da população brasileira, que é miscigenada, com uma considerável contribuição de europeus e com uma variável parcela de outras raças, principalmente afrodescendentes e ameríndios presentes nas várias regiões do nosso país em proporções variáveis. Além disto, esta população que depende de centros de saúde e hospitais públicos no Brasil é classificada socioeconomicamente como uma população de classe social baixa.

Os pacientes atendidos no ambulatório do HUB procuravam o Laboratório de Patologia Clínica após consultas clínicas para a realização de exames laboratoriais que são solicitados por diversas razões como: exames de *check-up*, suspeita de infecções ou recorrência destas, doenças crônicas, desordens metabólicas, exames pré-operatórios, entre outras causas. Aqueles pacientes que faziam exames solicitados por gastroenterologistas foram excluídos da pesquisa para evitar erros de amostragem, sendo este o único critério de exclusão, apesar da existência de sintomas e condições associadas com a DC neste grupo de pacientes.

5.1 Coleta, Processamento e Armazenamento de Sangue

Foram coletados 6mL de sangue de cada paciente conforme os critérios descritos pela norma técnica H3-A6 do *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI) que estabelece os critérios adequados para a coleta de sangue. O sangue foi coletado em tubo com gel separador e em tubos com anticoagulante EDTA, segundo norma técnica H21-A5 do CLSI, que trata sobre coleta, transporte e processamento de amostras de sangue. Os soros coletados em tubos com gel separador foram centrifugados à 500 x g por 5 minutos e posteriormente utilizados para a realização dos testes sorológicos IgA-tTG2 e IgA-EMA, enquanto o sangue total coletado em tubos com EDTA foram estocados à -20°C para posterior extração de DNA e realização das técnicas de diagnóstico molecular da Doença Celíaca.

5.2 Pesquisa de Anticorpos IgA Anti-Transglutaminase (IgA-tTG2)

A presença de possíveis anticorpos IgA-tTG2 no soro dos pacientes desta pesquisa foi mensurada por meio do teste *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) usando Kit comercial (IgA-htTG QUANTA Lite™, Inova Diagnostics, Inc. San Diego, CA - USA) e seguindo as recomendações do fabricante.

As amostras de soro dos pacientes foram diluídas (1:100) em tampão fosfato (PBS, pH 7,2) e homogeneizados em agitador mecânico, posteriormente, 100 µL de cada diluição foi adicionado ao orifício da placa de 96 poços sensibilizada com tTG2 e incubadas à temperatura ambiente (24°C) por 30 minutos. Após este procedimento, foi realizado um ciclo de três lavagens com 300µL de tampão de lavagem (tampão fosfato com 0,05% de *Tween* 20) na máquina Thermo Plate – Washer. Na etapa seguinte, 100µL de anticorpo de detecção do IgA humano marcados com peroxidase, foi adicionado a cada orifício da placa que foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e em seguida um novo ciclo de 3 lavagens com tampão de lavagem foi realizado, como descrito anteriormente. Para a revelação da reação foi adicionado 100µL da solução de substrato (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina - TMB) a cada orifício da placa e incubados por 30 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com ácido sulfúrico (H₂SO₄) 0,3 M e a leitura realizada no espectrofotômetro Thermo Plate Reader (TP-Reader™) utilizando filtro de 450 nm. Os resultados foram quantificados por meio da comparação entre a densidade ótica (D.O)

de um padrão pré-estabelecido e a densidade ótica das amostras seu respectivo valor numérico expresso em Unidades arbitrárias (UA). Resultados com valores inferiores a 20 UA foram considerados negativos e resultados superiores a 30 UA foram considerados positivos.

5.3 Pesquisa de Anticorpos IgA Anti-endomísio (IgA-EMA)

As amostras de soro dos pacientes com resultado positivo para o teste ELISA-IgA-tTG2 (≥ 30 UA) foram submetidas ao teste IgA-EMA (Figura 5) (IgA-EMA Inova Diagnostics, Inc. San Diego, CA – USA) que tem sensibilidade e especificidade maior que o teste IgA-tTG2 para o diagnóstico da DC. O teste foi realizado seguindo as recomendações do fabricante. O soro de cada paciente foi diluído (1:5) em tampão fosfato (PBS pH 7,2) e incubado sobre uma secção criostática de esôfago de primata, fixada em lâmina, por 30 minutos em câmara úmida. Posteriormente, as lâminas foram lavadas 3 vezes com tampão PBS. Após a lavagem as lâminas foram incubadas em tampão PBS por 5 minutos e este procedimento foi repetido por mais uma vez. Após esta etapa, 30 μ L do anticorpo de detecção (anticorpo anti-IgA humano marcado com Isotiocianato de Fluoresceína - FITC) foi adicionado a cada secção criostática da lâmina contendo corte do esôfago de macaco e foi realizado uma nova incubação em câmara úmida por 30 minutos, seguida de lavagem com tampão PBS como descrito anteriormente. As lâminas foram secas e montadas com solução de glicerina (30%) e PBS e lamínula, e foram analisadas por microscopia de fluorescência no microscópio Zeiss Axiophot 2 com filtro de excitação 450 nm e emissão 520 nm e observadas em um aumento de 400x. Os resultados foram analisados por dois examinadores independentes e pelo pesquisador, e foram considerados positivos se fluorescência de coloração verde-maçã fosse observada nos espaços entre as fibras de musculatura lisa (endomísio), na ausência de fluorescência os resultados foram considerados negativos (Figura 5).

5.4 Extração de DNA

O DNA do sangue total de todos os pacientes com resultados positivos (≥ 30 U) para IgA-tTG2 foi extraído utilizando o método *Salting Out* (MILLER *et al.*, 1988)

através de Kit comercial (Illustra™ Blood genomicPrep Mini Spin, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

As amostras de sangue coletadas em tubos contendo anticoagulante EDTA e armazenadas a -20°C foram descongeladas até atingirem a temperatura ambiente. Em tubo Falcon de 15 mL foi adicionado 1 mL de sangue total e 3 mL de tampão *Red Blood Cell lysis* (RBC), as amostras foram homogeneizadas por 30s em agitador mecânico e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 4500 rpm por 2 minutos. Após a centrifugação duas fases foram obtidas, a sólida no fundo do tubo, um *pellet* onde se encontra o material genético e o sobrenadante, composto de restos celulares, proteínas e plasma sanguíneo. O sobrenadante foi descartado por meio de inversão do tubo e o *pellet* foi ressuscitado por meio de agitação mecânica sendo posteriormente transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo 400 μL de tampão de lise e 25 μL de proteinase K (20mg/ml) e homogeneizados em agitador mecânico por 15 segundos. Estas amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 10 minutos com intermitente agitação mecânica e o lisado celular foi transferido para coluna com membrana de sílica e centrifugado à 12000 x g por 1 minuto. Em seguida foi adicionado 500 μL de tampão de lise à coluna e uma nova centrifugação foi realizada como na etapa anterior. A purificação do DNA foi seguida pela adição de 500 μL de tampão de lavagem contendo álcool e centrifugação à 12000 x g por 3 minutos. Cada coluna de sílica, agora com DNA purificado, foi transferida para microtubo de 2 mL estéril e foi adicionado 100 μL de tampão Tris-HCl (10 mM, pH 8,0) pré-aquecido à 70°C , em seguida as amostras foram centrifugadas à 12000 x g por 1 minuto. A quantidade de DNA genômico presente no eluído foi determinada através do equipamento *Nanovue Plus* (GE Healthcare, UK) por meio de leitura espectrofotométrica nas densidades óticas (DO) 260 e 280nm. A pureza do material genômico foi considerada adequada quando a razão destas densidades óticas (A_{260}/A_{280}) fosse maior ou igual a 1,8. O DNA genômico de cada paciente foi armazenado em microtubo de 1,5 mL estéril e congelado à -20°C .

5.5 Tipagem de alelos HLA por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Alelos do Antígeno Leucocitário Humano (HLA), HLA-DQA1*05:01 e HLA-DQB1*02:01 localizados em cis no haplótipo DR3-DQ2 e HLA-DQA1*03:01 localizado no haplótipo DR4-DQ8, que conferem suscetibilidade à Doença Celíaca,

foram genotipados nos pacientes com níveis elevados de anticorpos anti-transglutaminase usando a técnica Sequence-Specific *Primers* (PCR-SSP) e utilizando os *primers* (iniciadores) descritos por Olerup *et al.* (1993) (Tabela 1). As reações das PCRs dos alelos relacionados acima foram otimizados para funcionarem nas mesmas concentrações de reagentes em volume final de 25 µL sendo composto de: 14,7 µL de água reagente tipo 1, 2,5 µL de dimetilsulfato (DMSO) à 10%, 2,5 µL de tampão da enzima (1x), 0,3 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) à 0,6 mM, 0,5 µL de desoxinucleotídeos tri-fosfato - dATP, dTTP, dGTP, dCTP à 0,4 mM - 1 µL do *primer* reverse à 0,4 µM, 1 µL do *primer* forward à 0,4 µM, 0,5 µL da TaqDNA polimerase (0,1 U/µl) e 2 µL de DNA genômico (1,6 a 3,2 ng/µL).

Cada reação foi montada em microtubo de 0,5 mL e submetidos a ciclos de desnaturação, anelamento e extensão em Termociclador Gradiente MyGenie 96 (BiONEER) sendo o primeiro passo de 5 minutos à 94°C seguido de 34 ciclos de desnaturação (94°C por 1 minuto), anelamento (59°C por 1 minuto) e extensão (72°C por 1 minuto), nesta ordem e, por último, extensão final de 7 minutos a 72°C. O material amplificado foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose.

Tabela 1 – Sequências dos *primers reverse* e *forward* de alelos HLA-MHC-II que predisõem à DC de acordo com Olerup *et al.* 1993.

Sequência de <i>Primers</i> (OLERUP <i>et al.</i> , 1993)		
Alelos HLA*	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
DQA1*05:01	5'-ACG GTC CCT CTG GCC AGT A-3'	5'-AGT TGG AGC GTT TAA TCA GAC-3'
DQB1*02:01	5'-GTG CGT CTT GTG AGC AGA AG-3'	5'-GCA AGG TCG TGC GGA GCT-3'
DQA1*03:01	5'-TTC ACT CGT CAG CTG ACC AT-3'	5'-CAA ATT GCG GGT CAA ATC TTC T-3'

*Alelos pertencentes ao Complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC II).

5.6 Eletroforese em Gel de Agarose e Fotodocumentação

Foi adicionado 3 μL de tampão de amostra aos produtos de PCR. As cópias dos fragmentos de DNA dos pacientes (10 μL) foram aplicadas em gel de agarose 1,5% contendo brometo de etídeo a 0,1 $\mu\text{g/mL}$. A eletroforese foi realizada em tampão Tris Borato EDTA 1x (TBE) sob tensão de 100 voltz durante 1h30min e visualizado em transluminador Alpha Innotech com fonte de luz ultravioleta em comprimento de onda de 302 nm e fotodocumentado com o programa Alpha Proview para registro e análise.

5.7 Análise Estatística

Nenhum trabalho sobre prevalência de DC em pacientes idosos foi encontrado no Brasil e, conseqüentemente, o número mínimo de indivíduos a serem analisados foi estabelecido em 877 usando o programa EpiInfo versão 3.5.3, baseada em uma prevalência estimada de 2,34% com erro aceitável de 1% e intervalo de confiança de 95%, de acordo com a prevalência encontrada por Vilppula *et al.* (2009) em indivíduos acima de 55 anos na Finlândia.

