

MAGDA BAHIA

**AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DOS
MARCADORES SOROLÓGICOS PARA
DIAGNÓSTICO DE DOENÇA CELÍACA**

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Belo Horizonte
2006

MAGDA BAHIA

**AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DOS
MARCADORES SOROLÓGICOS PARA
DIAGNÓSTICO DE DOENÇA CELÍACA**

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência da Saúde – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Penna

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Belo Horizonte
2006

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora: Prof^a. Ana Lúcia de Almeida Gazzola

Vice-Reitor: Prof. Marcos Borato Viana

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Jaime Arturo Ramirez

Faculdade de Medicina – Ciências da Saúde

Diretor: Prof. Geraldo Brasileiro Filho

Vice-Diretor: Prof. Joel Alves Lamounier

Chefe do Departamento de Pediatria: Prof^a. Cleonice de Carvalho Coelho Mota

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Francisco José Penna

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Prof. Francisco José Penna (Coordenador)

Prof. Joel Alves Lamounier (Subcoordenador)

Prof. Eduardo Araújo Oliveira

Prof^a. Regina Lunardi Rocha

Prof^a. Ivani Novato Silva

Prof. Marco Antônio Duarte

Prof. Marcos Borato Viana

Prof. Roberto Assis Ferreira

Representante discente: Miguir Terezinha Vieccelli Donoso

Para meus pais.

Para Ana, minha filha querida,
que continua me sorrindo todas as manhãs.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos deveriam iniciar todos os trabalhos. Não os realizaríamos sem a ajuda de diversas pessoas que participam em cada etapa de sua execução. São muitos os agradecimentos. Gostaria de citar aqui todos os nomes de todas as pessoas que participaram da elaboração deste. Sabendo ser isto de todo impossível, vou agradecer muitas pessoas no nome de algumas.

Ao Professor Francisco José Penna, que tem me orientado desde 1982, pela capacidade de ensinar e de estimular as pessoas a crescerem junto com ele.

A Ricardo Pimenta e Rocksane Carvalho, que me acolheram na Pediatria, durante o Internato. Obrigada por continuarem ao meu lado.

A Eugênio Goulart, pela ajuda paciente com a análise estatística.

A Ivan Sampaio, que me indicou o caminho da análise multivariada dos componentes principais, pela disponibilidade e pelo conto “Mãe Borboleta”.

Aos meus companheiros do Laboratório Central: Maristela, Rosângela, Vânia, Marcelo Lima, Marcelo Luigi, Liliane, Rômulo, Luciene, Denise, Fátima, Marlene, Marcos, Edna, Graça, Antônia, Myriam, Raquel, Guilherme, Raimundo, Hérica, Érica, Márcia, Wellington e Marcos e a todos os funcionários que me apoiaram, incentivaram e participaram da elaboração deste trabalho nos dois últimos anos.

Aos meus colegas do Grupo de Gastroenterologia Pediátrica e do Departamento de Pediatria, pelo apoio, incentivo e encaminhamento de pacientes.

Aos meus colegas do Departamento de Propedêutica, que sempre colaboraram para meu crescimento profissional.

Aos meus alunos de Iniciação Científica, que ajudaram com o banco de dados, com os exames laboratoriais, no SAME, de forma amiga e eficiente: Laura Filgueiras, Juarez Mundin, Luciana Milanez, Mariana França, Paulo Figueiredo e Marcelo Marino.

A minha irmã, Maria Auxiliadora, e a Naftale, sem cuja ajuda não teria feito o Curso de Medicina. Meu agradecimento e afeto eternos.

Aos meus irmãos, Miltinho e Ana Lúcia, meus cunhados Paulo e Janaína e meus sobrinhos queridos: Daniel, Cristina, Guilherme e quem mais chegar, Caio e Igor, pelo carinho e apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

À minha amiga Anfrisina Sales, pelo carinho, apoio, atenção, compreensão e afeto, o meu carinho, o meu ombro e o meu afeto.

A Heloísa Amaral e Francy Mascarenhas, que tanto me apoiaram durante o curso.

À Ana Lúcia Teles Rabello, pelo apoio durante anos, no Centro de Pesquisa René Rachou, e pelos velhos tempos.

A Urquiza Paulino, Lumena Mendonça, Beatriz Bedram, Marco Rolla, Eduardo Mascarenhas, Dora Leite, Mercedes Leite, Pedro Pezzuti, Márcia Parizzi, José Augusto Castanheira, Rosilu Barbosa, Beatriz Furtado, Sérgio Gontijo, amigos já antigos que me fazem acreditar na humanidade.

À Sandra, que manteve meu dia-a-dia em ordem durante este trabalho.

Ao Raymundo, meu companheiro há tantos anos.

Para onde vão os trens, meu pai?
Para Mahal, Tami, para Camiri, espaços
no mapa, e depois o pai ria: também
pra lugar algum, meu filho, tu podes
ir e ainda que se mova o trem,
tu não te moves de ti.

RESUMO

A doença celíaca (DC) é uma enteropatia caracterizada pela intolerância permanente ao glúten, fração protéica encontrada no trigo, cevada, centeio e aveia e desencadeada por um mecanismo auto-imune nos indivíduos que apresentam predisposição genética. A doença está relacionada à presença do HLA-DQ, codificada pelos genes DQA1 e DQB do cromossoma 6. O objetivo deste estudo foi determinar a acurácia dos marcadores sorológicos como triagem para biópsia jejunal, avaliar a associação dos marcadores sorológicos com a doença celíaca e a correlação entre a determinação dos anticorpos antiendomísio utilizando-se cordão umbilical humano e esôfago de macaco como substrato, em pacientes do nosso meio. Foram pesquisados os anticorpos imunoglobulina A - IgA (AGAA) e imunoglobulina G - IgG (AGAG) antigliadina, anticorpos IgA antitransglutaminase tecidual (ATGT) e antiendomísio, utilizando-se como substrato cordão umbilical humano (AAECO) e esôfago de macaco (AAEEM) em soros de 400 pacientes divididos em três grupos: grupo 1 - 37 pacientes com doença celíaca não tratada; grupo 2 - 208 pacientes sem queixas gastrointestinais; grupo 3 - 155 pacientes com outras enteropatias. Os anticorpos antigliadina e antitransglutaminase foram determinados pela técnica de ensaio imunoenzimático (ELISA) e os anticorpos antiendomísio pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI). A sensibilidade e especificidade para AGAA foram de 81,1 e 95,2%; para AGAG 89,2 e 95,2%; para ATGT 83,9 e 96,8%; para AAECO 87,9 e 100,0% e para AAEEM 88,6 e 100,0%, respectivamente. Sob a abordagem multivariada, análise dos componentes principais, as correlações entre doença celíaca e os marcadores sorológicos AGAA, AGAG, ATGT, AAECO e AAEEM mostraram-se adequadas, com inércia de 94%, havendo grande proximidade entre AAE e doença celíaca, o que sugere que AAE é o melhor marcador sorológico para diagnóstico da enteropatia, seguidos de ATGT, AGAA e AGAG. Concluiu-se que os melhores marcadores sorológicos para diagnóstico de doença celíaca foram os anticorpos antiendomísio. Devido a associação da doença celíaca com deficiência de IgA secretória, à semelhança da sensibilidade e especificidade entre ATGT e AGA e sua correlação na análise multivariada, pode-se utilizar a determinação dos anticorpos IgA e IgG antigliadina seguidos de anticorpos antiendomísio em cordão umbilical como triagem para biópsia jejunal no diagnóstico de doença celíaca, nos pacientes de países subdesenvolvidos, desde que o ponto de corte para o resultado desses exames seja estabelecido previamente. A determinação dos anticorpos antiendomísio, utilizando-se como substrato o cordão umbilical humano, substitui de forma eficaz o substrato de esôfago de macaco, com menos custo e maior benefício ecológico.

Palavras-chave: doença celíaca. Anticorpos antigliadina. Anticorpos antiendomísio. Anticorpos antitransglutaminase tecidual. Cordão umbilical humano. Esôfago de macaco.

ABSTRACT

Celiac disease (CD) is the permanent intolerance to gluten, a proteic fraction found in wheat, barley, rye, and oats, and can be controlled with a gluten-free diet. It is triggered by a self-immune mechanism in individuals with genetic predisposition and is related to the presence of HLA-DQ, codified by genes DQA1 and DQB of chromosome six. The aims of the present study were: to determine the efficacy of serological markers - antibodies class IgG and IgA antigliadin (AGAA, AGAG), antibodies class IgA antitransglutaminase (ATGT), antibodies class IgA antiendomysial using as substrate human umbilical cord (AAECO) and monkey esophagus (AAEEM) - in the diagnosis of celiac disease through sensitivity, specificity; to establish a relation between them through the analysis of the main components; to compare the efficacy of determining antiendomysial antibodies through indirect immunofluorescence using as substrate monkey esophagus and umbilical cord; and to determine the most adequate sequence of exams for screening patients for jejunal biopsy in the diagnosis of celiac disease. We studied 400 serum samples from: patients with celiac disease (n=38), patients without gastrointestinal symptoms (n=208) and patients with gastrointestinal symptoms, (n=155). Antigliadin antibodies and antitransglutaminase antibodies were determined by ELISA and antibodies class IgA antiendomysial were analyzed by indirect immunofluorescence microscopy. Sensitivity and specificity were 81,1% and 95,2 % for AGAA, 89,2% and 95,2%, for AGAG, 83,9% and 96,8% for ATGT, 87,9% and 100,0% for AAECO and 88,6% and 100,0% for AAEEM, respectively. Through statistical analysis of the main components, we can simultaneously assess several variables and their correlation. In the present study, celiac disease and serological markers present a good correlation, with 94% of inertia. Multivariate analysis showed strong association between AAECO and celiac disease a far the best correlate with the enteropathy, followed by TGT, AGAA, and AGAG. Due association of celiac disease with IgA deficiency, similarity between sensitivity and specificity of AGAA and TGT and their correlations in the multivariate analysis, AGAA and AGAG can be used for the screening, followed by AAECO, provided that a cut-off point for the results of these exams are established in developing countries. Results of determining antiendomysial antibodies on the umbilical cord overlapped with those on monkey esophagus. Therefore, umbilical cord should be used as substrate in order to avoid using material from species under risk of extinction.

Keys word: celiac disease. Antigliadin antibodies. Antiendomysium antibodies. Antitransglutaminase antibodies . Human umbilical cord. Monkey esophagus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

Figura 1 – Biópsia jejunal com padrão histológico considerado dentro da normalidade.....	50
Figura 2 – Biópsia jejunal considerada padrão celíaco, hipotrofia grau IV.....	51
Figura 3 – Imunofluorescência negativa (grande aumento).....	66
Figura 4 – Imunofluorescência positiva (grande aumento).....	67

Gráficos

Gráfico 1 – Comparação das densidades ópticas (DO) dos anticorpos da classe IgA antigliadina dos pacientes com e sem doença celíaca.....	62
Gráfico 2 – Comparação das leituras das densidades ópticas (DO) dos anticorpos da classe IgG antigliadina dos pacientes com e sem doença celíaca.....	62
Gráfico 3 – Comparação das leituras das densidades ópticas (DO) dos anticorpos da classe IgA antitransglutaminase tecidual dos pacientes com e sem doença celíaca.....	63
Gráfico 4 – Resultados positivos e negativos da determinação dos anticorpos antiendomísio em cordão umbilical para os pacientes com e sem doença celíaca.....	67
Gráfico 5 – Resultados positivos e negativos da determinação dos anticorpos antiendomísio em esôfago de macaco para os pacientes com e sem doença celíaca.....	67
Gráfico 6 – Variáveis anticorpos IgA antigliadina (AGAA), anticorpos IgG antigliadina (AGAG), anticorpos IgA antitransglutaminase tecidual (ATGT) e anticorpos IgA antiendomísio em cordão umbilical e esôfago de macaco (AAE) e doença celíaca (DC) nos eixos fatoriais 2 e 3 para o universo dos 283 pacientes com diagnóstico de doença celíaca, sem queixas gastrointestinais e com outras enteropatias, com e sem biópsia jejunal.....	76

Gráfico 7 – Variáveis anticorpos IgA antigliadina (AGAA), anticorpos IgG antigliadina (AGAG), anticorpos IgA antitransglutaminase tecidual (ATGT) e anticorpos IgA antiendomísio em cordão umbilical e esôfago de macaco (AAE) e doença celíaca (DC) nos eixos fatoriais 2 e 3 para o universo de 49 pacientes com diagnóstico de doença celíaca (biópsia hipotrofia grau IV) e sem queixas gastrointestinais (biópsia considerada normal)..... 78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição dos pacientes com doença celíaca, do grupo-controle, com outras enteropatias e do grupo sem queixas gastrointestinais, segundo sexo, idade, peso e altura.....	55
Tabela 2 – Comparação das leituras das densidades ópticas da determinação dos anticorpos IgA e IgG antigliadina e IgA antitransglutaminase dos grupos com e sem doença celíaca.....	61
Tabela 3 – Resultado das determinações dos anticorpos classes IgG e IgA antigliadina, classe IgA antitransglutaminase, classe IgA anti-endomísio em cordão umbilical e esôfago de macaco, nos pacientes com biópsia jejunal, com doença celíaca (grupo 1), sem queixas gastrointestinais (grupo 2) e com outras enteropatias (grupo 3).....	69
Tabela 4 – Resultados de sensibilidades, especificidades e valores preditivos da determinação dos anticorpos classes IgA e IgG antigliadina, IgA antitransglutaminase (ATGT), IgA antiendomísio em cordão umbilical (AAECO) e esôfago de macaco (AAEEM) dos pacientes com doença celíaca e sem queixas gastrointestinais com biópsia jejunal.....	70
Tabela 5 – Resultado das determinações dos anticorpos classes IgG e IgA antigliadina, classe IgA antitransglutaminase, classe IgA antiendomísio em cordão umbilical e esôfago de macaco, nos pacientes com e sem biópsia jejunal, com doença celíaca, sem queixas gastrointestinais e com outras enteropatias.....	71
Tabela 6 – Resultados de sensibilidades, especificidades e valores preditivos da determinação dos anticorpos classes IgA e IgG antigliadina, IgA antitransglutaminase (ATGT), IgA antiendomísio em cordão umbilical (AAECO) e esôfago de macaco (AAEEM) dos pacientes com e sem biópsia jejunal, com doença celíaca e sem queixas gastrointestinais.....	71
Tabela 7 – Comparação entre as sensibilidades, especificidades, valores preditivos dos marcadores sorológicos entre os pacientes com biópsia	

e aqueles com e sem biópsia jejunal.....	72
Tabela 8 – Correlação entre os marcadores sorológicos AGAA, AGAG, ATGT, AAECO, AAEEM e doença celíaca no grupo dos 283 pacientes, com e sem biópsia jejunal	74
Tabela 9 – Correlação entre os marcadores sorológicos AGAA, AGAG, ATGT, AAECO, AAEEM e doença celíaca no grupo de 49 pacientes com e sem doença celíaca, com biópsia jejunal.....	74
Tabela 10 – Correlação entre doença celíaca, AGAA, AGAG, ATGT, AAECO e AAEEM nos eixos 1, 2 e 3 para o grupo dos 283 pacientes....	75
Tabela 11 – Correlação entre doença celíaca, AGAA, AGAG, ATGT, AAECO e AAEEM nos eixos 1, 2 e 3 para o grupo dos 49 pacientes	77
Tabela 12 – Avaliação da associação dos marcadores sorológicos no universo de 283 pacientes com diagnóstico histológico de doença celíaca e nos pacientes com e sem queixas gastrointestinais.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAE	Anticorpo IgA antiendomísio
AAECO	Anticorpo IgA antiendomísio em cordão umbilical humano
AAEEM	Anticorpo IgA antiendomísio em esôfago de macaco
ABTS	<i>2,2 azino-bis ethylbez-thiazoline-6-sulfonic acid</i>
AGAA	Anticorpo IgA antigliadina
AGAG	Anticorpo IgG antigliadina
ATGT	Anticorpo antitransglutaminase tecidual
DC	Doença celíaca
DO	Densidade óptica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
Espec	Especificidade
HCl	Ácido clorídrico
HLA	Antígeno de histocompatibilidade humana
IC	Intervalo de confiança
IFI	Imunofluorescência indireta
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
MrsPAH	Hemaglutinação passiva de antiglobulina em fase sólida reversa
PAS	Ácido periódico Schiff
PBS	Tampão fosfato salino
SDS	Sulfato duodocil sódico
Sens	Sensibilidade
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	23
2.1 Marcadores sorológicos da doença celíaca.....	23
2.1.1 Anticorpos antigliadina.....	25
2.1.2 Anticorpos antiendomísio utilizando esôfago de macaco como substrato.....	30
2.1.3 A Anticorpos antiendomísio utilizando cordão umbilical como substrato.....	36
2.1.4 Anticorpos antitransglutaminase tecidual.....	37
3 OBJETIVOS.....	42
3.1 Objetivo geral.....	42
3.2 Objetivos específicos.....	42
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	43
4.1 Pacientes.....	43
4.2 Métodos.....	42
4.2.1 Marcadores sorológicos.....	42
4.2.1.1 Determinação dos anticorpos classes IgA e IgG antigliadina.....	42
4.2.1.2 Determinação dos anticorpos classe IgA antitransglutaminase tecidual.....	45
4.2.1.3 Determinação dos anticorpos antiendomísio utilizando cordão umbilical como substrato.....	46
4.2.1.4 Determinação dos anticorpos antiendomísio utilizando esôfago de macaco como substrato.....	47
4.2.1.5 Determinação de IgA sérica.....	48
4.2.2 Biópsia jejunal.....	48
4.3 Análise estatística.....	51

4.4 Aspectos éticos.....	52
5 RESULTADOS.....	53
5.1 Pacientes.....	53
5.1.1 Grupo 1 – Pacientes com doença celíaca.....	53
5.1.2 Grupo 2 – Pacientes sem queixas gastrointestinais.....	53
5.1.3 Grupo 3 – Pacientes com outras enteropatias.....	54
5.2 Marcadores sorológicos.....	56
5.2.1 Anticorpos antigliadina.....	56
5.2.2 Anticorpos antitransglutaminase tecidual.....	58
5.2.3 Anticorpos antiendomísio em cordão umbilical.....	64
5.2.4 Anticorpos antiendomísio em esôfago de macaco.....	65
6 DISCUSSÃO.....	85
7 CONCLUSÕES.....	97
8 PROPOSIÇÕES.....	98
REFERÊNCIAS.....	99
ANEXO.....	110

1 INTRODUÇÃO

Doença celíaca (DC) é uma enteropatia caracterizada pela intolerância permanente ao glúten, fração protéica encontrada no trigo, aveia, cevada e centeio. É desencadeada por mecanismo auto-imune nos indivíduos que apresentam predisposição genética. As manifestações clínicas, quando presentes e as alterações histológicas regridem com a retirada do glúten da dieta. A doença está relacionada à presença do antígeno de histocompatibilidade humana (HLA) - DQ, codificada pelos genes DQA1 e DQB do cromossoma 6. Mais de 90% dos pacientes com doença celíaca possuem a combinação dos alelos HLA-DQA1*0501 e HLA-DQB1*02, na configuração cis ou trans, que codificam o heterodímero DQ2. Os pacientes DQ2 negativos possuem HLA DQA1*03 e DQB1*0302, que codificam o heterodímero DQ8 e são responsáveis pela apresentação do antígeno e pelo posterior desencadeamento do processo patogênico da doença (MOLBERG; MCDAM; SOLLID, 2000; PAPADOPOULOS; WIJMENGA; KONING 2001; SCHUPPAN; HAHN, 2002).

A DC foi descrita desde o século II da Era Cristã, mas sua correlação com a ingestão de glúten só foi definida em 1945, através dos estudos de Dicke, que observou melhora dos pacientes durante o período da guerra, quando houve falta de trigo na Holanda, e piora no pós-guerra, quando o cereal voltou a ser usado nos alimentos (*apud* VAN BERGE-HENEGOUWEN; MULDER, 1993).

O diagnóstico da doença evoluiu a partir da sua descrição feita por Gee em 1888 (TOWNLEY; ANDERSON, 1967), de essencialmente clínico – realizado através da observação do aspecto do paciente, das características das fezes, da idade do aparecimento dos sintomas e da resposta ao tratamento com dieta isenta de glúten – para histológico. Shiner (1957 *apud* TOWNLER; ANDERSON, 1967) descreveu as alterações histológicas das biópsias de intestino delgado dos pacientes com DC. A partir de então, a histologia jejunal é considerada indispensável para a confirmação da doença.

Desde a década de 60 têm-se realizado estudos na busca de marcadores sorológicos que possibilitem o diagnóstico da doença sem que seja necessária a realização de biópsia, considerada desconfortável para o paciente (TAYLOR *et al.*, 1961). Em 1989, Guandalini *et al.* questionaram o critério clássico do diagnóstico de DC, que se baseava no estudo histológico de pelo menos três biópsias de intestino delgado: a primeira ao diagnóstico, com o paciente em dieta contendo glúten e com a mucosa intestinal apresentando padrão histológico compatível com a doença. A segunda, com o paciente em dieta isenta de glúten por pelo menos dois anos, com mucosa intestinal dentro do padrão de normalidade histológica. A terceira, após desencadeamento, com o paciente ingerindo glúten durante três meses ou tão logo apresentasse sintomas, tendo a mucosa intestinal, nesse momento, que apresentar alteração do padrão histológico, com piora em relação à segunda biópsia. Desta forma, há demora excessiva para definir-se o diagnóstico (em torno de dois anos e três meses), não se levando em consideração a variabilidade da apresentação da doença, cujas

alterações histológicas podem, após o desencadeamento, levar até 10 anos para serem observadas (WALKER-SMITH, 1980).