6. Resultados

Amostras de sangue de 946 pacientes com idades variando de 60 à 92 anos (média 68,1 e mediana 67) foram coletadas durante período de 14 meses no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Universitário de Brasília. Na análise inicial dos dados 68,8% (651) destes pacientes foram representados por pacientes do sexo feminino, ao passo que 31,2% (295) foram representados pelo grupo dos pacientes do sexo masculino como pode ser observado na Figura 6.

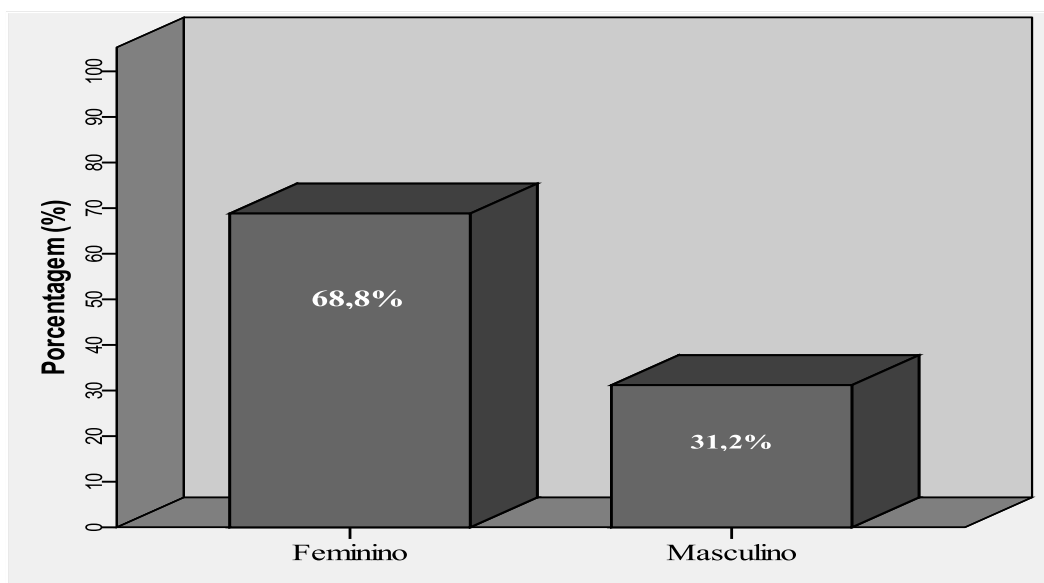


Figura 6 – Porcentagem de indivíduos acima de 60 anos de acordo com o sexo e considerando um tamanho amostral de 946 indivíduos.

Observando a distribuição da pirâmide etária no grupo de pacientes estudados, encontramos para ambos os sexos que a faixa etária entre 60 e 70 anos de idade foi a mais representativa nos indivíduos desta população de idosos (figura 7).

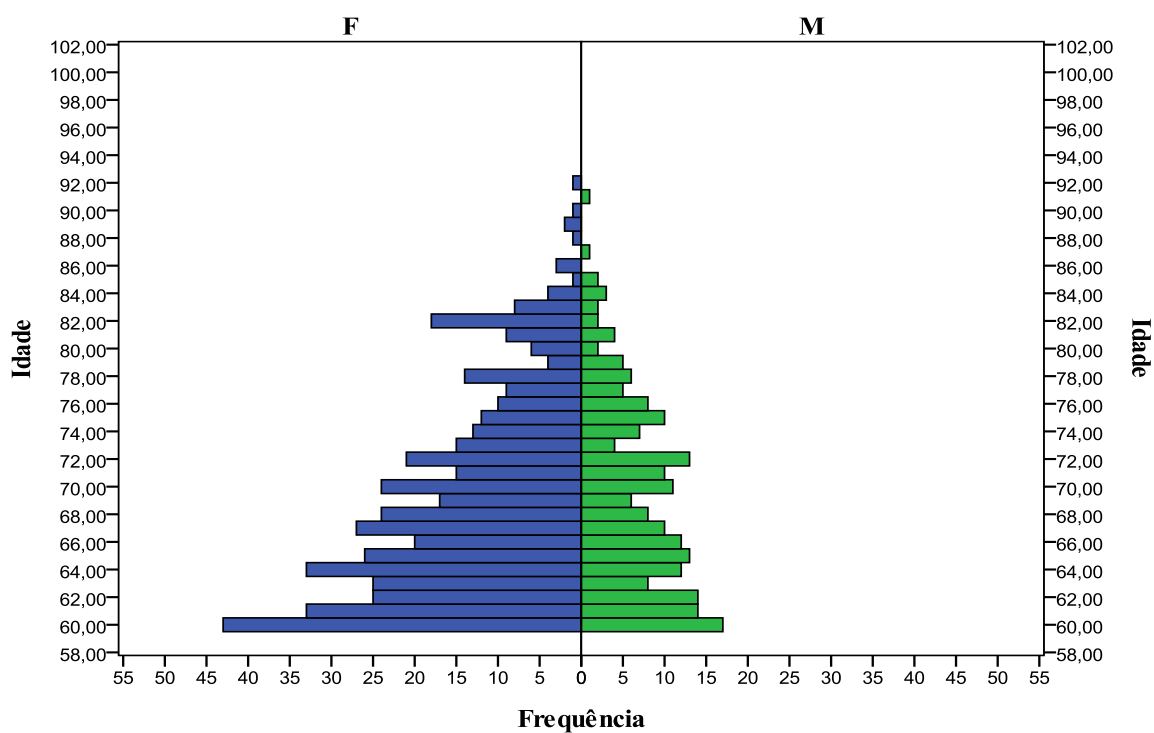


Figura 7 – Pirâmide Etária separada por sexo dos indivíduos acima de 60 anos de acordo com a frequência de ocorrência dentro de suas respectivas idades (n = 946). F – Feminino; M – Masculino.

A maior parte dos pacientes desta pesquisa veio à Brasília de estados como Minas Gerais (13,4%), Bahia (8,9%), Goiás (8,4%), Piauí (7,3%) e Ceará (6,6%) e residiam em Brasília a mais de um ano.

Uma celíaca de 66 anos de idade, diagnosticada segundo critérios da ESPGAN, foi encontrada entre os 946 sujeitos da pesquisa e já estava sob tratamento com dieta sem glúten ao passo que nove indivíduos apresentaram níveis de anticorpos IgA-tTG2 elevados e foram checados quanto a presença de anticorpos IgA-EMA no entanto, nenhum paciente mostrou positividade para este exame. Dados clínicos e laboratoriais destes pacientes, incluindo a genotipagem de alelos HLA predisponentes para DC, estão expostos na tabela 2.

Tabela 2 – Dados clínicos e laboratoriais de nove indivíduos com resultados anormais para IgA-tTG2 (ELISA).

Paciente	Sexo	Idade	IgA-tTG2 [†] (UA)	IgA-EMA ^{††}	HLA ^{†††}	Sinais e Sintomas e outras doenças associadas
1	M	63	39,9	*Neg.	Neg.	Anemia, artrite;
2	M	71	34,5	Neg.	‡DQB1*02:01	Hipertireoidismo;
3	M	81	31,3	Neg.	‡DQA1*03:01	Nenhum diagnóstico;
4	F	60	42,9	Neg.	‡DQB1*02:01 ‡DQA1*03:01	Nenhum diagnóstico;
5	F	60	30,6	Neg.	‡DQA1*03:01	Osteopenia, artrite, dor abdominal e flatulência;
6	F	63	52,3	Neg.	Neg.	Hipertireoidismo, osteoporose, artrite e Síndrome de Down (SD);
7	F	65	34	Neg.	‡DQA1*03:01	Nenhum diagnóstico;
8	F	68	45,3	Neg.	‡DQA1*05:01 ‡DQA1*03:01	Abdome distendido, flatulência, perda de peso e osteoporose;
9	F	72	45,2	Neg.	Neg.	Osteoporose;

[†]IgA-tTG2 – Anticorpos anti-transglutaminase; ^{††}IgA-EMA – Anticorpos anti-endomísio; ^{†††}HLA – Antígeno leucocitário humano; *Neg. – Negativo. ‡Heterodímero DQ2.5 (DQA1*05 e DQB1*02); †Heterodímero DQ8 (DQA1*03 e DQB1*03:02).

Um grupo composto de 2034 crianças de 1 a 14 anos (média: 8 anos) foi usado como referência para o estudo de DC em idosos no Distrito Federal. Este grupo foi estudado por Pratesi *et al.* em 2003 no Centro de pesquisa em Doença Celíaca da Universidade de Brasília, que encontraram prevalência de 5,44 por 1000 pessoas (0,54%; Intervalo de Confiança 95%, 0,38-0,70) e pertenciam a mesma região geográfica do grupo de idosos além de pertencerem a classes sociais similares (Tabela 3).

Tabela 3 – Prevalência de DC entre 946 idosos e entre 2034 crianças e adolescentes pertencentes à mesma região geográfica e pertencentes a classe social similar.

Idade dos Pacientes	Celíacos	Não-celíacos	Total
≥60 anos	1	945	946
1 a 14 anos	11	2023	2034

Odds Ratio = 0,19 (Intervalo de Confiança 95% 0,01 – 1,45); Teste de Fisher: p = 0,06

7. Discussão

Neste estudo, foi encontrada uma única paciente já previamente diagnosticada em nosso próprio Centro de Pesquisa em Doença Celíaca, quando ela tinha 55 anos e já estava em tratamento (dieta sem glúten). Conseqüentemente a prevalência encontrada em nosso grupo de idosos foi de 1:946 (~0,11%). Nove indivíduos tiveram níveis de anticorpos IgA-tTG2 moderadamente aumentados, no entanto todos apresentaram teste negativo para anticorpos IgA-EMA. Um ou mais alelos HLA predisponentes para DC foi encontrado em seis destes nove pacientes (Tabela 2). Paradoxalmente, dentre os três pacientes que não apresentaram alelos HLA predisponentes encontrava-se uma paciente que tinha sido considerada como altamente suspeita de ser celíaca por ser portadora da Síndrome de Down (SD), hipertireoidismo, osteoporose e artrite. Esta paciente, junto com os seis pacientes que apresentaram alelos HLA predisponentes, continuará sendo, periodicamente, avaliada devido ao fato de que, apesar de extremamente rara, existe a possibilidade de pacientes com ausência de alelos HLA predisponentes à DC vir a apresentar esta afecção, desde que já foram relatados casos de indivíduos portadores de DC sem alelos HLA predisponentes a esta doença (Karrel *et al.*, 2003).

Dentre os testes baseado no método ELISA, aquele que usa a transglutaminase humana como antígeno é o mais recomendado para diagnóstico de DC (Carroccio *et al.*, 2001) pois tem especificidade e sensibilidade maior que 90% e, junto com o teste IgA-EMA, são os melhores testes para identificar aqueles indivíduos que precisam fazer, ou não, biópsia para confirmar o diagnóstico de DC (Hill, 2005).