Guandalini *et al.* (1989) consideraram, também, que depois de dois anos de idade são poucas as doenças que levam à atrofia vilositária com alterações semelhantes às que ocorrem na doença celíaca e que a exposição dos pacientes ao glúten na fase de desencadeamento poderia lhes ser danosa. Eles argumentaram, ainda, que as altas sensibilidade e especificidade da determinação dos anticorpos antigliadina (AGA), 90,5 e 99,4% para IgA e 98,0 e 97,2% para imunoglobulina G (IgG), respectivamente, seriam suficientes para definir o diagnóstico da doença, desde que, depois da retirada do glúten, os pacientes com anticorpos positivos apresentassem resposta clínica e negatividade dos anticorpos.

Em 1990, foi definido um novo critério para o diagnóstico da doença, baseado ainda no padrão histológico, mas levando também em consideração a sorologia, especialmente no que tange à confirmação do diagnóstico. Seriam suficientes para selar o diagnóstico: biópsia de intestino delgado com padrão celíaco, positividade de marcadores sorológicos, resposta clínica à retirada do glúten da dieta e negatividade dos anticorpos após dieta isenta de glúten. Walker-Smith *et al.* (1990) consideraram que a adoção desse critério pode ser falha para crianças com menos de dois anos de idade, que podem apresentar alterações histológicas em biópsia intestinal, semelhantes às que ocorrem na doença celíaca, secundariamente a outras patologias, e para aquelas de países subdesenvolvidos, que podem apresentar exames sorológicos falsos-positivos.

Na tentativa de se realizar o diagnóstico sorológico da doença, diversos marcadores foram pesquisados. Os anticorpos anti-reticulina foram os primeiros a serem descritos e apresentaram baixa sensibilidade e alta especificidade (BROWN *et al.*, 1973; ORDEIG *et al.*, 1983; GHEDIRA *et al.*, 2001). Posteriormente, foram descritos os anticorpos antigliadina, com sensibilidade variando de 36,0 a 100,0% e especificidade de 84,0 a 100,0% para IgA e sensibilidade de 82,0 a 100,0% e especificidade de 42,0 a 86,0% para IgG, segundo diversos autores (LANE; CLARK; ZONE, 1983; O'FARRELLY; KELLY; FEIGHERY, 1984; RIBES *et al.*, 1986; VOLTA *et al.*, 1986; CALABUIG *et al.*, 1989). Em 1983, foi relatada por Chorzelski *et al.* a presença de anticorpos antiendomísio em esôfago de macaco (AAEEM) nos pacientes com dermatite herpetiforme e doença celíaca. Este foi considerado o melhor marcador sorológico para diagnóstico da doença celíaca, com sensibilidade e especificidade variando de 90,0 a 100,0%, segundo diversos autores (KAPUSCINSKA *et al.*, 1987; CALABUIG *et al.*, 1989; BÜRGIN-WOLFF *et al.*, 1991; ROSTAMI *et al.*, 1999). Dieterich *et al.* (1997) identificaram a transglutaminase tecidual como o auto-antígeno do endomísio na doença celíaca e, em 1998, foi descrita a detecção dos anticorpos IgA antitransglutaminase tecidual (ATGT), pela técnica ELISA, que apresentou sensibilidade e especificidade semelhantes aos anticorpos anti-endomísio (DIETERICH *et al.*, 1998).

Os avanços laboratoriais na tentativa de estabelecer-se o diagnóstico sorológico da doença são inegáveis. Entretanto, até o momento, não foi descrito qualquer marcador sorológico que ofereça segurança para que o diagnóstico seja realizado

com base apenas na sua determinação, sem a realização concomitante de, pelo menos, uma biópsia intestinal.

As dificuldades relacionadas ao diagnóstico dessa enteropatia no nosso meio recaem, principalmente, na baixa frequência de suspeição clínica e nas limitações das técnicas de diagnóstico. A realização de biópsia intestinal requer pessoal treinado e cápsulas apropriadas. Os fragmentos de mucosa intestinal obtidos por endoscopia digestiva alta são, em geral, da segunda porção do duodeno. O fragmento retirado geralmente é pequeno e não se consegue orientação adequada na preparação dos cortes histológicos, o que dificulta sua análise. Além disto, a presença das glândulas de Brünner, abundantes nessa região, também interferem na avaliação da arquitetura vilositária e das criptas. Por outro lado, há a possibilidade de o endoscopista avaliar o local a ser biopsiado, podendo realizá-la onde haja alterações macroscópicas. Em revisão realizada pela Associação Americana de Clínica Gastroenterológica, em 2001 (CICLITIRA, 2001), considerou-se que a melhor forma de se obter fragmento para o estudo histológico de biópsia intestinal é a técnica de cápsula do tipo guilhotina.

São poucos os trabalhos realizados no Brasil que abordam os vários aspectos da doença celíaca, sejam eles epidemiológicos, clínicos ou laboratoriais. Há falta de padronização da técnica nos laboratórios de rotina e indefinição da acurácia dos testes sorológicos como triagem dos pacientes a serem submetidos à biópsia intestinal no Brasil. Essa preocupação manifestada pela Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição em 1990 e a grande frequência de

indicação de biópsia intestinal para a definição diagnóstica de doença celíaca motivaram o presente trabalho.

REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Marcadores sorológicos da doença celíaca

Tem se tornado evidente que a doença celíaca ocorre mais freqüentemente do que se pensava. A sua apresentação clínica considerada característica, com os pacientes exibindo diarreia crônica, distensão abdominal, eversão de cicatriz umbilical, atrofia da musculatura glútea, irritabilidade, cabelos secos e quebradiços, vem sendo suplantada pelos casos em que o paciente não apresenta qualquer queixa gastrointestinal. A doença pode se apresentar apenas como atraso do crescimento, anemia ferropriva (SCHMITZ *et al.*, 1994) ou queixas inespecíficas, discreta distensão abdominal ou flatulência, além da sua associação com outras doenças como diabetes *mellitus* insulino-dependente (SIGURS *et al.*, 1993, TANURE *et al.*, 2006), epilepsia (CALVANI *et al.*, 2001), trissomia do cromossoma 21 (CARLSSON *et al.*, 1998), enxaqueca (GABRIELLI *et al.*, 2003), baixa estatura (ROSEMBACH *et al.*, 1986; STENHAMMAR *et al.*, 1986; OLIVEIRA *et al.*, 1998), hepatite crônica (MAGGIORE *et al.*, 1986; LEONARDI *et al.*, 1990; MORILLAS *et al.*, 1991), lúpus eritematoso sistêmico (VARKEL *et al.*, 1989; LINDGREN; SJÖBERG; ERIKSSON, 1994), deficiência de IgA (COLLIN *et al.*, 1992), entre outros.

Os familiares dos pacientes acometidos são considerados de risco para enteropatia pelo caráter hereditário da doença. Rostami *et al.* (2000) encontraram incidência de 21,0% em familiares de primeiro grau, sendo que um número

significativo pode ter sido perdido pelo fato de a histologia da mucosa intestinal na DC não tratada nem sempre apresentar atrofia vilositária e pela baixa positividade dos marcadores sorológicos nos pacientes que apresentaram apenas hipotrofia parcial de vilosidades. Os autores sugeriram que uma combinação de parâmetros clínicos e laboratoriais deva ser utilizada em todos os parentes de primeiro grau para que se possa descartar a possibilidade da doença.

Os quadros assintomáticos ou oligossintomáticos fazem com que o diagnóstico da doença seja tardio. Collin *et al.* (1990) relataram 18 casos diagnosticados por triagem sorológica em pacientes com doenças articulares, alergias, doenças pulmonares ou diabetes *mellitus* insulino-dependente, sem sintomas gastrointestinais ou apenas sintomas leves. A faixa etária desses pacientes variou de 24 a 70 anos, configurando-se o diagnóstico tardio da doença.

O diagnóstico precoce da doença é fundamental, já que o início do tratamento adequado diminui o risco de possíveis complicações que podem ocorrer naquelas não tratadas, como linfoma intestinal, osteoporose, infertilidade, baixa estatura, entre outras. As possíveis complicações independem da forma de apresentação da doença, seja ela sintomática, oligossintomática ou assintomática (HOLMES *et al.*, 1989; LOGAN, 1996; MARSH, 1997). Os marcadores sorológicos têm tido importante papel no reconhecimento desses casos.

2.1.1 Anticorpos antigliadina

Durante décadas, vários métodos foram testados para a determinação de anticorpos antigliadina, cujos resultados apresentavam grande variação. Os métodos utilizados eram artesanais e com interferências analíticas nas diversas fases de sua execução (KATZ; KANTOR; HERSKOVIC, 1968; CORNELL, 1974; STERN; FISCHER; GRÜTTNER, 1979; KIEFFER *et al.*, 1982; TONUTTI *et al.*, 2005).

Em 1976, Bürgin-Wolff *et al.* descreveram um teste para a detecção de anticorpos antigliadina utilizando a técnica de imunofluorescência e consideraram, na ocasião, que poderia ser empregado para a triagem da doença celíaca, com sensibilidade de 83,0% e especificidade de 96,0%. Nesse trabalho foram detectados anticorpos das classes IgG, IgA e imunoglobulina M (IgM).

Em 1977, foi descrita por Kávai *et al.* a presença de anticorpos classes IgA, IgG e imunoglobulina E (IgE) antigliadina em soro de pacientes com doença celíaca. O trabalho visava avaliar quais classes de anticorpos seriam mais adequadas para o diagnóstico e se os da classe IgA eram freqüentes na doença. A pesquisa dos anticorpos foi realizada pela técnica de hemaglutinação. Os autores concluíram que o tipo de anticorpos produzido era da classe IgG, sendo as imunoglobulinas das classes IgE e IgA consideradas sem importância na DC.

Stern; Fischer; Grüttner (1979) testaram as técnicas de imunofluorescência indireta, hemaglutinação passiva, imunodifusão radial e eletroforese (estas

associadas à imunodifusão), cujas sensibilidades foram de 72,0, 30,0 e 6,0% e especificidade de 20,0, 2,0 e 0,0%, respectivamente. Eles consideraram que a complexidade dos métodos e a diversidade dos antígenos utilizados impossibilitavam a comparação entre os diferentes resultados obtidos pelos diversos pesquisadores.

Signer *et al.* (1979) utilizaram a técnica de imunofluorescência para a determinação de anticorpos da classe IgG antigliadina, tendo encontrado sensibilidade de 100,0%.

Huff; Weston; Zirker (1979) descreveram a detecção de anticorpos antigliadina pela técnica ELISA, que é a empregada até hoje.

Unsworth *et al.* (1981) estudaram a presença de anticorpos IgA antigliadina e os consideraram específicos para a doença celíaca, ao contrário dos anticorpos da classe IgG, que foram encontrados em diversas outras doenças. Eles utilizaram as técnicas de imunofluorescência e teste de hemaglutinação passiva de antiglobulina em fase sólida reversa (MrsPAH).

Kieffer *et al.* (1982) utilizaram a técnica ELISA comparando-a à de MrsPAH para a determinação dos anticorpos antigliadina, encontrando igual sensibilidade para ambas. Eles consideraram, entretanto, a técnica de MrsPAH mais artesanal, não oferecendo a possibilidade de se realizarem numerosos exames de uma só vez.

Ciclitira; Ellis; Evans (1983) utilizaram radioimunoensaio, mas essa técnica caiu em desuso.

Outros autores utilizaram ainda outros métodos, como Bürgin-Wolf *et al.* (1983), que testaram imunofluorescência, cujos resultados apresentaram boa sensibilidade e especificidade, sem, entretanto, ser incorporada na rotina laboratorial.

Desde então, a técnica consagrada para a determinação dos anticorpos anti gliadina é a de ELISA. Kilander *et al.* (1983), utilizando dig-ELISA, avaliaram pacientes com doença celíaca, com suspeita dessa doença e com outras enteropatias, como doença de Crohn, síndrome do intestino irritável, encontrando sensibilidade para IgA e IgG de 93% e especificidade de 95%.

A técnica ELISA permite a execução de vários testes simultaneamente, a leitura não sofre influência do fator humano, não utiliza material radioativo e tem menor custo (LINDBERG *et al.*, 1985; TONUTTI *et al.*, 2005).

Stenhammar *et al.* (1984) utilizaram a técnica dig-ELISA, encontrando sensibilidade de 100,0% e especificidade de 97,0%. Volta *et al.* (1985) adotaram a micro-ELISA tal qual é empregada até hoje, tendo encontrado sensibilidade de 79,0% para IgA e de 100,0% para IgG e especificidade de 100,0% e 89,5% para IgA e IgG, respectivamente.

A partir da descrição dos anticorpos antiendomísio (CHORZELSKI *et al.*, 1983), passou-se a considerá-los os melhores marcadores sorológicos para o diagnóstico de doença celíaca e a questionar a sensibilidade e a especificidade dos anticorpos antigliadina, que começaram a ser relatados na literatura com sensibilidade e especificidade abaixo das descritas anteriormente. Entretanto, alguns autores ainda consideram sua determinação, especialmente anticorpos da classe IgA, como melhores marcadores que os da classe IgA antiendomísio (CALABUIG *et al.*, 1989; KUMAR *et al.*, 1989; CALABUIG *et al.*, 1990; MCMILLAN *et al.*, 1991; BODÉ *et al.*, 1993; CATALDO *et al.*, 1993; LINDQUIST *et al.*, 1994).

Em 1995, alguns autores observaram que a sensibilidade dos anticorpos antigliadina era menor nos pacientes com mais de dois anos e que os anticorpos antiendomísio eram menos sensíveis nas crianças com menos de dois anos de idade (CATALDO *et al.*, 1995; GRODZINSKI *et al.*, 1995; GHEDIRA *et al.*, 2001). Contudo, nenhum dos trabalhos referidos explica tais resultados.

No Brasil, Medeiros *et al.* (1994) publicaram trabalho em que os anticorpos antigliadina apresentaram sensibilidade e especificidade de 90,4 e 87% para IgG e 64,2 e 92,1% para IgA, respectivamente.

No Serviço de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG, foram encontradas sensibilidade de 95,5 e 90,9% e especificidade de 95,7 e 97,8% para IgA e IgG, respectivamente (BAHIA *et al.*, 2001). A partir de então, passou-se a utilizar a determinação dos anticorpos antigliadina como triagem para biópsia intestinal.

Em 1996, Grodzinsky propôs a utilização de anticorpos IgG e IgA antigliadina seguidos da determinação de anticorpos IgA antiendomísio como triagem para a biópsia intestinal. No mesmo ano, Dubel *et al.* realizaram estudo comparativo entre marcadores sorológicos de intolerância permanente ao glúten e consideraram que os testes de detecção de anticorpos antigliadina não permitem, por razões técnicas, homogeneização dos resultados, limitando, assim, a interpretação e a comparação, entre os diferentes laboratórios, dos resultados obtidos.

Em diversos países, a determinação dos anticorpos antigliadina foi considerada adequada como teste de triagem para a biópsia intestinal até 1997 (STENHAMMAR *et al.*, 1984; VOLTA *et al.*, 1985; STAHLBERG; SAVILAHTI; VIANDER, 1986; TUCKER *et al.*, 1988; KHOSHOO *et al.*, 1989; CALABUIG *et al.*, 1990; RAUTONEN, J.; RAUTONEN, N., SAVILAHTI, 1991; GRODZINSKI *et al.*, 1995; UIBO *et al.*, 1996; CHARTRAND *et al.*, 1997). Desde 1992, entretanto, já havia questionamentos sobre a acurácia desse marcador, uma vez que a determinação dos anticorpos antiendomísio apresentava melhores resultados, com sensibilidade e especificidade de 100% (FERREIRA *et al.*, 1992; CATALDO *et al.*, 1993; VOGELSANG *et al.*, 1995).

Alguns autores passaram a adotar a determinação de anticorpos antigliadina seguida da determinação de anticorpos antiendomísio como triagem para biópsia intestinal (MASCART-LEMONE; LAMBRECHTS, 1995). Lepers *et al.* (2003) preconizaram a determinação dos anticorpos antigliadina realizada pela técnica ELISA como a mais conveniente para estudos epidemiológicos, com resultados

considerados adequados para a triagem dos pacientes que devem ser submetidos à biópsia intestinal.

Em estudo epidemiológico, Fasano *et al.* (2003) avaliaram a prevalência da doença celíaca nos grupos de risco nos Estados Unidos, utilizando a determinação de anticorpos antigliadina e antiendomísio como triagem para a realização de determinação de transglutaminase tecidual e tipagem de HLA.

Kumar *et al.* (2002) também sugeriram a realização de anticorpos antigliadina para evitar os resultados falsos-negativos nos pacientes com deficiência de IgA, pois a maioria deles não apresenta sintomas clínicos.

Depois da identificação da transglutaminase por Dieterich *et al.* (1997) como o auto-antígeno da DC, a literatura internacional tem se mostrado tendente a indicar apenas os anticorpos antitransglutaminase tecidual para triagem de biópsia intestinal no diagnóstico da doença celíaca. A determinação dos anticorpos da classe IgG antigliadina permanece importante para pacientes com deficiência de IgA.

2.1.2 Anticorpos antiendomísio utilizando esôfago de macaco como substrato

A presença de anticorpos antitecido conjuntivo vem sendo descrita em pacientes com doença celíaca desde a década de 70. Williamson *et al.* (1976) descreveram a presença de anticorpos da classe IgG direcionados contra o endotélio da

membrana basal, contra o epitélio da membrana basal, contra o tecido conjuntivo perivascular e contra os glomérulos de rim, estômago e glândula salivar de ratos.

A associação de anticorpos da classe IgA antiendomísio e doença celíaca foi descrita por Chorzelski *et al.* (1983). Até hoje os anticorpos antiendomísio são considerados os melhores marcadores para diagnóstico dessa enteropatia.

O endomísio é formado por fibrilas de elastina e colágeno e é o tecido conjuntivo que reveste cada célula muscular individualmente. O conjunto dessas células forma fascículos que são cobertos por tecido conjuntivo semelhante, chamados perimísio. Os fascículos unem-se para formar o músculo propriamente dito. A cobertura mais externa, também formada por tecido conjuntivo semelhante, recebe o nome de epimísio (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999)

A partir dos estudos de Chorzelski *et al.* (1983), inúmeras pesquisas foram realizadas com a finalidade de estabelecer a sensibilidade e a especificidade dos anticorpos antiendomísio como teste auxiliar no diagnóstico da doença celíaca, apesar da técnica utilizada (imunofluorescência indireta) dificultar a padronização do exame. Isto se deve à interferência pessoal na leitura do resultado, mesmo quando se realiza titulação. Os trabalhos publicados comparando esse marcador com anticorpos antigliadina e anti-reticulina sempre mostraram melhores resultados dos anticorpos antiendomísio em relação à sensibilidade e especificidade para o diagnóstico e o acompanhamento da doença celíaca. Kapuscinska *et al.* (1987) encontraram 100,0% de sensibilidade e especificidade; Rossi *et al.* (1988) constataram anticorpos antiendomísio positivos em paciente

com infecção por *Giardia lamblia*, que desapareceram após o tratamento com furazolidona, não conseguindo, portanto, especificidade de 100,0%, como ocorreu na maioria dos estudos. Calabuig *et al.* (1989) obtiveram 100,0% de sensibilidade e especificidade.

Em 1991, Bürgin-Wolff *et al.* relataram sensibilidade de 99,4% para anticorpos antiendomísio. Nesse trabalho, os autores estudaram a influência da idade na sensibilidade do marcador e concluíram que, em crianças com menos de dois anos de idade, ela é menor. Grodzinsky *et al.* (1995) também sugeriram a determinação dos anticorpos antigliadina para crianças abaixo de dois anos.

McMillan *et al.* (1991) avaliaram o valor preditivo da determinação dos anticorpos antigliadina e antiendomísio no diagnóstico de doença celíaca em pacientes que deveriam ser submetidos à biópsia intestinal, encontrando sensibilidade e especificidade de 100,0% e valor preditivo positivo (VPP) de 100,0% para anticorpos antigliadina e sensibilidade dos anticorpos antiendomísio de 93,0% e especificidade de 86,0% e VPP de 92,0%.

Ferreira *et al.* (1992) afirmaram que a determinação dos anticorpos antiendomísio é superior a todos os outros testes utilizados (anticorpos antigliadina e anticorpos anti-reticulina) como indicadores de DC.

Cataldo *et al.* (1995) consideraram a determinação dos anticorpos antiendomísio excelente como triagem para biópsia intestinal, para seguimento da adesão à

dieta isenta de glúten e para a identificação dos casos silenciosos e latentes da doença.

Mascart-Lemone e Lambrechts (1995) referenciaram que a sensibilidade de 100,0% para diagnóstico da doença só era conseguida com a combinação, em paralelo, da determinação dos anticorpos IgG e IgA anti gliadina e antiendomísio.