A presença de anticorpos anti-tTG2 moderadamente elevados pode ser sugestiva de que estes indivíduos possam em algum momento, eventualmente desenvolver resposta imunológica contra o glúten (Tesei *et al.*, 2003). Entretanto pequenas flutuações nestes valores, com IgA-EMA negativo e HLA positivos podem ser

sugestivos de resposta imune transitória ao glúten que podem gerar resultados falso-positivos, ou seja sorologia positiva com biópsia intestinal normal (Mahadev *et al.*, 2011). O teste IgA-tTG2 não deve ser usado isoladamente para afirmar o diagnóstico da DC, porque eventualmente pode existir discordâncias entre os testes IgA-tTG2 e IgA-EMA (Lasagni *et al.*, 1999). A presença de anticorpos IgA anti-tTG2 podem traduzir a presença de doenças crônicas do fígado (Bizzaro *et al.*, 2006; Villalta *et al.*, 2005) como cirrose hepática na qual é encontrada alta frequência de positividade para anticorpos anti-tTG2 (Vecchi *et al.*, 2003). Já os pacientes no estágio final de insuficiência cardíaca apresentam anticorpos IgA-EMA (Peracchi *et al.*, 2002). Sendo assim, muitos centros mensuram, primeiramente, os níveis de anticorpos IgA-tTG2, ou IgG-tTG2 naqueles pacientes com deficiência de IgA, e posteriormente avaliam a presença de anticorpos IgA-EMA naqueles indivíduos com resultado positivo para o teste IgA-tTG2 (Hopper *et al.*, 2007). Nós consideramos que os idosos com níveis de anticorpos IgA-tTG2 moderadamente elevado e com resultado negativo para o teste IgA-EMA não apresentavam, no momento, elementos suficientes para justificar a realização de ulteriores exames mais invasivos, como seria o caso da biópsia intestinal. Sendo assim tais idosos com resultado moderadamente elevado para o teste IgA-tTG2 e com a presença de alelos HLA predisponentes não podem ser excluídos do risco de desenvolver a DC e serão acompanhados periodicamente.

Nossos dados sugerem que a prevalência de DC em idosos é baixa em comparação com dados encontrados por Vilpulla *et al.* (2008) em população finlandesa idosa (>52 anos), que relataram frequência de 2,13% (~21/1000) em pacientes confirmados por biópsia. A prevalência encontrada neste grupo (Vilpulla *et al.*, 2008; 2009) é mais alta do que a reportada na população de crianças deste mesmo país (Mäki *et al.*, 2003). Em outro estudo sobre a similaridade na manifestação clínica e histológica entre idosos e adultos jovens, Mukherjee *et al.* (2010) sugerem que a DC pode se iniciar em pacientes idosos e que esta, com base em estudo de outros autores, continua aumentando com a idade principalmente no grupo de idosos (Murray *et al.*, 2003; Lohi *et al.*, 2007). Este fato não foi observado no nosso grupo populacional estudado no Distrito Federal cujos dados são coerentes com resultados publicados por Mariné *et al.* (2011) de que a prevalência de celíacos na Catalunha (Espanha) diminui com o passar do tempo embora não concordem que a diminuição da prevalência de DC com o passar do tempo seja devido a uma mortalidade aumentada, como foi sugerido por Pratesi *et al.* (2003), pois a expectativa de vida na Catalunha é uma das maiores do mundo, os

programas de saúde alcançam a todos naquela região da Espanha além de terem baixa taxa de mortalidade em seu país.

A população feminina descrita no nosso estudo é 2,2 vezes maior que a masculina (68,8% *versus* 31,2%) e ela tem risco duas vezes maior de desenvolver a DC do que os homens (Farrel e Kelly, 2002; Ivarsson *et al.*, 2003) podendo tal fato ter relação com seu perfil genético que as tornam mais vulneráveis ao desenvolvimento de uma resposta imunológica contra fatores ambientais e assim levar ao desenvolvimento da DC (Ivarsson *et al.*, 2003). Sendo assim, levando em consideração que temos uma relação de 2,2 mulheres para cada homem no nosso grupo estudado e que elas tem 2 vezes mais risco de desenvolver a DC e que achamos 1 celíaca já diagnosticada entre 946 indivíduos pesquisados, as chances de encontrar indivíduos com DC neste grupo deveriam ser maiores do que as possivelmente detectadas em um grupo com menor representatividade feminina.

Os dados sobre prevalência em idosos no Distrito Federal estão de acordo com aqueles previamente obtidos por Pratesi *et al.* (2003) no mesmo grupo populacional pertencente a uma mesma região geográfica, que relataram diminuição da prevalência de DC com o aumento da idade sendo que a frequência encontrada em crianças de 1 a 14 anos foi de 0,54% (5,44/1000) sendo 2,6 vezes maior do que a encontrada em adultos e idosos que foi de 0,21% (2,11/1000). Esta variação na prevalência de DC foi considerada inexplicável se considerarmos que a sensibilidade intestinal ao glúten é uma condição permanente que pode ser desencadeada em qualquer estágio da vida, muito embora apareça com diferentes expressões clínicas em pacientes de diferentes idades (Walker-Smith *et al.*, 1990) e submetidas a fatores ambientais variáveis ainda desconhecidos. Sendo assim, um aumento progressivo ou, pelo menos, uma prevalência similar entre indivíduos jovens e com idade avançada deveria ser encontrada.

Se considerarmos a paciente previamente diagnosticada com DC neste trabalho, nossa frequência seria ~0,11% (1,06/1000) mostrando numericamente o declínio dos casos de DC encontrado no Distrito Federal em comparação com grupos de outras faixas etárias desta mesma região geográfica (tabela 3) ao passo que Vilpulla *et al.* (2008, 2009) mostrou uma prevalência aumentada de DC entre indivíduos com 52 anos ou mais quando comparados com a população geral de crianças finlandesas (2,13% em idosos *versus* 1,0% em crianças) (Mäki *et al.*, 2003) e também demonstraram que em três anos houve um aumento da frequência de celíacos confirmados por biópsia no mesmo grupo Finlandês estudado, de 2,13% para 2,34%, resultando em uma incidência

anual de DC de 0,08% nesta população. Estes autores aventaram a hipótese do aumento do número de casos neste grupo de idosos finlandeses ser devido a um atraso no diagnóstico da DC ou ao aparecimento da doença em idade avançada ou então em consequência da ação conjunta das duas causas (Vilpulla *et al.*, 2009). Ivarsson *et al.* (1999) encontraram uma prevalência da DC de 1:188 em grupo de adultos suecos com idade variando entre 25 e 74 anos sendo que a maior parte dos celíacos era encontrado em indivíduos do sexo feminino com idade acima de 50 anos. Este fato reforça a hipótese que a presença de DC entre pacientes idosos não é baixa. Da mesma forma Lohi *et al.* (2007) relataram que a prevalência de DC na Finlândia parece ter dobrado nas últimas duas décadas em ambos os sexos e faixas etárias a partir de 30 anos o que poderia não ser atribuído somente à melhora no diagnóstico mas também a fatores ambientais.

No entanto, outras publicações têm evidenciado que o aumento de celíacos entre pacientes idosos comparado com grupos mais jovens não é regra absoluta e que uma prevalência aumentada de DC entre jovens é frequentemente observada (Mariné *et al.*, 2011; Llorente-Alonso *et al.*, 2006). Para explicar este fato, várias hipóteses foram sugeridas embora estudos posteriores sejam necessários para confirmá-las.

Uma das explicações sugeridas é que, similarmente a outras doenças autoimunes que tiveram sua incidência aumentada durante os últimos anos (Bach *et al.*, 2002), a prevalência de DC parece ter dobrado nas últimas duas décadas na Europa (Lohi *et al.*, 2007) e aumentado dramaticamente durante os últimos 50 anos nos Estados Unidos (Rubio-Tapia *et al.*, 2009), o aumento da DC em grupos jovens não pode ser atribuído somente à disponibilidade de marcadores sorológicos durante as últimas décadas, os quais possuem alta sensibilidade e especificidade e que permitiram a realização de diagnóstico em massa de pacientes oligossintomáticos e principalmente daqueles pacientes completamente assintomáticos (Ravikamura *et al.*, 2007) porque vários estudos comprovam que rastreamentos efetuados em banco de soros da década de 70 e 80 tem uma menor prevalência de DC nesta população quando comparada a controles atuais (2000) (Lohi *et al.*, 2007; Catassi *et al.*, 2010).

As possíveis causas para o aumento da DC com o passar do tempo são, ainda, desconhecidas, mas a explicação mais provável pode estar relacionada a fatores ambientais como: mudanças na quantidade, qualidade e processamento dos cereais (Rubio-Tapia *et al.* 2009) que é feito por meio de transglutaminase microbiana (m-tTG) a qual atua nas prolaminas de cereais como arroz e milho, para aumentar a

palatabilidade dos alimentos feitos com a farinha destes grãos entretanto, pacientes celíacos tem uma resposta imunológica maior a prolaminas de pães com e sem glúten que foram tratados com m-tTG do que aqueles sem tratamento com m-tTG o que sugere que esta modificação mediada por m-tTG induz a formação de novos antígenos nas prolaminas de pães com e sem glúten que podem estimular previamente o sistema imune adaptativo (Cabrera-Cháves *et al.*, 2008); mudança dos padrões de infecção durante a infância (“Teoria da Higiene”) (Kandrashova *et al.*, 2008) e mudanças nos hábitos alimentares infantis (Ivarsson *et al.*, 2000).

Dentre os fatores ambientais discutidos, o glúten, que está presente no trigo, e proteínas similares, que estão presentes no centeio e na cevada os quais desencadeiam a resposta imunológica característica da DC são os mais conhecidos, no entanto elas parecem não justificar a baixa prevalência encontrada em idosos no Distrito Federal visto que o glúten e proteínas relacionadas estão presentes nos alimentos que somam 52,8 % da energia consumida *per capita* no Brasil, baseada numa dieta média de 1733,43 Kcal/dia e se considerarmos que refeições prontas e misturas industrializadas entram nesta dieta e podem conter glúten, pois esta proteína é muito utilizada na indústria alimentícia (Sollid e Lundin, 2009), então este valor subiria para 59,2% como pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4 – Avaliação nutricional da disponibilidade domiciliar de alimentos no Brasil.

Participação relativa de:	Dieta média de 1733,43 Kcal/dia (100%)
	Representação nutricional em %.
Cereais e derivados	36,3
Pão Francês	6,2
Biscoitos	3,1
Macarrão	2,4
Farinha de trigo	0,9
Outros cereais e derivados	3,4
Cerveja	0,5
Refeições prontas e misturas industrializadas	6,4
Outros alimentos	40,8

Fonte: Adaptado de IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Trabalhos e Rendimentos, Pesquisas de Orçamentos Familiares 2008-2009.

Outra possível causa, destacada por Mariné *et al.* (2011), poderia estar relacionada a um número significativo de casos de DC que aparecem durante a infância mas que ficam latentes em períodos posteriores ou mesmo desenvolvem tolerância total ao glúten com consequente resultado sorológico negativo em idades avançadas, como foi destacado por Limbach *et al.* (2003) que encontrou adolescentes celíacos não responsivos ou pouco responsivos a reintrodução de glúten em sua dieta por período maior que dois anos.

Muitos outros estudos dão suporte a esta hipótese. Mäki *et al.* (1989) relataram que cinco dentre 38 indivíduos celíacos que estavam em dieta sem glúten e que foram convidados a retomar a dieta com glúten, apresentaram exames sorológicos negativos e biópsia intestinal normal após 2 anos consumindo alimentos com glúten. Matysiak-Budnik *et al.* (2007) relataram que 13 (21,31%) de seus pacientes celíacos diagnosticados na infância e que posteriormente retomaram a dieta com glúten não desenvolveram atrofia detectável nas biópsias duodenais. Igualmente, Limbach *et al.* (2003) investigaram 47 pacientes com DC confirmada que estavam em dieta sem glúten e reintroduziram esta proteína em suas refeições, mesmo após 2 anos de dieta com glúten, nove pacientes mostraram vilosidade intestinal e sorologia normal em 10,3 anos de desafio com glúten. Hopman *et al.* (2008) também encontraram, dentre 33 pacientes celíacos que estavam em dieta sem glúten e que retomaram o glúten em suas refeições, dois celíacos que não tinham sinais de DC após 20 anos de consumo continuado de glúten.