Também Dubel *et al.* (1996) encontraram sensibilidade para anticorpos antiendomísio de 56,0% e especificidade de 100,0%. O substrato utilizado para a imunofluorescência foi o esôfago de macaco e a diluição do soro utilizada foi de 1:20.

Rostami *et al.* (1999) estudaram a eficiência do diagnóstico sorológico na doença celíaca e concluíram que os resultados sorológicos negativos devem ser avaliados com cuidado e que os anticorpos antiendomísio e anti gliadina têm valor limitado para a triagem de biópsia intestinal no diagnóstico de doença celíaca.

No Brasil, Kotze *et al.* (1999) compararam a determinação de anticorpos anti-reticulina com os anticorpos antiendomísio em pacientes com diagnóstico de doença celíaca não tratada, com e sem adesão à dieta isenta de glúten. Nos não tratados e nos que transgrediam a dieta, a sensibilidade dos anticorpos antiendomísio foi de 100,0% e anti-reticulina de 59,4%. Concluíram que a determinação dos anticorpos antiendomísio constitui o teste sorológico de escolha para o diagnóstico e seguimento dos pacientes com DC.

James e Scott (2000) revisaram publicações de 1985 a 1999 sobre a sensibilidade e a especificidade da determinação de anticorpos antiendomísio no diagnóstico da doença celíaca, encontrando variação de 74,0 a 100,0% para a sensibilidade e de 64,0 a 100,0% para a especificidade. Os autores avaliaram 2006 pacientes com doença celíaca não tratada e 4107 aparentemente sem a doença, encontrando sensibilidade de 94,0% e especificidade de 99,0% para aquele marcador sorológico. Chegaram às seguintes conclusões: a) o teste não deve ser usado para pacientes com deficiência de IgA; b) ele deve ser usado como triagem em pacientes com baixa probabilidade de ter a doença, como no diabetes *mellitus* insulino-dependente; c) ele é desnecessário nos pacientes com alta probabilidade de ter a doença, como no dermatite herpetiforme, que devem ser submetidos à biópsia intestinal, independentemente da sorologia; d) o teste positivo pode indicar doença celíaca latente, mesmo nos pacientes com biópsia normal; e) ele não é fidedigno para monitorar resposta ao tratamento.

A partir da descrição da transglutaminase tecidual como auto-antígeno da doença celíaca em 1997, por Dieterich *et al.*, diversos estudos começaram a ser realizados com o objetivo de comparar a fidedignidade dos marcadores sorológicos no diagnóstico e acompanhamento da doença celíaca. Levine *et al.* (2000) compararam a acurácia da determinação dos anticorpos IgA antiendomísio e antitransglutaminase tecidual no diagnóstico da doença celíaca em pacientes pediátricos. Encontraram sensibilidade e especificidade dos anticorpos antitransglutaminase de 90% e para os anticorpos antiendomísio sensibilidade de 100,0% e especificidade de 94,0%.

Leon *et al.* (2001) estudaram a sensibilidade e a especificidade da determinação de anticorpos antitransglutaminase e antiendomísio, chegando à conclusão que a determinação dos primeiros, utilizando como substrato a transglutaminase de *Cavia porcellus* purificada, oferece melhor resultado que a transglutaminase não purificada e que a transglutaminase humana oferece resultado um pouco melhor, mas com alto custo. Ambas apresentaram resultados semelhantes aos da pesquisa de anticorpos antiendomísio.

Carroccio *et al.* (2002) avaliaram a presença de anticorpos IgA antiendomísio, antitransglutaminase humana e de *Cavia porcellus*, tendo concluído que, apesar do teste para os anticorpos antitransglutaminase apresentar ótima sensibilidade, a especificidade deixava a desejar, sendo significativamente mais baixa que a determinação de anticorpos antiendomísio.

Em trabalho de revisão, Abdulkarim e Murray (2003) consideraram que os exames a serem utilizados para a triagem da realização de biópsia intestinal são as determinações dos anticorpos antiendomísio ou antitransglutaminase tecidual. Os autores consideraram que, se há baixa suspeição clínica e exames sorológicos negativos, pode-se excluir DC. Nos casos com grande suspeição clínica, deve-se realizar biópsia intestinal e exames sorológicos concomitantemente. Naqueles em que a sorologia for positiva e a histologia negativa, deve-se rever ou repetir a biópsia, além do acompanhamento clínico. Se a sorologia é negativa e a histologia positiva, deve-se considerar outras causas de enteropatia. Caso não se encontre qualquer outra causa, deve-se tratar como doença celíaca e fazer pesquisa de HLA DQ2/8. As variações entre sensibilidade

e especificidade da determinação dos anticorpos antiendomísio e antitransglutaminase tecidual foram praticamente idênticas.

2.1.3 Anticorpos antiendomísio utilizando cordão umbilical humano como substrato

Durante quase 20 anos foi utilizado o esôfago de macaco como substrato para a determinação dos anticorpos antiendomísio. Ladinser e Rossipal (1994) descreveram a presença desses anticorpos em cordão umbilical humano, tendo realizado estudo comparativo com a determinação dos anticorpos antiendomísio utilizando o esôfago de macaco, encontrando sensibilidade de 100,0% para a determinação dos anticorpos em cordão umbilical humano e 90,0% para a determinação em esôfago de macaco. Kolho e Savilahti (1997) encontraram sensibilidade de 94,0% e especificidade de 100,0% tanto para os exames realizados com o esôfago de macaco quanto com o cordão umbilical humano. Not *et al.* (1997) compararam os dois substratos, encontrando sensibilidade e especificidade de 100,0% em ambos, concluindo que a determinação dos anticorpos antiendomísio é um bom indicador para a doença celíaca ativa em crianças e que o cordão umbilical humano é um excelente substrato, podendo substituir o esôfago de macaco e eliminando, desta forma, os problemas que envolvem espécies em risco de extinção. Os resultados dos exames com os dois substratos detectaram os mesmos casos positivos e nenhum apresentou resultado falso-positivo.

A maioria dos artigos relata que a determinação de anticorpos antiendomísio pela técnica de imunofluorescência indireta utilizando como substrato o cordão umbilical humano é tão adequada e com igual sensibilidade e especificidade que aquela que usa esôfago de macaco. Entretanto, Feighery *et al.* (2003); Gabrielli *et al.* (2003); Johnston *et al.* (2003); Tesei *et al.* (2003); Tiberti *et al.* (2003); Laadhar *et al.* (2004) ainda adotam o esôfago de macaco como substrato. Já Ghedira *et al.* (2001); Kotze *et al.* (2001); Book; Zone; Neuhausen (2003), Kotze *et al.* (2003) empregam o cordão umbilical humano, considerando-o adequado para a determinação dos anticorpos antiendomísio.

2.1.4 Anticorpos antitransglutaminase tecidual

A transglutaminase tecidual como auto-antígeno da doença celíaca foi descrita por Dieterich *et al.* (1997) a partir da observação de que os anticorpos antiendomísio eram particularmente específicos para a doença celíaca, sugerindo que essa estrutura continha um ou mais alvos, auto-antígenos, que exerciam importante papel no desenvolvimento da doença. Nesses estudos, os autores detectaram uma proteína com peso molecular de 85-Kda, denominada transglutaminase tecidual. A transglutaminase tecidual pertence a uma família de enzimas cálcio-dependente, que catalisa a ligação cruzada de proteínas, resultando na formação de uma ligação *epsilon*-(gama-glutamil) lisina. O papel da transglutaminase tecidual é conhecido apenas parcialmente. Ela está localizada no citoplasma celular é liberada durante lesões e está associada à superfície celular ou a certas moléculas da matriz extracelular. Tem o objetivo de estabilizar

a matriz extracelular provisória no tecido de granulação. Além disto, ocorre também durante apoptose e pode estar alterada durante o crescimento de alguns tumores. A enzima proveniente do *Cavia porcellus* mostra seqüência de proteína idêntica à transglutaminase humana, conservando os epitopos antigênicos, podendo ser utilizada para experimentos laboratoriais.

Para confirmar que o ATGT seria o auto-antígeno da doença celíaca, estudos foram feitos para a determinação de anticorpos antiendomísio em esôfago de macaco, através de imunofluorescência indireta, utilizando soros de pacientes com doença celíaca, antes e após incubação com transglutaminase. No primeiro caso, a lâmina mostrou padrão de imunofluorescência característico com os achados de ligação do anticorpo com o endomísio, o que não foi encontrado após incubação com transglutaminase. Isto demonstra que a transglutaminase é o autoantígeno do endomísio, considerado característico da doença celíaca (DIETERICH *et al.*, 1997).

A partir dessas observações, foi desenvolvida a técnica ELISA para determinar a presença dos anticorpos IgA antitransglutaminase nos pacientes com DC, cujos resultados, comparados com as determinações de anticorpos antiendomísio, mostraram alta sensibilidade, havendo diminuição das leituras de densidade óptica na mesma proporção em que os títulos de antiendomísio diminuíam (DIETERICH *et al.*, 1998).

Sárdy *et al.* (2000) compararam os resultados da determinação dos anticorpos IgA antiendomísio em esôfago de macaco e anticorpos antitransglutaminase

tecidual de *Cavia porcellus*, encontrando sensibilidade de 92,5% e especificidade de 98,6% para este marcador sorológico e 100,0% de sensibilidade e especificidade para a determinação dos anticorpos antiendomísio. Nesse trabalho realizaram inibição do padrão antiendomísio nos soros positivos para anticorpos antiendomísio e negativos para transglutaminase (diluíram o soro e colocaram transglutaminase durante duas horas) e em um caso o padrão de fluorescência para anticorpos antiendomísio não pôde ser inibido. Os autores sugeriram, então, que poderia haver outros antígenos menores que dariam o resultado positivo.

Comparando a determinação de antitransglutaminase e antiendomísio, Levine *et al.* (2000) encontraram sensibilidade e especificidade de 90,0% para antitransglutaminase e sensibilidade de 94,0% e especificidade de 100,0% para antiendomísio.

Leon *et al.* (2001) relataram que os resultados falsos-positivos para ATGT são devidos à reatividade do conjugado antiIgA contra proteínas contaminantes presentes no antígeno. Eles encontraram sensibilidade para anticorpos IgA antitransglutaminase de *Cavia porcellus* de 97,7 e 98,8% para os anticorpos IgA antiendomísio e especificidade de 98,8% para ambos. A transglutaminase humana ofereceu resultados um pouco melhores, mas o custo foi muito alto. Vitória *et al.* (2001) relataram concordância de 95,2% entre a determinação dos anticorpos antiendomísio (esôfago de macaco) e transglutaminase tecidual humana.