Entretanto, o número de casos com regressão espontânea da inflamação intestinal e que estejam em dieta com glúten é geralmente pequeno (Ahmerling e Franckx, 1986) e estas remissões das inflamações intestinais podem ser transitórias (Matysiak-Budnik *et al.*, 2007) em detrimento da possibilidade de um aumento ou diminuição da sensibilidade ao glúten durante os mais diferentes períodos da vida (Hopman *et al.*, 2008). Mesmo assim, levando em consideração o risco de retorno da DC em indivíduos com a doença latente e vilosidade intestinal normal, mesmo consumindo glúten em sua dieta, estes pacientes devem ser mantidos sob vigilância para não permitir que um possível retorno da DC não seja descoberto (Matysiak-Budnik *et al.*, 2007).

Uma terceira explicação para justificar a baixa prevalência no grupo de idosos quando comparada com indivíduos jovens da mesma região geográfica e níveis socioeconômicos similares é a possível existência de mortalidade aumentada entre os

celíacos, principalmente aqueles que nasceram a mais de 50 anos atrás, visto que a prevalência de DC em pacientes oligo ou assintomáticos era desconhecida neste período principalmente pelo fato de não haver os exames sorológicos que hoje existem para diagnóstico da DC (Rubio-Tapia *et al.* 2009) o que tornava difícil o diagnóstico porque só englobava pacientes com sintomas clássicos da DC como diarreia e problemas na absorção de alimentos, evidenciada por inexplicável perda de peso. Exames sorológicos como anti-gliadina, anti-tTG2 e IgA-EMA são recentes e usados para triar indivíduos que serão submetidos à biópsia (Green, 2009) e por tal razão muitos casos podem ter passado despercebidos frente à ausência de exames que detectassem celíacos oligo ou assintomáticos os quais podem ter falecido em decorrência de problemas secundários oriundos da DC. Um risco aumentado de mortalidade ocorre principalmente dentro dos primeiros anos de surgimento da DC e embora a severidade das manifestações clínicas possa estar mais relacionada com a morbidade do que com a mortalidade desta doença, foi relatado que a maioria das mortes em celíacos italianos ocorreu com aqueles com sintomas clássicos de má-absorção de alimentos quando diagnosticados ao passo que pacientes celíacos clinicamente diagnosticados com sintomas moderados ou aqueles diagnosticados por estudos de prevalência não mostraram relevante excesso de mortalidade (Corrao *et al.*, 2001).

As publicações que focam o índice de morte entre os celíacos são numerosas e em geral trazem resultados divergentes (Biagi e Corazza, 2010). Em recente estudo, Rubio-Tapia *et al.* (2009), comparando resultados de exames para anticorpos anti-tTG2 realizados em soros sanguíneos de um banco coletado entre 1948 e 1954 (9133 indivíduos saudáveis) e em soros sanguíneos de dois outros grupos recentes, o primeiro com idade semelhante a uma parte do grupo coletado em meados da década de 50 (à época da coleta de sangue) e o segundo grupo que possuía data de nascimento próxima ou igual a outra parte do grupo da década de 50, relataram DC não diagnosticada em 0,2% dos indivíduos que tinham soros sanguíneos coletados entre 1948 e 1954 ao passo que dentre os dois grupos recentes que foram citados, 0,9% deste e 0,8% daquele grupo recente tinham quase quatro vezes mais risco de morte quando comparados com indivíduos do mesmo grupo que possuíam sorologia negativa.

Cottone *et al.* (1999) compararam a incidência de celíacos com linfoma não Hodgkin com dados da incidência anual de linfoma não Hodgkin em população italiana maior que 35 anos e comparando os dados sobre mortalidade nos dois grupos, relataram maior incidência de mortalidade entre os celíacos italianos que foram diagnosticados na

idade adulta e que falharam na aderência à dieta sem glúten. Pacientes não diagnosticados e sem tratamento, parecem ter expectativa de vida reduzida e alto risco de desenvolver linfoma (Green *et al.*, 2003).

Apesar do evidente risco aumentado do desenvolvimento de linfoma em celíacos ele pode ser mais baixo do que aqueles previamente estimados (Loftus e Loftus, 2002) porque embora o linfoma seja 50 vezes mais frequente em celíacos do que na população geral, sua incidência anual é baixa, assim o risco absoluto de um celíaco desenvolver linfoma é modesto (Hopper *et al.*, 2007). Na Finlândia foi encontrado que o risco geral de câncer é o mesmo da população geral e que o índice de mortalidade é um pouco menor do que aqueles mostrados em estudos anteriores (Viljamaa *et al.*, 2006). Embora não haja concordância geral sobre a possível presença de uma alta taxa de mortalidade entre os celíacos, comparado com a população geral, pelo menos duas publicações evidenciam que a maior causa de morbidade e mortalidade entre os celíacos é a falta de diagnóstico precoce (Metzger *et al.*, 2006; Rubio-Tapia *et al.*, 2009).

Metzger *et al.* (2006) analisaram o soro sanguíneo de 4633 indivíduos coletado entre 1989 e 1990 no sul da Alemanha e encontraram níveis elevados de anticorpos IgA-tTG2 em 63 pacientes sendo que 15 indivíduos, com idade variando entre 45 e 74 anos para homens e 55 a 74 anos para mulheres, morreram entre 1989 e 1998, particularmente de câncer do trato digestivo assim, um elevado risco de morte dentre indivíduos que tinham níveis de anticorpos IgA-tTG2 foi observado em comparação com o risco de morte daqueles com sorologia negativa dentro do mesmo grupo o que sugere excesso de mortalidade por câncer e os resultados positivos para anticorpos IgA-tTG2 indicam DC não diagnosticada como fator desencadeante de malignidades nestes pacientes.

Em resumo, é muito possível e provável que as três hipóteses aventadas, ou seja, de um aumento progressivo das doenças autoimunes incluindo a DC, da possibilidade de latência ou cura e finalmente de mortalidade aumenta desta afecção, sejam corretas em maior ou menor grau e ajam de acordo com as condições ambientais nos diferentes países ou regiões geográficas nos quais as pesquisas foram realizadas. Nós acreditamos que neste estudo, quando aplicamos estas três hipóteses em um grupo populacional com baixo nível socioeconômico, e com difícil acesso ao sistema de saúde que conseqüentemente acarretam um provável aumento da prevalência de casos não-diagnosticados de DC e mesmo que estas pessoas sejam diagnosticadas como celíacos elas se deparam com um escasso acesso aos alimentos que não contém glúten, por isso

um aumento na mortalidade entre celíacos seja a hipótese mais plausível. Ao compararem os resultados por eles obtidos na população da Catalunha, Espanha com os resultados obtidos em estudo populacional obtido no Brasil (Pratesi *et al.*, 2003) asseveram que a mesma explicação para uma maior prevalência no grupo de crianças não pode ser aplicada à população da Catalunha, visto que a expectativa de vida nesta região é uma das maiores do mundo, com cobertura universal quanto aos cuidados de saúde e fácil acesso à dieta apropriada. Sua explicação alternativa para este resultados, seria a evolução da DC em direção à latência ou tolerância (Mariné *et al.*, 2011).

É notável que a alta prevalência de DC em pacientes com idade maior do que 55 anos e o baixo índice de mortalidade relacionado à DC é encontrado na Finlândia (Viljamaa *et al.*, 2006; Vilpulla *et al.*, 2009). Evidentemente o sistema de saúde Finlandês é melhor do que o Brasileiro, como mostra a Organização Mundial de Saúde, a maior parte de sua população tem fácil acesso a tratamentos de saúde além do que é um país pequeno, quando comparado ao Brasil, e mais fácil de ser manejado e organizado. Se a mesma pesquisa fosse desenvolvida em países desenvolvidos ou mesmo na cidade de Brasília, com foco no grupo populacional com alto nível socioeconômico e ótima qualidade de vida, provavelmente os resultados poderiam ter sido diferentes.

Embora tenhamos encontrado nove indivíduos com níveis de anticorpos IgA-tTG2 alterados, a possibilidade destes pacientes serem positivos ou evoluir para a DC é muito pequena, levando-se em conta que o teste IgA-EMA que é mais sensível e específico para diagnóstico de DC foi negativo. Em seis destes nove pacientes estavam presentes alelos HLA predisponentes ao desenvolvimento desta doença auto-imune, entretanto estes alelos estão presentes em um grande número de indivíduos na população geral e conseqüentemente seu valor positivo preditivo é extremamente baixo. Embora seja relatado na literatura a forte associação entre Síndrome de Down (SD) e a DC, a paciente número 6 (tabela 2), que tinha níveis elevados de anticorpos IgA-tTG2, não tinha anticorpos IgA-EMA nem tampouco os alelos HLA-DQ2 e/ou HLA-DQ8 que foram repetidamente testados, tornando mais forte a probabilidade de ela não ser celíaca.

8. Conclusões

A prevalência encontrada na população de idosos (> 60 anos), no Distrito Federal, foi de 1:946 (~0,11%). A prevalência de DC em crianças foi 2,6 vezes maior do que em adultos no DF e, levando em consideração a paciente previamente diagnosticada neste estudo, quando comparamos a prevalência de DC entre crianças e idosos (>60 anos), a relação entre eles aumenta 5,6 vezes.

9. Considerações Finais

Resumindo, embora ao compararmos o nosso grupo de 946 idosos com o grupo de 2023 crianças de 1 a 14 anos previamente analisado (Pratesi *et al.*, 2003), uma significância estatística não tenha sido alcançada ($p = 0,06$) torna-se evidente uma inesperada variação na prevalência de DC entre os grupos de diferentes idades. No estudo anterior (Pratesi *et al.*, 2003), foi encontrada uma prevalência 2,6 vezes maior em crianças do que em adultos. No presente estudo ao compararmos os valores encontrados constatou-se que a prevalência em criança tornou-se 5,4 vezes maior do que encontrada no grupo de idosos. Estes achados confirmam que em nossa região, em um grupo populacional de nível socioeconômico baixo, a prevalência de DC é significativamente mais alta em crianças quando comparada com idosos o que alerta para a necessidade de um diagnóstico precoce, uma assistência continuada e, nos celíacos diagnosticados, uma maior facilidade de acesso à dieta apropriada.

10. Bibliografia

Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Ann Rev Immunol* 2011; 29: 493-526.

Ascher H, Kristiansson B. Childhood celiac disease in Sweden. *Lancet* 1994, 344: 340-1.

Ahmerling DH, Franckx J. Childhood celiac disease: a long-term analysis of relapses in 91 patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1986; 5: 565-9.

Alessio M, Tonutti E, Brusca I, Radicer A, Licini L, Sonzogni A, Florena A, Schiaffino E, Marus W, Sulfaro S, Villalta D. Correlation Between IgA tissue transglutaminase antibody ratio and histological finding in celiac disease: a multicentre study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011;

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

Bauer S, Groh V, Steinle, Philips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress inducible MICA. *Science* 1999; 285(5428): 727-9.