Carrocio *et al.* (2002) estudaram 207 pacientes, todos submetidos à biópsia intestinal, com a determinação dos anticorpos antiendomísio, antitransglutaminase de *Cavia porcellus* e antitransglutaminase humana, encontrando sensibilidade de 100,0% para os três testes e especificidade de 100, 92,0 e 98,0%, respectivamente. Eles sugeriram que, para a triagem de biópsia intestinal, deve-se realizar a determinação dos anticorpos antitransglutaminase e que os casos positivos devem ser confirmados pela determinação dos anticorpos antiendomísio.

Há autores que hoje defendem o estudo dos antígenos de histocompatibilidade humana (HLA) dos pacientes com suspeita de doença celíaca. Kaukinen *et al.* (2002) consideraram que de 76 indivíduos com suspeita de doença celíaca, em 36 ela foi descartada pela determinação do HLA-DQ2 e DQ8. Todos apresentavam biópsia intestinal com histologia de difícil interpretação e algum exame sorológico para doença celíaca positivo. Eles recomendaram que os pacientes com HLA DQ2 e DQ8 negativos devam ser seguidos clinicamente, em uso de dieta com glúten. Anticorpos antiendomísio positivos só foram detectados em pacientes com HLA positivo, nos quais é desnecessária a realização da tipagem do HLA. Anticorpos antitransglutaminase (ATGT) e anti-reticulina são menos específicos. No mesmo trabalho, os autores verificaram que a determinação de HLA-DQ2 e DQ8 deveria ser utilizada para definir a presença da doença nos grupos de risco, pois ela é mais confiável que a sorologia. Entretanto, eles encontraram o HLA-DQ2 ou o DQ8 positivo em 40% do grupo-controle.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a acurácia dos marcadores sorológicos para o diagnóstico de doença celíaca: anticorpos das classes IgA e IgG antigliadina, anticorpos classe IgA antiendomísio (utilizando-se como substrato o cordão umbilical humano e o esôfago de macaco), anticorpos classe IgA antitransglutaminase tecidual, através da sensibilidade e especificidade.

3.2 Objetivos específicos

- comparar a acurácia da determinação dos anticorpos antiendomísio pela técnica de imunofluorescência indireta utilizando como substratos esôfago de macaco e cordão umbilical humano;
- determinar a seqüência mais adequada de exames para a triagem de pacientes a serem submetidos à biópsia intestinal para o diagnóstico da doença celíaca;
- avaliar a associação entre os marcadores sorológicos e a doença celíaca.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Foram estudados 400 pacientes atendidos no Serviço de Gastroenterologia Pediátrica e de Adulto do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais durante o período de 1991 a 2002. A determinação dos anticorpos antigliadina foi realizada como exame de rotina e os soros desses pacientes permaneceram estocados a -20°C para a posterior determinação dos anticorpos IgA antiendomísio e antitransglutaminase tecidual, para a avaliação da acurácia dos mesmos no diagnóstico da doença celíaca.

Os pacientes foram distribuídos em três grupos:

- Grupo 1 – **pacientes com doença celíaca não tratada**: esse grupo foi constituído por 38 pacientes atendidos no Ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica com suspeita de doença celíaca. Um paciente apresentava deficiência de IgA sérica, tendo sido retirado da pesquisa.
- Grupo 2 – **pacientes sem queixas gastrointestinais**: foram estudados 208 pacientes encaminhados ao ambulatório para avaliação de baixa estatura monossintomática ou doenças sistêmicas não relacionadas ao aparelho digestivo.

- Grupo 3 - **pacientes com outras enteropatias**: foram estudados 155 pacientes que apresentavam sintomatologia gastrointestinal, seja sob a forma de distensão abdominal, diarreia crônica, intolerância a lactose e/ou sacarose, enteropatia ambiental ou alergia ao leite de vaca.

4.2 Procedimentos

4. 2.1 Marcadores sorológicos

4.2.1.1 Determinação dos anticorpos classes IgA e IgG antigliadina

Foram coletados 5ml de sangue de cada paciente, por cateterismo venoso. A seguir, após coagulação adequada, o sangue foi centrifugado e o soro separado em dois frascos devidamente identificados e congelados a -20°C . Não havia conhecimento prévio do resultado da histologia no momento do exame laboratorial. Para a determinação dos anticorpos antigliadina, foi utilizada a técnica ELISA, segundo Volta *et al.* (1985), modificada.

Empregaram-se placas de poliestireno para micro-ELISA, sensibilizadas com gliadina bruta (Sigma), diluída em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, na concentração de $50\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{l}$ por poço da placa por 12 horas, a 4°C . As placas foram lavadas cinco vezes com água corrente. Após essa etapa de sensibilização, as placas eram submetidas a bloqueio com albumina bovina (Sigma) diluída em PBS-*Tween* 20, a 2%, $150\mu\text{l}$ por poço, colocada em estufa a 37°C durante uma

hora e novamente lavadas. Os soros eram então depositados nas placas, seguindo-se mapa previamente estabelecido para controles positivo e negativo e brancos, nas concentrações de 1:100 para IgA e 1:500 para IgG, levadas para estufa a 37°C durante uma hora e, posteriormente, lavadas por cinco vezes. Os conjugados antilgG e antilgA humana, ligados à peroxidase (Sigma), eram colocados nas placas, na concentração de 1:1000, 100µl/poço, tanto para IgG como para IgA, em estufa a 37°C durante uma hora e lavadas novamente cinco vezes. Para a revelação do sistema enzimático, eram colocados 100µl de 2,2 *azino-bis ethylbez-thiazoline-6-sulfonic acid*, Sigma (ABTS) em cada poço e as placas mantidas em temperatura ambiente por cinco minutos. A reação era interrompida após cinco minutos com sulfato sódico de duodocil (SDS - Sigma) a 10% e a leitura de densidade óptica feita em comprimento de onda de 405nm, em espectrofotômetro para micro-ELISA Bio Rad 550.

Todos os soros foram ensaiados em duplicatas. Para todas as placas foram utilizados os mesmos soros controles positivo e negativo.

Os exames dos pacientes sem queixas gastrointestinais foram repetidos duas vezes em situações diferentes, tendo havido reprodutibilidade dos resultados.

4.2.1.2 Determinação dos anticorpos da classe IgA antitransglutaminase tecidual

Para a determinação dos anticorpos antitransglutaminase tecidual, foi adotada a técnica ELISA, segundo Dieterich *et al.* (1998), modificada.

Foram utilizadas placas de poliestireno (NUNC) para micro-ELISA, sensibilizadas com transglutaminase tecidual de *Cavia porcellus* (Sigma), diluída em tris HCl (ácido clorídrico) pH 7,5, na concentração de 2,45µg/100µl, 100µl por poço da placa por uma hora, a 35°C. As placas eram lavadas por cinco vezes com tampão tris HCl T20. Após essa etapa de sensibilização, os soros eram colocados nas placas, seguindo-se mapa previamente estabelecido para controles positivos e negativos e brancos na concentração de 1:25. As placas eram colocadas em estufa a 35°C durante uma hora e, posteriormente, lavadas por cinco vezes. O conjugado antiIgA humana ligada à peroxidase (Sigma) era posto nas placas na concentração de 1:1000 em estufa a 35°C durante uma hora e lavado novamente cinco vezes. Para a revelação do sistema enzimático, eram aplicados 100µl de ABTS em cada poço e as placas mantidas em temperatura ambiente por cinco minutos. A leitura das densidades ópticas foi realizada em comprimento de onda de 405nm, em espectrofotômetro para micro-ELISA Bio Rad 550.

Todos os soros foram ensaiados em duplicatas. Para todas as placas foram utilizados os mesmos soros: controles, positivo e negativo.

4.2.1.3 Determinação dos anticorpos antiendomísio utilizando cordão umbilical humano como substrato

A determinação dos anticorpos antiendomísio em cordão umbilical humano foi realizada segundo técnica de Chorzelski *et al.* (1983), modificada: sobre cortes de três micra de cordão umbilical humano foram colocados soros diluídos em tampão

fosfato (PBS) na concentração de 1:2,5 e incubadas em temperatura ambiente durante 30 minutos. As lâminas eram lavadas durante 10 minutos em PBS. O conjugado antiIgA humana ligada à fluoresceína (Sigma) era colocado sobre os cortes já secos, na diluição de 1:20 e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente em câmara escura. Posteriormente, eram lavadas em PBS por 10 minutos, sendo adicionado azul de Evans nos últimos três minutos. Sobre as lâminas secas, eram aplicados óleo e lamínula e a leitura feita em microscópio de imunofluorescência Jenamed no aumento de 250 vezes. Os soros cujas leituras eram consideradas positivas eram diluídos a 1:40, procedendo ao exame da mesma forma. Os soros que apresentavam fluorescência nessa diluição eram considerados positivos.

4.2.1.4 Determinação dos anticorpos antiendométrio utilizando esôfago de macaco como substrato

A determinação dos anticorpos antiendométrio em esôfago de macaco foi realizada em *kit* comercial (Immco Diagnostics, Buffalo, New York, USA), seguindo orientação do fabricante, colocando-se sobre os cortes soro diluído na concentração de 1:2,5 durante 30 minutos. As lâminas eram lavadas durante 10 minutos em PBS. O conjugado antiIgA humana ligada à fluoresceína era colocados sobre os cortes já secos, incubados por 30 minutos em temperatura ambiente e posteriormente lavados em PBS por 10 minutos, sendo adicionado azul de Evans. As lâminas já secas recebiam óleo e lamínula e a leitura era realizada em microscópio de imunofluorescência Jenamed, com aumento de 250

vezes. Os soros, cujas leituras foram consideradas positivas, eram diluídos a 1:40, repetindo-se o mesmo procedimento. Os soros que apresentavam fluorescência nessa diluição eram considerados positivos.

4.2.1.5 Determinação de IgA sérica

Nos pacientes que apresentaram apenas anticorpos antigliadina da classe IgG positivos, a dosagem de IgA sérica foi realizada pela técnica de nefelometria.

4.2.2 Biópsia intestinal

As biópsias jejunais foram feitas por via oral, utilizando-se a cápsula de Crosby ou Carey posicionada no ângulo de Treitz. Esse posicionamento foi determinado por radiografia simples de abdome. Os fragmentos retirados, orientados com a parte cruenta sobre papel liso, eram colocados em formol a 10% e encaminhados ao Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, onde foram processados e examinados. As colorações utilizadas foram hematoxilina-eosina e ácido periódico Schiff (PAS). Todas as biópsias foram analisadas pelo mesmo patologista e revistas em seções anatomoclínica com a presença do mesmo patologista. A biópsia intestinal foi considerada indispensável para o diagnóstico da DC.