Bevan S, Popat S, Braegger C, Busch A, O'Donoghue D, Falth-Magnusson K, Ferguson A, Godkin A, Hogberg L, Holmes G, Hosie K, Howdle P, Jenkins H, Jewell D, Johnston S, Kennedy N, Kerr G, Kumar P, Logan R, Love A, Marsh M, Mulder C, Sjoberg K, Stenhammer L, Walker-Smith J, Marossy A and Houlston R. Contribution of the MHC region to the familial risk of coeliac disease. *J Med Genet* 1999; 36: 687-90.

Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic disease. *New Engl J Med* 2002; 347: 911-20.

Bhatnagar S, Gupta SD, Mathur M, Alan D, Kumar PR, Knutton S, Unsworth K, Lock K, Natchu UCM, Mukhopadhyaya S, Saini S and Bhan MK. Celiac disease with mild to moderate histologic changes is a common cause of chronic diarrhea in Indian children. *J Paediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41: 204-9.

Biagi F, Corazza GR. Mortality in celiac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 158-62.

Bizzaro N, Tampoia M, Villalta D, Platzgummer S, Liguori M, Tozzoli R, Tonutti E. Low specificity of anti-tissue transglutaminase antibodies in patients with primary biliary cirrhosis. *J Clin Lab Anal* 2006; 20(5): 184-9.

Caja S Mäki M, Kaukinen K and Lindfors K. Antibodies in celiac disease: implications beyond diagnostics. *Cell Mol Immunol* 2011; 8: 103-9.

Cabrera-Chávez F, Rouzaud-Sández O, Sotelo Cruz N, Calderón de La Barca AM. Transglutaminase treatment of wheat and maize prolamins of Bread increases the serum IgA reactivity of Celiac Disease patients. *J Agr Food Chem* 2008; 56: 1387-91.

Carlsson AK, Axelsson IE, Borulf SK, Bredberg AC, Ivarsson SA. Serological screening for celiac disease in healthy 2.5-year-old children in Sweden. *Pediatrics* 2001; 107(1): 42-5.

Carroccio A, Giannitrapani L, Soresi M, Not T, Iacono G, Di Rosa C, Panfili E, Notarbartolo A, Montalto G. Guinea pig transglutaminase immunolinked assay does not predict coeliac disease in patients with chronic liver disease. *Gut* 2001; 49: 506-11.

Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, et al. Coeliac disease in the year 2000: Exploring the iceberg. *Lancet* 1994; 343: 200-3.

Catassi C, Räscht I-M, Gandolfi L, Pratesi R, Fabiani E, Asmar RE, Frija M, Bearzi I, Vizzoni L. Why is celiac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet* 1999; 354(9179): 647-8.

Catassi C, Kryszak D, Bhatti B, Sturgeon C, Helzlsouer K, Clipp SL, Gelfond D, Puppia E, Sferruzza A, Fasano A. Natural history of celiac disease autoimmunity in a US cohort followed since 1974. *Ann Med* 2010; 1-9

Chorzelski TP, Beutner EH, Sulej J, Tchorzewska H, Jablonska S, Kumar V, Kapuscinska A. IgA antiendomysium antibody. A new immunological marker of dermatitis herpetiformis and celiac disease. *Brit J Dermatol* 1984; 111: 395-402.

Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR. The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 408-16.

Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI). Collection, Transport, and processing of blood specimens for testing plasma based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline (5th edition)

Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI). Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture (Approved Standard – 6th ed.)

Collin, P, Reunala T. Recognition and management of the cutaneous manifestations of celiac disease: a guide for dermatologists. *Am J Clin Dermatol* 2003; 4(1): 13-20.

Corrao G, Corazza GR, Bagnardi V, Brusco G, Ciacci C, Cottone M, Guidetti CS, Usai P, Cesari P, Pelli MA, Loperfido S, Volta U, Calabró A, Certo M, for the Club del Tenue Study Group. Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study. *Lancet* 2001; 358: 356-61.

Cottone M, Termini A, Olivia L, Magliocco A, Marrone C, Orlando A, Pinzone F, Di Mitri R, Rosselli M, Rizzo A, Pagliaro L. Mortality and causes of death in celiac disease in a mediterranean area. *Dig Dis Sci* 1999; 44(12): 2538-47.

Crovella S, Brandao L, Guimaraes R, Filho JL de L, Arraes LC, Ventura A, Not T. Speeding up coeliac disease diagnosis in the developing countries. *Digest and Liver Dis* 2007; 39: 900-2.

Dicke, W K, Weijers, H A and Kamer J Hv D. Coeliac Disease The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr* 1953; 42(1): 34-42.

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

Di Sabatino A, Corazza GR. Coeliac Disease. *Lancet*; 373: 1480-93.

Farrell RJ, Kelly CP. Celiac Sprue. *New Engl J Med* 2002; 346: 180-88.

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 Int Med* 2003; 163: 286-92.

Fasano A, Shea-Donohue. Mechanisms of Disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Gastroenterol Hepatol* 2005; 2(9): 416-22.

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

Ferguson A, MacDonald T T, McClure J P, Holden R J. Cell-mediated immunity to gliadin within the small-intestinal mucosa in coeliac disease. *Lancet* 1975; 305(7912): 895-97.

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

Fesus L, Piacentini M. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci* 2002; 27(10).

Fleckenstein B, Molberg Ø, Qiao S-W, Schmid DG, Mülbe F von der, Elgstøen K, Jung G, Sollid LM. Gliadin T cell epitope selection by tissue transglutaminase in celiac disease. *J Biol Chem* 2002; 277(37): 34109-16.

Freeman, HJ. Adult celiac disease in the elderly. *World J Gastroenterol* 2008; 14(45): 6911-14.

Giccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR. The immune recognition of gluten in celiac disease. *Clin Exper Immunol* 2005; 140: 408-16.

Greco L, Romino R, Coto I, Di Cosmo N, Percopo S, Maglio M, Paparo F, Gasperi V, Limongelli MG, Cotichini R, D'Agate C, Tinto N, Sacchetti L, Tosi R, Stazi MA. The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut* 2002; 50: 624-8.

Green PHR. Mortality in Celiac Disease, Intestinal Inflammation, and Gluten Sensitivity. *J Am Med Assoc* 2009; 302(11): 1225-6.

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

Green PHR, Fleischauer AT, Bhagat G, Goyal R, Jabri B, Neugut AI. Risk of Malignancy in Patients with Celiac Disease. *Am J Med* 2003; 115: 191-5.

Green PHR, Stavropoulos SN, Panagi SG, Goldstain SL, McMahon DJ, Absan H, Neugut AI. Characteristics of adult celiac disease in the USA: results of a national survey. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(1): 126-131.

Hill ID. What Are the Sensitivity and Specificity of Serologic Tests for Celiac Disease? Do Sensitivity and Specificity Vary in Different Populations? *Gastroenterology* 2005; 128(4): 25-32.

Hoffenberg EJ, Mackenzie T, Katherine JB, George S, et al. A prospective study of the incidence of childhood celiac disease. *J Pediatr* 2003; 143: 308-14.

Hovhannisyán Z, Weiss A, Martín A, Wiesner M, Tollefsen S, Yoshida K, Ciszewski C, Curran SA, Murray JA, David CS, Sollid LM, Koning F, Teyton L, Jabri B. The role of HLA-DQ8 β 57 polymorphism in the anti-gluten T-cell response in coeliac disease. *Nature* 2008; 456: 534-8.

Hopper A D, Hadjivassiliou M, Butt S, Sanders D S. Adult coeliac disease. *Brit Med J* 2007; 335: 558-62.

Hopman EG, von Blomberg ME, Batstra MR, Morreau H, Dekker FW, Koning F, Lamers CB, Mearin ML. Gluten tolerance in adult patients with celiac disease 20 years after diagnosis? *Eur J Gastroen Hepat* 2008; 20: 423-29.

IBGE, Sinopse dos Resultados do Censo 2010 [Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE Web site]. 2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_aquisicao/default_pdf.shtm. Acessado em: 17 de Agosto de 2011.

Ivarsson A, Persson LA, Juto P, Peltonen M, Suhr O, Hernell O. High prevalence of undiagnosed coeliac disease in adults: a Swedish population-based study. *J Inter Med* 1999; 245: 63-8.

Ivarsson A, Persson LA, Nyström L, Ascher H, Cavell B, Danielsson L, Dannaeus A, Lindberg T, Lindquist B, Stenhammar L, Hernell nO. Epidemic of celiac disease in Swedish children. *Acta Paediatr* 2000; 89: 165-71.

Ivarsson A, Persson L A Nyström L and Hernell. The Swedish celiac disease epidemic with a prevailing twofold higher risk in girls compared to boys may reflect gender specific risk factors. *Eur J Epidemiol* 2003; 18: 677-84.

James MW, Scott BB. Endomysial antibody in the diagnosis and management of coeliac disease. *Postgrad Med J* 2000; 76: 466-68.

Johnson MW, Ellis HJ, Asante MA, Ciclitira PJ. Celiac disease in the elderly. *Gastroenterol Hepatol* 2008; 5(12): 697-706.

Kagnoff MF. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *J Clin Investig* 2007; 117(1): 41-9.

Karrel K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F, Greco L, Ciclitira PJ, Sollid LM, Partanen J and the Members of the European Genetics Cluster on Celiac Disease. HLA Types in Celiac Disease Patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) Heterodimer: Results From the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol* 2003; 64: 469-77.

Kim C-Y, Quarsten H, Bergseng E, Khosla C, Sollid LM. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Immunology* 2003; 101(12): 4175-79.

Kondrashova A, Mustalahti K, Kaukinen K, Viskari H, Volodicheva V, Haapala AM, Ilonen L, Knip M, Mäki M, Hyöty H, Epivir Study Group. Lower economic status and inferior hygienic environment may protect against celiac disease. *Ann Med* 2008; 40: 223-31.

Lasagni D, Ferrari R, Lapini M. Unmasking anti-endomysial antibodies in coeliac subjects positive for anti-smooth muscle antibodies. *Acta Paediatr* 1999; 88: 462-64.

Leeds JS, Hopper AD, Sanders DS. Coeliac disease. *Brit Med Bull* 2008; 88: 157-70.

Limbach A, Hoepffner W, Tannapfel A, Müller DM, Mothes T, Richter T. Long-term study of patients with celiac disease in childhood and adolescence: latent and transient celiac disease. *Clin Padiatric* 2003; 215: 76-81.

Liu Edwin, Rewers M, Eisenbarth. Genetic testing: who should do the testing and what is the role of genetic testing in the setting of celiac disease. *Gastroenterology* 2005; 128(4): S33-S34.

Llorente-Alonso MJ, Fernández-Aceñero MJ, Sebastián M. Gluten intolerance: Sex- and age-related features. *Can J Gastroenterol* 2006; 20(11): 719-22.

Loftus CG, Loftus EV. Cancer risk in Celiac Disease. *Gastroenterology* 2002; 123: 1726-35.

Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, Laurika K, Collin P, Rissanen H, Lohi O, Bravi E, Gasparin M, Reunanen A, Mäki M. Increasing prevalence of celiac disease over time. *Aliment Pharm Ther* 2007; 26: 1217-25.

Lorand L, Graham R M. Transglutaminases: Crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nature* 2003; 4: 140-56.

Losowsky MS. A history of coeliac disease. *Digest Dis* 2008; 26: 112-20.

McGowan K E, Lyon M E, Butzner J D. Celiac Disease and IgA Deficiency: Complication of serological testing approaches encountered in the clinic. *Clin Chem* 2008; 54(7): 1203-09.

Mahadev S, Bhagat G, Green PHR. Transient Celiac Autoimmunity in an Adult. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45(10): 912-13.

Mäki M, Mustalahti K, Kokkonen J, Kulmala P, Haapalahti M, Karttunen T, Ilonen J, Laurila K, Dahlbom I, Hansson T, Höpfl P, Knip M. Prevalence of celiac disease among children in Finland. *The New Engl J Med* 2003; 348: 2517-24.

Mäki M, Lähdeahi ML, Hällström O, Viander M, Visakorpi JK. Postpubertal gluten challenge in celiac disease. *Arch Dis Child* 1989; 64: 1604-07.

Mariné M, Farre C, Alsina M, Vilar P, Cortijo M, Salas A, Fernández-Bañares F, Rosinach M, Santaolalla R, Loras, C, Marquès T, Cusí V, Hernández M I, Carrasco A, Ribes J, Viver J M, Esteve M. The prevalence of coeliac disease is significantly higher in children compared with adults. *Aliment Pharm Ther* 2011; 33: 477-86.

Marsh MN. Mucosal pathology in gluten sensitivity. In: Coeliac Disease, ed. Marsh M. Oxford, UK: Blackwell Sci.; 1992. P. 136-91.

Matysiak-Budnik T, Candalh C, Cellier C, Dugave C, Namane A, Vidal-Martinez T, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Limited efficiency of prolyl endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 2005; 129: 786-96.

Matysiak-Budnik T, Malamut G, de Serre NP, Grosdidier E, Segulier S, Brousse N, Caillat-Zucman S, Cerf-Bensussan N, Schmitz J, Cellier C. Long-term follow-up of 61 coeliac patients diagnosed in childhood: evolution toward latency is possible on a normal diet. *Gut* 2007; 56: 1379-86.

Melo SBC, Fernandes MI, Peres LC, Troncon LE, Galvao LC, et al. Prevalence and demographic characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirao Preto, São Paulo State, Brazil. *Digest Dis and Sciences* 2006; 51: 1020–25.

Metzger MH, Heier M, Mäki M, Bravi E, Schneider A, Löwel H, Illig T, Schuppan D, Wichmann HE. Mortality excess in individuals with elevated IgA anti-transglutaminase antibodies: The KORA/MONICA Augsburg cohort study 1989-1998. *Eur J Epidemiol* 2006; 21: 359-65.

Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acid Res* 1988; 16(3): 1215.

Mukherjee R, Egbuna I, Brar P, Hernandez L, McMahon Dj, Shane EJ, Bhagat G, Green PHR. Celiac disease: similar presentations in the elderly and young adults. *Digest Dis Sci* 2010; 55(11): 3147-53.

Murray JA, Van Dyke C, Plevak MF. Trends in the identification and clinical features of celiac disease in a North America community. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2003; 1(1): 19-27.

Nistico L, et al. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut* 2006; 55: 803–8.

Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 1993; 41: 119-34.

Oliveira RP, Sdepanian VL, Barreto JA, Cortez AJP, Carvalho FO, Bordin JO, Soares MAdeC, Patrício FR da S, Kawakami E, Morais MB de and Fagundes-Neto U. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. *Eur J Gastroen Hepat* 2007; 19: 43-49.

Peracchi M, Trovato C, Longhi M, Gasparin M, Conte D, Tarantino C, Prati D, Bardella MT. Tissue transglutaminase antibodies in patients with end-stage heart failure. *Am J Gastroenterol* 2002; 97: 2850-54.

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

Petronzelli F, Bonamico M, Ferrante P, Grillo R, Mora B, Mariani P, Apollonio I, Gemme G, Mazzilli M C. Genetic contribution of the HLA region to the familial clustering of celiac disease. *Ann Hum Genet* 1997; 61: 307-17.

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

Ravikumara M, Nootigattu VKT, Sandhu BK. Ninety percent of Celiac Disease is being missed. *J Paediatr Gastroenter Nutr* 2007; 45: 497-99.

Qiao S, Sollid LM e Blumberg RS. Antigen presentation in celiac disease. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 111-7.

Rashtak S, Murray JA. Celiac disease in the elderly. *Gastroenterol Clin N* 2009; 38: 433-46.

Ravikamura M, Nootigattu VKT, Sandhu BK. Ninety percent of celiac disease is being missed. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007; 45:497-9.

Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan EL, Johnson DR, Page W, Erdtmann F, Brantner TL, Kim WR, Phelps TK, Lahr BD, Zinsmeister AR, Melton Lj 3rd, Murray JA. Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology* 2009; 137: 88-93.

Rostom A, Murray J A, Kagnoff M F. American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology* 2006; 131: 1981-2002.

Sanders DS, Hurlstone DP, Stokes RO, Rashid F, Milford-Ward A, Hadjivassiliou M, Lobo. Changing face of adult coeliac disease: experience of a single university hospital in South Yorkshire. *Postgrad Med J* 2002; 78: 31-33.

Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray G M, Sollid L M, Khosla C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002; 297: 2275-9.

Sollid LM, Markussen G, Ek J, Gjerde H, Vartdal F, Thorsby E. Evidence for a primary association of celiac disease to particular HLA-DQ α/β heterodimer. *J Exp Med* 1989; 169: 345-50.

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

Sollid LM, Molberg O, McAdam S, Lundin KE. Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase—guilt by association? *Gut* 1997; 41:851–52.

Sollid LM, Lie, BA. Celiac Disease Genetics: Current Concepts and Practical Applications. *Clin Gastroenterol H* 2005; 3: 843-51.

Sollid L.M, Lundin K. Diagnosis and treatment of celiac disease. *Mucosa Immunol* 2009; 2(1): 3-7.

Sood A, Midha V, Sood N, Avashti G, Sehgal A. Prevalence of celiac disease among school children in Punjab, north India. *J Gastroenterol Hepatol* 2006; 21: 1622-25.

Tack GJ, Verbeek WHM, Schreurs MWJ, Mulder CJJ. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nature reviews Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 204-13.

Talley NJ, Valdovinos M, Petterson TM, Carpenter HA, Melton LJ Epidemiology of celiac sprue: a community-based study. *Am J Gastroenterol* 1994; 89(6): 843-6.

Tesei N, Sugai E, Vásquez H, Smecuol E, Niveloni S, Mazure R, Moreno ML, Gomez JC, Mauriño E, Bai JC. Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase may detect coeliac disease patients undiagnosed by endomysial antibodies. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 1415-23.

Tommasini A, Not T, Ventura A. Ages of celiac disease: from changing environment to improved diagnostics. *World J Gastroenterol* 2011; 17(32): 3665-71.

Vader LW, Ru A, Wal Y van der, Kooy Y MC, Benckhuijsen W, Mearin M L, Drifhout JW, Veelen P van, Koning F. Specificity of tissue transglutaminase explains cereal toxicity in celiac disease. *J Exp Med* 2002; 195(5): 643-649.

van Heel DA, West J. Recent advances in coeliac disease. *Gut* 2006; 55: 1037-46.

Vecchi M, Folli C, Donato MF, Formenti S, Arosio E, de Franchis R. High rate of positive anti-tissue transglutaminase antibodies in chronic liver disease. Role of liver decompensation and of the antigen source. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 50-4.

Vereckei E, Szodoray P, Poor G, Kiss E. Genetic and immunological processes in the pathomechanism of gluten-sensitivity enteropathy and associated metabolic bone disorders. *Autoimmun Rev* 2011; 10: 336-40.

Viljamaa M, Kaukinen K, Pukkala E, Hervonen K, Reunala T, Collin P. Malignancies and mortality in patients with celiac disease and dermatitis herpetiformis: 30-year population-based study. *Digest and Liver Dis* 2006; 38: 374-80.

Villalta D, Crovatto M, Stella S, Tonutti E, Tozzoli R, Bizzaro N. False positive reactions for IgA and IgG anti-tissue transglutaminase antibodies in liver cirrhosis are common and method-dependent. *Clin Chim Acta* 2005; 356(1-2): 102-109.

Vilppula A, Collin P, Maki M, Valve R, Luostarinen M, Krekelä I, Patrikainen H, Kaukinen K, Luostarinen L. Undetected coeliac disease in the elderly: a biopsy-proven population-based study. *Digest and Liver Dis* 2008; 40(10): 809–13.

Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, Krekelä I, Patrikainen H, Valve R, Mäki M and Collin P. Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in the elderly people: A population-based study. *BMC Gastroenterology* 2009; 9:49.

Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child* 1990; 65: 909-911.

West J, Logan R F A, Hill, P G, Khaw K. The iceberg of celiac disease: what is below the waterline? *Clin Gastroenterol H* 2007; 5: 59-62.

West J, Logan RF, Hill PG, Lloyd A, Lewis S, Hubbard R, Reader R, Holmes GKT, Khaw K-T. Seroprevalence, correlates and characteristics of undetected celiac disease in England. *Gut* 2003; 52: 960-65.

Wolters V M, Wijimenga C. Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 190-95.

Ziliè S, Barac M, Pesic M, Dodig D, Ignjatovic-Micic. Characterization of proteins from grain of different bread and durum wheat genotypes. *Int J Mol Sci* 2011; 12: 5878-94.

Zimmer KP, Naim H, Weber P, Ellis HJ, Ciclitira PJ. Targeting of gliadin peptides, CD8, α/β -TCR, and γ/δ -TCR to Golgi complexes and vacuoles within celiac disease enterocytes. *FASEB J* 1998; 12: 1349-57.

13. ANEXOS

13.1 Anexo 1 – Análise do projeto de pesquisa e parecer do CEP-FM

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro de Projeto: CEP-FM 005/2010.

Título: “Rastreamento de doença celíaca entre pacientes idosos atendidos no Hospital Universitário de Brasília”.

Pesquisador Responsável: Lenora Gandolfi.

Documentos analisados: Folha de rosto, carta de encaminhamento, declaração de responsabilidade, protocolo de pesquisa, termo de consentimento livre e esclarecido, cronograma, bibliografia pertinente e currículo (s) de pesquisador (es).

Data de entrega: 28/01/2010.

Parecer do (a) relator (a)

Aprovação

Não aprovação.

Data da primeira análise pelo CEP-FM/UNB: 30/03/2010.

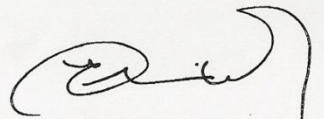
Data do parecer final do projeto pelo CEP-FM/UNB: 31/03/2010.

PARECER

Com base na Resolução CNS/MS nº 196/96 e resoluções posteriores, que regulamentam a matéria, o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília decidiu **APROVAR**, na reunião ordinária de 31/03/2010, conforme parecer do (a) relator (a), o projeto de pesquisa acima especificado quanto aos seus aspectos éticos.

1. Modificações no protocolo devem ser submetidas ao CEP, assim como a notificação imediata de eventos adversos graves;
2. O (s) pesquisador (es) deve (m) apresentar relatórios periódicos do andamento da pesquisa ao CEP-FM.

Brasília, 01 de Abril de 2010


Prof.^a Elaine Maria de Oliveira Alves
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Faculdade de Medicina-UNB

13.2 Anexo 2 – TCLE

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – HUB

Projeto: Rastreamento de Doença Celíaca entre pacientes idosos atendidos no Hospital
Universitário de Brasília.