A classificação utilizada para o estudo da histologia jejunal foi a de Perera; Weinstein; Rubin (1975) modificada:

- Normal: relação entre as vilosidades e as criptas maior que 2,5 para 1, orla em escova contínua, sem aumento da celularidade da lâmina própria e número considerado normal de linfócitos intra-epiteliais menor que 30 por 100 enterócitos.
- Hipotrofia grau I: relação entre as vilosidades e as criptas de 2,5 para 1, orla em escova contínua, discreto infiltrado inflamatório de lâmina própria, sem aumento dos linfócitos intra-epiteliais.
- Hipotrofia grau II: relação entre as vilosidades e as criptas entre 2,5 para 1 a 2 para 1, orla em escova com alterações discretas, infiltrado inflamatório da lâmina própria discreto, com aumento do número de linfócitos intra-epiteliais entre 30 e 50 linfócitos por 100 enterócitos.
- Hipotrofia grau III: relação entre as vilosidades e as criptas de 2 para 1 a 1 para 1, orla em escova descontínua, com aumento do infiltrado inflamatório da lâmina própria e aumento de linfócitos intra-epiteliais de forma focal.
- Atrofia (hipotrofia grau IV): ausência de vilosidades ou apenas vestígios das mesmas, com inversão vilosidade/cripta, epitélio intestinal freqüentemente cuboidal e basofílico, grande número de linfócitos intra-epiteliais e aumento do infiltrado inflamatório da lâmina própria à custa de linfócitos e plasmócitos. A orla em escova dos enterócitos é geralmente descontínua ou praticamente ausente.

Foram consideradas histologias compatíveis com doença celíaca aquelas com atrofia grau IV.

As FIG.1 e 2 mostram histologia de biópsia intestinal considerada sem alterações e com padrão celíaco.

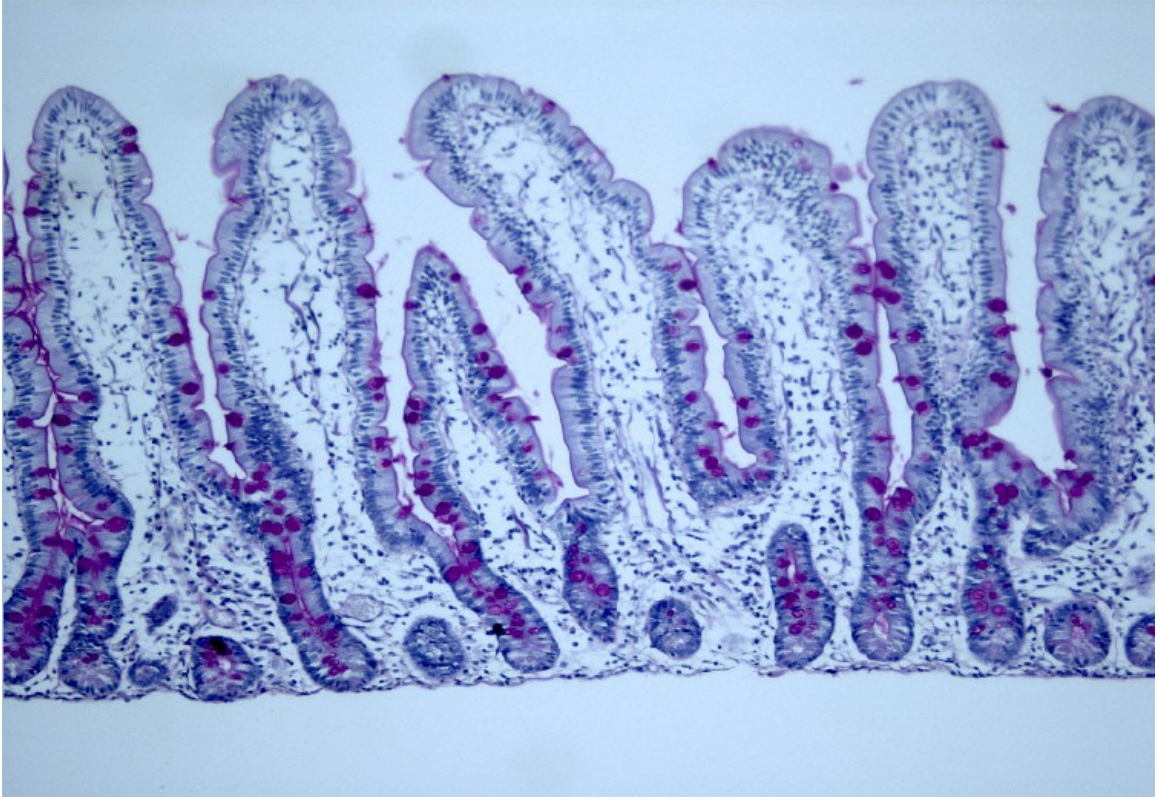


FIGURA 1 - Biópsia intestinal com padrão histológico considerado dentro da normalidade, coloração PAS, aumento 400 vezes.

Essa biópsia intestinal mostra relação maior que 2,5 para 1 entre as vilosidades e as criptas, orla em escova contínua, sem aumento da celularidade da lâmina própria e número de linfócitos intra-epiteliais considerado normal (menor que 30 por 100 enterócitos).

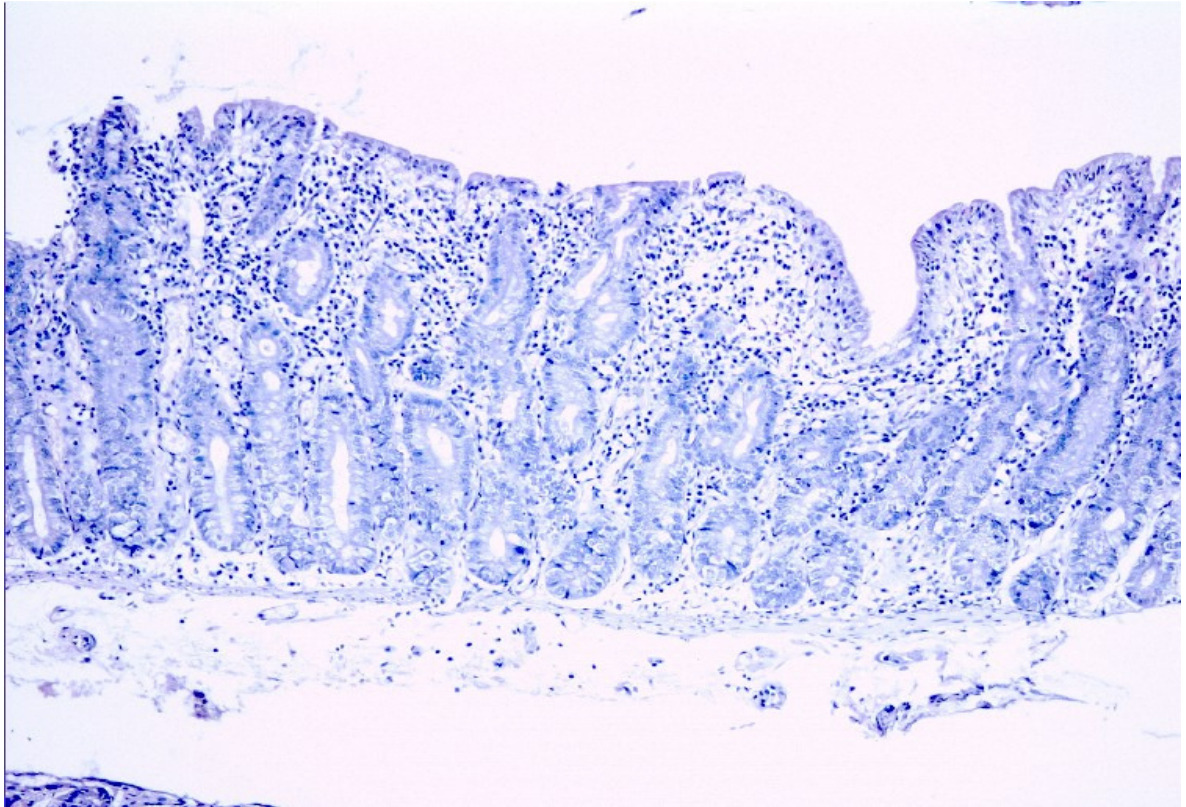


FIGURA 2 – Biópsia intestinal considerada padrão celíaco, hipotrofia grau IV, coloração hematoxilina-eosina, aumento 400 vezes.

Essa biópsia mostra vestígios de vilosidades com inversão da relação vilosidade/cripta, epitélio intestinal cuboidal e basofílico, grande número de linfócitos intra-epiteliais e aumento do infiltrado inflamatório da lâmina própria à custa de linfócitos e plasmócitos.

4.3 Análise estatística

Os dados foram armazenados e analisados no programa EPI INFO versão 6.0 (DEAN *et al.*, 1994).

Para a comparação entre proporções, foi empregado o teste do quiquadrado ou o teste exato de Fisher, quando necessário (valor esperado em uma casela < 5).

Para a comparação entre medianas, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e para a comparação entre as médias foi utilizada a análise de variância (ANOVA).

Para as medidas de associação, sensibilidade e especificidade, valores preditivos positivo e negativo, foi calculado o intervalo de confiança de 95% pelo método de Fleiss quadrático.

Foi considerado o valor 5% como limiar de significância estatística.

A análise multivariada dos componentes principais, conforme Sampaio (1993), foi utilizada para estabelecer a relação entre a presença da enteropatia e os marcadores sorológicos anticorpo IgA antigliadina (AGAA), anticorpo IgG antigliadina (AGAG), ATGT, anticorpo IgA antiendomísio em cordão umbilical humano (AAECO) e AAEEM e realizada no programa INFOSTAT, elaborado pela Universidade de Córdoba – Argentina.

4.4 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, cujo parecer recebeu o número ETIC 036/01 (ANEXO A).

5 RESULTADOS

5.1 Pacientes

5.1.1 Grupo 1 – Pacientes com doença celíaca não tratada

Foram estudados 37 pacientes, sendo 20 (54,0%) do sexo feminino e 17 (46,0%) do sexo masculino, média de idade de 4,1 anos, desvio-padrão de 4,1, mediana de 2,4, amplitude de 0,7 a 17,3 anos, 75% com idade abaixo de 4,7 anos. A média de peso foi de 14,4 quilos, com desvio-padrão de 9,1, mediana de 11,5 e amplitude de 6,0 a 37,0 quilos. A média de altura foi de 1,0 metro, com 0,2 de desvio-padrão, mediana de 0,9 e amplitude de 0,7 a 1,6 metro. Todos tinham biópsia intestinal considerada padrão celíaco.