Pesquisadores: Lenora Gandolfi, Riccardo Pratesi e Lucas Malta Almeida

Telefone do laboratório de pesquisa em pediatria: (61) 3107-1988

Termo de consentimento livre e esclarecido:

Venho por meio deste termo de consentimento livre e esclarecido, convidar o senhor(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado: “Rastreamento de Doença Celíaca entre pacientes idosos atendidos no Hospital Universitário de Brasília”, pois não se sabe, no Brasil, se a Doença Celíaca ataca muitos idosos como acontece em outros países. Estes dados ajudarão médicos e profissionais a dar maior atenção a esta doença e propor tratamento.

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

Foi me explicado que se for positivo para Doença Celíaca, posso ter tido exposição muito prolongada ao glúten ou ter desenvolvido a doença após certa idade e que isso pode trazer, por exemplo, problemas como má-absorção de importantes nutrientes, levando a outras doenças, ou mesmo intensificando-as. Falaram-me que se não houver tratamento, posso desenvolver outras complicações e ter redução na qualidade e expectativa de vida.

Fui informado que para eu, ou o sujeito sob minha responsabilidade, participar da pesquisa deve-se tirar sangue de uma das veias do braço, que é um procedimento comum em medicina e que tem risco muito pequeno para a saúde.

Foi garantido para mim pelos pesquisadores, que os testes realizados são confiáveis e realizados por profissionais com ampla experiência. Eu não pagarei nada pelo exame e o resultado será informado para mim. O resultado do meu teste será mantido em privacidade e meu nome, ou sujeito sob minha responsabilidade, não será identificado em nenhum relatório ou publicação. No caso do resultado do meu exame der positivo, haverá uma assistência continuada pelo médico do Serviço de Gastroenterologia do HUB, mas poderei procurar por outro serviço, se desejar. A minha recusa em participar da pesquisa, não implicará em qualquer prejuízo na prestação da assistência para mim, pela equipe do Serviço de Gastroenterologia do HUB. Mesmo após a assinatura desse termo de consentimento, ficarei livre para abandonar a pesquisa a qualquer momento, também sem qualquer prejuízo.

Dessa maneira, depois de ter sido devidamente informado, declaro que concordo voluntariamente ou permito que o sujeito sob minha responsabilidade, participe do projeto e se tiver qualquer dúvida poderei entrar em contato com o responsável pela pesquisa, que é a Dra. Lenora Gandolfi, pelo telefone (61) 3107-1989 ou com Lucas Malta Almeida pelo telefone (61) 3107 -1988.

Brasília,.....de201.....

Assinatura do paciente ou responsável pelo paciente:

.....

Assinatura do médico ou pesquisador responsável:.....

13.3 Anexo 3 - Questionário

Nome: _____ Data: _____

Sexo: () M () F Data nasc.: ___/___/___/ Idade: ___ Estado de origem: _____

Residência: _____

Tel(s): _____ Tel(s) contatos: _____

Peso: _____ Altura: _____ Soro/DNA: _____

Auto-classif: () Branco () afro-descendente (negro) () Ameríndio () Asiático () Mestiço

Você sofre de alguma doença (p.e.: reumatismo, diabetes, tireóide, artrite): () sim () não

Você tem alguma queixa frequente (p.e.: diarréia, dor de barriga, barriga inchada, gases excessivos, perda de peso)?

Está em uso diário de um ou mais remédios? () Sim () Não Qual(is)?

Tem Doença Celíaca? () Não () Sim: Há quanto tempo?

O diagnóstico foi baseado: () no que estava sentindo () em testes especiais de sangue
() em biópsias intestinais

Faz dieta sem glúten? () não () sim () estrita () com falhas eventuais

Tem algum parente com esta doença () não () sim – Quem:

Clínica de origem:

Exames solicitados:

Observações:

13.4 ANEXO 4 – Artigo Científico

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest

The authors confirm that there is no funding source for this study

Decreased prevalence of celiac disease among disadvantaged elderly

Lucas Malta Almeida¹, Lenora Gandolfi^{1,2}, Patricia Maria Fritsch¹, Riccardo Pratesi^{1,2},
Yanna Karla de Medeiros Nóbrega^{2,3}

¹ Graduate Program in Medical Sciences, University of Brasilia School of Medicine, Brasilia, DF, Brazil

² Research Center for Celiac Disease and Pediatric Research Laboratory, University of Brasilia School of Medicine, Brasilia, DF, Brazil

³ Department of Pharmaceutical Sciences, School of Health Sciences, University of Brasilia, Brazil.

Corresponding author:

Yanna Karla de Medeiros Nóbrega
SQN 314 Bloco E Apt 501
Asa Norte, Brasília-DF
CEP 70767-050
(+55)61 3107-1991
yannanobrega@gmail.com

Abstract

Background and objective: The aim of this study was to determine the prevalence of celiac disease (CD) in a group of Brazilian individuals over 60 years of age and compare it with the previously known prevalence in the pediatric population of the same area. To date, the limited number of studies addressing this issue report contradictory results. **Methods:** Blood samples from 946 outpatients aged 60 years or older were tested for immunoglobulin A anti-transglutaminase antibodies by ELISA. All positive sera were further tested for anti-endomysium antibodies. HLA genotyping was performed for all individuals who exhibited discrepant serologic results. **Results:** Among the 946 subjects only one previously diagnosed case of biopsy-proven CD was detected. Among the remaining subjects, nine tested positive for immunoglobulin A anti-transglutaminase antibodies; however, none of them tested positive for immunoglobulin A human anti-endomysium antibodies. HLA genotyping of those nine subjects revealed six individuals positive for DQ2, DQ8 or both alleles. **Conclusions:** In the present study, the prevalence of CD in the studied group was 5.4 times lower than the one found in children and adolescents. Without excluding other possible causes, the most likely reason for this difference is increased CD patient mortality associated with adverse environmental conditions.

Key words: Celiac disease, Epidemiology, Elderly, Mortality.

Introduction

Celiac disease (CD) is a chronic autoimmune-mediated disease with both intestinal and systemic manifestations that are induced by the ingestion of gluten in genetically predisposed individuals. CD intestinal abnormalities are predominantly characterized by villous atrophy, crypt hyperplasia and lymphocyte infiltration of the small jejunal mucosa caused by T-cell responses to the enzyme transglutaminase 2 [1] and gluten-derived gliadin peptides [2]. CD is a life-long disease that may start at any age; additionally, as it involves multiple organs or systems, it can present with variable clinical expression variations. The only effective therapy for CD is strict dietary abstinence from gluten-containing foods.

During the last few decades, the advent of reliable serologic tests has greatly facilitated CD diagnosis, and allowed for large screening studies to be performed. Worldwide prevalence rates, using similar sequential testing paradigm, i.e. immunoglobulin A anti-transglutaminase (IgA-htTG) antibodies and/or anti-endomysium antibodies (IgA-EMA) tests, ranged between 1:100 [3] to more than 1:500 individuals [4, 5]. Geographical variations in prevalence may be related to differences in the genetic profiles of the populations, age-related variations in exposure to gluten and/or changes in presumed environmental risk factors. Due to the variability of its clinical spectrum, a final diagnosis of CD can be delayed, often remaining unrecognized for many years [6, 7].

Traditionally, CD has been regarded as a disease of childhood and early adulthood that rarely develops in older individuals. However, in recent years, as can be observed in published clinical studies mainly from North America and Europe, growing prevalence of this disorder in elderly has been detected, with new diagnoses being made in patients 70 years of age and older [8, 9]. While some of these studies pointed to an increased prevalence of CD in older age groups [8, 9], others showed a higher prevalence in children and adolescents [10,11]. Because gluten sensitivity is a life-long condition that can develop at any age, higher or at least similar prevalence rates would be expected in adults and elderly individuals compared to children.

Previously, we found an increased prevalence of CD in a group of children and adolescents compared to a group of adults and elderly individuals [10]. In this study, which was performed in a population originating from the same geographic region with similar socio-economic and cultural status, we aimed to determine the prevalence of

CD in adults over 60 years of age; further, we compared our present results with the prevalence of CD reported in children and adolescents in our previous study.

Patients and methods

The research protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Brasilia School of Medicine. All individuals included in the protocol were informed of the study's objectives, risks and benefits and consented to the use of the collected specimens for research. Between May 2010 and July 2011, blood samples from 946 outpatients aged 60 years or older were collected and stored at -20°C until use. In total, 295 males and 651 females, with a mean and median age of 68.1 years and 67 years, respectively, were included in the study; the age range of the patients was 60 to 92 years. The age distribution corresponded closely to the age distribution of the Brazilian population in the 2010 census [12].

We were unable to find any previous studies concerning the prevalence of celiac disease in the Brazilian elderly. Based on an estimated prevalence of 2.34% and a desired precision of 1% and confidence level of 95%, the minimum number of individuals to be analyzed was determined to be 878. Our prevalence estimate was based on the prevalence of CD in individuals over 55 years of age in Finland reported by Vilppula *et al.* [9].

The study participants were consecutive and unselected outpatients who were undergoing blood tests at the Laboratory of Clinical Pathology of the University of Brasilia Hospital. The most frequent reasons for blood testing were routine health check-ups, suspected or recurrent infections, chronic ailments, metabolic disorders and pre-operative check-ups. Although the patients originating from the hospital gastroenterology clinic were excluded to avoid a selection bias, no other exclusion criteria were applied, regardless of the possible existence of symptoms or conditions commonly associated with celiac disease.

The Brasilia University Hospital is a government reference hospital that predominately serves the low-income population of the city of Brasilia and surrounding regions; in general, this population does not have private health insurance and depends exclusively on the governmental national health system. Additionally, this population exhibits mixed ancestry, in which a considerable contribution of European ancestry is

found intermixed with a variable parcel of other races, such as Afrodescendent and Amerindians.

Patient serum samples were tested for IgA-htTG antibodies using the IgA-htTG Quanta Lite Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit (Inova Diagnostic, Inc. San Diego, CA, USA); the limit of positivity was set at 20 arbitrary units, in accordance with the manufacturer's instructions. As a second step, all IgA-htTG positive samples were further tested for the presence of IgA-EMA antibodies using indirect immunofluorescence on primate distal esophagus cryosections (Inova Diagnostic).

Individuals who exhibited positive serologic results for IgA-tTG and/or IgA-EMA antibodies were submitted to HLA genotyping. Genomic DNA was extracted from peripheral venous blood samples using the IllustraTMBlood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). HLA-DQA1*0501 (DQ2), HLA-DQB1*02 (DQ2) and HLA-DQA1*0301 (DQ8) genotyping was performed by polymerase chain reaction (PCR) amplification using sequence-specific primers (PCR-SSP). As an internal positive amplification control, each PCR reaction included a primer pair for a conserved region of the DRB1 gene. Amplified products were separated using 2% agarose gels, stained with ethidium bromide and then visualized under a UV transilluminator.

Results

Among the 946 subjects that consented to participate in the study, only a single previously diagnosed case of biopsy-proven CD in a 66-year-old woman was detected. Among the remaining subjects, nine serum samples tested positive for IgA-tTG antibodies. None of the patients tested positive for IgA-EMA antibodies. The clinical and laboratory data of the nine patients who tested positive for IgA-tTG antibodies are depicted in Table 1.

Table 1: Clinical and laboratory data of 9 patients with abnormal results on the IgA-tTG ELISA test

Patients	Sex	Age (y)	tTG	EMA	HLA	Symptomatology and associated disorders
1	M	63	39.9	Neg	Negative	Anemia, arthritis
2	M	71	34.5	Neg	DQB1*0201 (DQ2)	Hypertyroidism
3	M	81	31,3	Neg	DQA1*0301 (DQ8)	No complaints
4	F	60	42.9	Neg	DQB1*0201+ DQA1*0301 (DQ2+DQ8)	No complaints
5	F	60	30.6	Neg	DQA1*0301 (DQ8)	Osteopenia, arthritis, recurrent abdominal pain, Flatulence
6	F	63	52.3	Neg	Negative	Down syndrome, arthritis, osteoporosis, hyperthyroidism
7	F	65	34	Neg	DQAI*0301 (DQ8)	No complaints
8	F	68	45.3	Neg	DQA1*0501 + DQA1*0301 (DQ2+DQ8)	Osteoporosis, weight loss, flatulence
9	F	72	45.2	Neg	Negative	Osteoporosis

A group of 2034 children younger than 15 years (age range, 1 to 14 years; mean age, 8 years) that were a part of our previous CD prevalence screening study [10] were

used as a reference group to establish the prevalence of CD in children in our area. These children originated from the same geographical region and were from a similar low-income background as the subjects included in the current study. The prevalence of CD among the children was 0.54% (CI 95%, 0.27- 0.57). Among the 946 elderly individuals surveyed, the CD prevalence was 0.1% (CI 95%, 0.00 - 0.59%).

Table 2: Celiac disease among 946 elderly and among 2034 children and adolescents originating from the same geographical region and from a similar low-income class stratum.

Patients	Celiac	Non celiac	Total
> 60 years	1	945	946
1 to 14 years	11	2023	2034

OR =0.19 (CI 95% 0.01 – 1.45); Fisher test: $p = 0.06$

Discussion

In this study, among the 946 elderly individuals tested, only a single case of previously-detected CD was found. Although nine individuals showed moderately increased levels of anti-tTG antibodies, no subjects tested positive for IgA-EMA antibodies. One or more of the predisposing HLA alleles were present in six of the subjects who tested positive for IgA-tTG antibodies. Although patient number six was highly suspected to have CD, repeated IgA-EMA and HLA testing consistently disclosed negative results. Despite the extreme rarity of celiac patients that carry neither DQ2 nor DQ8 alleles [13], a jejunal biopsy was suggested for patient number six because of the clinical indications. However, the biopsy procedure was refused by the patient's family. In addition to the five patients with predisposing HLA alleles and moderately increased anti-tTG antibody levels, this patient will be followed with periodic clinical and serological evaluations.

The results of the present screening are in agreement with our previous study [10] performed in the same geographical area with a similar population group. In our previous study, most CD cases were clustered in the younger age group; for example, the prevalence of CD in children (1 - 14 years) was 2.6 times higher than in adults and elderly individuals (5.44 versus 2.11 per 1000, respectively). This variation in CD prevalence between age groups is unexpected if we consider that intestinal sensitivity to gluten is a permanent condition which, aside from the ingestion of gluten, can be

triggered at any stage of life by additional environmental factors that remain largely unknown. Thus, a progressive increase or, at least, a similar prevalence with advancing age would be expected. Recent studies by Vilppula *et al.* [8,9] in Finland showed an increase in CD prevalence among individuals over 50 years of age compared to the general prevalence in Finnish children (2.13% versus 1%). Further, these authors also demonstrated an increased prevalence within a three-year period in the same group, from 2.13% to 2.34%, which resulted in an annual CD incidence of 0.08% in this population. However, several other studies report contradictory results, reporting increased CD prevalence in younger populations [11, 14, 15]. Although several hypotheses have been suggested to account for these discrepancies, none have been definitively proven.

CD was considered a rare disease until the late 1970s and its prevalence was estimated to be as low as 0.03% worldwide [16]. With the advent of highly sensitive and specific serological tests its prevalence increased dramatically during the last decades and this increase would not solely be due to better diagnostic methods that enabled extensive screening studies and the diagnosis of oligosymptomatic or even asymptomatic forms of the disease. Similarly to other autoimmune disorders that have shown a steady rise in their incidence over the last decades [17], the prevalence of CD has increased significantly and nearly doubled during the last two decades [18, 19]. Although the causes underlying this increased prevalence over time remain unknown, the likely explanations include environmental influences, such as changes in the quantity, quality and processing of cereal, changing patterns of early childhood infection (“hygiene hypothesis”) [20] and changes in infant dietary habits [21].

Another possible cause suggested by Mariné *et al.* [11] is that a significant number of CD cases that appear during childhood evolve into progressive latency or into total gluten tolerance; thus, these patients would exhibit negative serologic results in older age groups. Several other studies appear to support this hypothesis [22, 23, 24]. However, the number of described spontaneous recoveries of normal villous architecture in patients with gluten containing diets is generally small [25], and it is uncertain whether the observed remissions can be considered definitive recoveries. Additionally, in view of the existing risk of relapse, extended follow-up is required for these patients [23,26].

A third explanation is the possible existence of increased mortality in CD patients. Publications addressing this issue are numerous and conflicting in nature [27].

The reported overall mortality rates in CD patients vary from 0.52%, which suggests a reduced mortality rate [29], to 3.9% in a recent study focusing on undiagnosed CD in adults [19]. Despite these conflicting results, at least two publications point to undiagnosed CD as a major cause of increased morbidity and mortality [19, 28].

These three hypotheses are not mutually exclusive, and it is both possible and probable that each of these factors contribute to the decreased prevalence of CD in elderly individuals to a greater or lesser degree depending on the environmental conditions present in different geographical regions or countries. In our study, we focused on a low socio-economic population with limited access to health care; consequently, these conditions are likely associated with an increased prevalence of undiagnosed CD. Further, once diagnosed, patients would have limited access to an appropriate supply of gluten-free food. Thus, we hypothesize that increased mortality due these adverse environmental conditions is the most plausible explanation for our results. It is noteworthy that both the higher prevalence of CD in patients aged over 55 years and lower CD mortality rates were observed in Finland [9, 29]. Comparisons between Finland and Brazil are contentious at best, as the World Health Organization (WHO) [30] health system rankings of the countries were 31 and 125, respectively. If this same survey had been performed in developed countries or even in the same city of Brasilia, but with a population group with higher socio-economic status and increased quality of life, the results would likely have been different.

In conclusion, this study supports our previous findings that detected an unexplained age-related variation in CD prevalence, where CD was 2.6 times higher in children compared to adults. In the present study, only a single previously diagnosed case of CD was identified; consequently, the difference in prevalence increased, with the CD prevalence in children being 5.4 times higher than that in the elderly. These findings confirm that in low socio-economic populations in our region, CD prevalence is significantly and unexpectedly higher in children compared to the elderly. Our findings also reinforce the imperative need for early diagnosis and continued assistance to any individual affected by CD.

References

1. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*. 1997;3:797-801.
2. Niveloni S, Sugai E, Cabanne A, et al. Antibodies against synthetic deamidated gliadin peptides as predictors of celiac disease: prospective assessment in an adult population with a high pretest probability of disease. *Clin Chem*. 2007;53:2186-92.
3. Mäki M, Mustalahti K, Kokkonen J, et al. Prevalence of Celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med*. 2003 Jun 19; 348(25):2517-24.
4. Gandolfi L, Pratesi R, Cordoba JC, et al. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol*. 2000;95:689-92.
5. Roka V, Potamianos SP, Kapsoritakis AN, et al. Prevalence of coeliac disease in the adult population of central Greece. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2007 Nov;19:982-7.
6. Ivarsson A, Persson LA, Juto P, et al. High prevalence of undiagnosed coeliac disease in adults: a Swedish population-based study. *J Intern Med*. 1999;245:63-8.
7. Ravikumara M, Nootigattu VK, Sandhu BK. Ninety percent of celiac disease is being missed. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007; 45: 497-9.
8. Vilppula A, Collin P, Mäki M, et al. Undetected coeliac disease in the elderly: a biopsy-proven population-based study. *Dig Liver Dis*. 2008 Oct;40(10):809-13. Epub 2008 May 7.
9. Vilppula A, Kaukinen K, Luostarinen L, et al. Increasing prevalence and high incidence of celiac disease in elderly people: a population-based study. *BMC Gastroenterol*. 2009;9:49.
10. Pratesi R, Gandolfi L, Garcia SG, et al. Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population. *Scand J Gastroenterol*. 2003; 38:747-50.
11. Mariné M, Farre C, Alsina M, et al. The prevalence of coeliac disease is significantly higher in children compared with adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011;33:477-86.

12. IBGE, Sinopse dos Resultados do Censo 2010 [Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, IBGE Web site]. 2011. Available at: <http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/webservice/>. Accessed August 17, 2011.
13. Karelk K, Louka AS, Moodie J, et al. HLA Types in Celiac Disease patients not carrying the *DQA1*05-DQB1*02* (DQ2). Heterodimer: Results from the European genetics cluster on Celiac Disease. *Human Immunology* 2003;64:469-77.
14. Corazza GR, Andreani ML, Biagi F, et al. The smaller size of the 'coeliac iceberg' in adults. *Scand J Gastroenterol.* 1997;32:917-9.
15. Volta U, Bellentani S, Bianchi FB, et al. High prevalence of celiac disease in Italian general population. *Dig Dis Sci.* 2001;46:1500-5.
16. Green PHR, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet.* 2003;362:383-91.
17. Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med.* 2002;347: 911-20.
18. Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, et al. Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007;26:1217-25.
19. Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan EL, et al. Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology.* 2009;137:88-93.
20. Kondrashova A, Mustalahti K, Kaukinen K, et al. Lower economic status and inferior hygienic environment may protect against celiac disease. *Ann Med.* 2008;40:223-31.
21. Ivarsson A, Persson LA, Nyström L, et al. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr.* 2000; 89:165-71.
22. Limbach A, Hoepffner W, Tannapfel A, et al. Long-term study of patients with coeliac disease in childhood and adolescence: latent and transient coeliac disease. *Klin Padiatr.* 2003;215:76-81.
23. Matysiak-Budnik T, Malamut G, de Serre NP, et al. Long-term follow-up of 61 coeliac patients diagnosed in childhood: evolution toward latency is possible on a normal diet. *Gut.* 2007;56:1379-86.

24. Hopman EG, von Blomberg ME, Batstra MR, et al. Gluten tolerance in adult patients with celiac disease 20 years after diagnosis? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20:423-9.
25. Shmerling DH, Franckx J. Childhood celiac disease: a long-term analysis of relapses in 91 patients. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1986;5:565-9.
26. Kurppa K, Collin P, Lindfors K, et al. Spontaneous negative seroconversion of endomysial antibodies does not exclude subsequent celiac disease. *JPGN*. 2011;53(5):576-79
27. Biagi F, Corazza GR. Mortality in celiac disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7: 158-62.
28. Metzger MH, Heier M, Mäki M, et al. Mortality excess in individuals with elevated IgA anti-transglutaminase antibodies: the KORA/MONICA Augsburg cohort study 1989-1998. *Eur J Epidemiol*. 2006;21:359-65.
29. Viljamaa M, Kaukinen K, Pukkala E, et al. Malignancies and mortality in patients with coeliac disease and dermatitis herpetiformis: 30-year population-based study. *Dig Liver Dis*. 2006 Jun;38(6):374-80. Epub 2006 Apr 14.
30. WHO, Health Systems: Improving Performance [The World Health Reporter 2000, WHO Web site]. 2000. Available at: http://www.who.int/whr/2000/en/whr00_en.pdf. Accessed October 09, 2011.