5.1.2 Grupo 2 – Pacientes sem queixas gastrointestinais

Foram estudados 208 pacientes, sendo 81 (38,9%) do sexo feminino, 127 (61,1%) do sexo masculino, com média de idade de 9,0 anos, desvio-padrão de 7,4, mediana de 8,4, com amplitude de 0,4 a 54,8 anos, sendo 97,6% com idade inferior a 18,7 anos. A média de peso foi de 21,3 quilos, com desvio-padrão de 11,8, mediana de 18,4 e amplitude de 4,5 a 73,0. A média de altura foi de 1,1 metro, desvio-padrão de 0,2, mediana de 1,1 e amplitude de 0,6 a 1,7 metros. Destes, 24 tinham biópsia intestinal. Eles faziam parte de um trabalho anterior

sobre DC e baixa estatura aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, cujos soros permaneceram estocados a -20° . Além dos pacientes com baixa estatura monossintomática, entraram nesse grupo pacientes com outras doenças sistêmicas não relacionadas ao aparelho digestivo.

5.1.3 Grupo 3 – Pacientes com outras enteropatias

Foram estudados 155 pacientes, sendo 80 (51,6%) do sexo feminino, 75 (48,4%) do sexo masculino, média de idade de 8,8 anos, desvio-padrão de 13,7, mediana de 3,2, com amplitude de 0,3 a 77,8 anos, sendo 87,4% com idade abaixo de 19,4 anos. A média de peso foi de 18,8 quilos, desvio-padrão de 17,1, mediana de 12,6, amplitude de 4,9 a 92,0 quilos. A média de altura foi de 1,0 metro, com desvio-padrão de 0,3, mediana de 0,9, com amplitude de 0,6 a 1,7 metro. Destes, 69 foram submetidos à biópsia intestinal.

Foram considerados como tendo outras enteropatias os pacientes que apresentaram sintomas gastrointestinais como diarreia, distensão ou dor abdominal e cujos diagnósticos foram: intolerância a dissacárides, alergia à proteína do leite de vaca, doença de Crohn, enteropatia ambiental, entre outras.

A TAB. 1 mostra a distribuição dos grupos de pacientes em relação à idade, sexo, peso e altura.

TABELA 1

Distribuição dos pacientes com doença celíaca, do grupo-controle, com outras enteropatias e do grupo sem queixas gastrointestinais, segundo sexo, idade, peso e altura

	Doença celíaca	Sem queixas gastrointestinais	Outras enteropatias
Sexo			
Masculino (%)	17 (46,0)	127 (61,1)	75 (48,4)
Feminino (%)	20 (54,0)	81 (38,9)	80 (51,6)
Total (%)	37 (100,0)	208 (100,0)	155 (100,0)
Idade (anos)			
Média ± desvio-padrão	4,1 ± 4,1	9,0 ± 7,4	8,8 ± 13,7
Mediana (amplitude)	2,4 (0,7–17,3)	8,40 (0,4–54,8)	3,2 (0,3–77,8)
Total	36	208	151
Peso (Kg)			
Média ± desvio-padrão	14,4 ± 9,1	21,3 ± 11,8	18,8 ± 17,1
Mediana (amplitude)	11,5 (6,0–37,0)	18,4 (4,5–73,0)	12,6 (4,9–92,0)
Total	34	176	133
Altura (m)			
Média ± desvio-padrão	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,0 ± 0,3
Mediana (amplitude)	0,9 (0,7 a 1,6)	1,1 (0,6 a 1,7)	0,9 (0,6 a 1,7)
Total	31	161	114

Não houve diferença estatística significativa em relação a sexo entre os grupos com doença celíaca não tratada e outras enteropatias e de doença celíaca e os sem queixas gastrointestinais. Em relação à mediana de idade, peso e altura, a diferença foi significativa.

5.2 Marcadores sorológicos

5.2.1 Anticorpos antigliadina

Os anticorpos da classe IgG e IgA antigliadina foram determinados pela técnica ELISA no soro de 38 pacientes do grupo 1, cujas biópsias jejunais apresentavam hipotrofia grau IV (padrão celíaco). Um entre os 38 apresentava deficiência de IgA, tendo sido retirado do estudo. Esses anticorpos foram também determinados nos soros dos 208 pacientes do grupo 2, sem queixas gastrointestinais, que estavam sendo avaliados do ponto de vista gastroenterológico devido à baixa estatura monossintomática ou devido a outras doenças sistêmicas, e em 155 pacientes do grupo 3, com outras enteropatias.

A média da leitura das densidades ópticas dos anticorpos IgA e IgG antigliadina no grupo 1 foi de 0,278 e 0,343nm, mediana 0,211 e 0,315, desvio-padrão de 0,287 e 0,208, respectivamente. A leitura mínima foi de 0,000 para ambos e a máxima de 1,149 para IgA e 1,090 para IgG. No grupo 2, a média das leituras das densidades ópticas foi de 0,008nm, com mediana de 0,003nm e desvio-padrão de 0,014, sendo a leitura mínima de 0,000nm e a máxima de 0,097nm para AGAA. Para AGAG, foram detectados: média de 0,038nm, mediana de 0,022nm, desvio-padrão de 0,051 e leitura mínima de 0,000nm e máxima de 0,371nm. Para o grupo 3, a média das leituras da densidades ópticas para os anticorpos da classe IgA foi de 0,011nm, mediana de 0,004nm, desvio-padrão de 0,023 e leitura mínima de 0,000nm e máxima de 0,241nm. Para os da classe IgG, a média foi de

0,051nm, mediana de 0,030nm, desvio-padrão de 0,066, com leitura mínima de 0,000nm e máxima de 0,341nm.

O ponto de corte foi estabelecido pela média dos resultados das leituras das densidades ópticas dos soros das crianças sem queixa gastrointestinal, mais dois desvios-padrão, em 0,036 para a IgA (média = 0,008 desvio-padrão = 0,014) e 0,140 para a IgG (média = 0,038 desvio-padrão = 0,051).

- Grupo 1 - dos 37 pacientes avaliados, sete apresentaram anticorpos IgA antigliadina negativos e quatro anticorpos IgG antigliadina negativos. Todos com biópsia intestinal com hipotrofia grau IV.
- Grupo 2 - a determinação dos anticorpos antigliadina foi realizada nos 208 pacientes. Destes, 24 foram submetidos à biópsia intestinal, sendo que 21 apresentaram histologia normal, dois com hipotrofia grau I e um com hipotrofia grau II. Dez pacientes tiveram resultados positivos para AGAA e 10 positivos para AGAG. Nenhum apresentou ambas as classes de anticorpos positivos. Dos que apresentaram sorologia positiva para AGAA, um foi submetido à biópsia intestinal e não apresentou alteração na mucosa intestinal, com biópsia dentro da normalidade. Um dos pacientes com AGAG positivo foi submetido à biópsia intestinal e não apresentou alterações histológicas.
- Grupo 3 - a determinação dos anticorpos das classes IgG e IgA antigliadina foi realizada nos soros dos 155 pacientes. Nove apresentaram anticorpos positivos para AGAA (seis submetidos à biópsia intestinal) e 14 positivos para AGAG (12 submetidos à biópsia intestinal). Cinco pacientes foram positivos para ambos, AGAA e AGAG; quatro foram positivos apenas para

AGAA e nove apenas para AGAG, sendo 137 negativos para ambos. Dos 155, 69 foram submetidos à biópsia intestinal, sendo que 21 apresentaram biópsia sem alterações histológicas, 31 tinham hipotrofia grau I (um deles com AGAG positivo e um com AGAA e AGAG positivos), nove com hipotrofia grau II, com um paciente com AGAG positivo e oito com hipotrofia grau III, com achatamento de vilosidade, aumento da celularidade da lâmina própria, mas sem a presença de linfócitos intra-epiteliais aumentados. Dos pacientes com hipotrofia grau III, um teve AGAA e AGAG positivos e um apenas AGAG positivo. Os outros seis tiveram exame sorológico negativo para AGAA e AGAG. Desses oito, três tiveram diagnóstico de alergia à proteína do leite de vaca e cinco o diagnóstico de enteropatia ambiental. Dos cinco com diagnóstico de enteropatia ambiental, três foram colocados em dieta isenta de glúten, mas não apresentaram melhora clínica, e dois não continuaram o acompanhamento médico.

Dos 69 pacientes com biópsia intestinal, cinco apresentaram anticorpos AGAA e AGAG positivos, um apenas AGAA positivo e sete apenas AGAG positivos. Ambos os anticorpos negativos estavam presentes em 56 pacientes.

5.2.2 Anticorpos antitransglutaminase tecidual

Os anticorpos da classe IgA antitransglutaminase tecidual foram determinados no soro de 31 pacientes do grupo 1, 156 do grupo 2 e em 103 do grupo 3.

A média da leitura das densidades ópticas dos anticorpos IgA antitransglutaminase para o grupo 1 foi de 0,309nm, com mediana de 0,239nm, desvio-padrão de 0,278, leitura mínima de 0,001nm e máxima de 1,054nm. Para o grupo 2, a média das leituras das densidades ópticas foi de 0,010nm, com mediana de 0,008nm, desvio-padrão de 0,010, leitura mínima de 0,001nm e máxima de 0,044nm. Para o grupo 3, a média das leituras das densidades ópticas foi de 0,010nm, com mediana de 0,006nm, desvio-padrão de 0,016, leitura mínima de 0,000nm e máxima de 0,118nm.

O ponto de corte foi estabelecido pela média dos resultados das leituras das densidades ópticas dos soros das crianças sem queixa gastrointestinal mais dois desvios-padrão em 0,030 (média = 0,010, desvio-padrão = 0,010).

- Grupo 1 - dos 31 pacientes avaliados com biópsia intestinal padrão celíaco, cinco apresentaram anticorpos antitransglutaminase negativos.
- Grupo 2 - dos 208 pacientes sem queixas gastrointestinais, a determinação dos anticorpos antitransglutaminase tecidual foi realizada em 156, tendo sido positiva em cinco e nenhum deles positivo para qualquer outro tipo de marcador sorológico. Desses 156 pacientes, 21 foram submetidos à biópsia intestinal (18 apresentaram padrão histológico considerado normal, dois com hipotrofia grau I e um com hipotrofia grau II). Entre os que exibiram alteração histológica da biópsia intestinal, apenas um apresentou anticorpos antitransglutaminase positivos.
- Grupo 3 - dos 155 pacientes com outras enteropatias, a determinação de antitransglutaminase tecidual foi realizada nos soros de 103, tendo sido

positiva em oito. Desses 103 pacientes, 54 foram submetidos à biópsia intestinal (13 sem alterações histológicas, 26 com histologia com hipotrofia grau I, oito com hipotrofia grau II e sete com hipotrofia grau III).

Dos pacientes com alterações histológicas, quatro apresentaram anticorpos antitransglutaminase positivos. Dois tinham histologia com hipotrofia grau II e tiveram todos os outros marcadores negativos. Um apresentava hipotrofia grau I, com AAECO positivo na diluição 1:2,5, com padrão de leitura de imunofluorescência compatível com músculo liso e resultado negativo na diluição 1:40. Esse paciente apresentou resultado positivo para AGAG. Uma paciente mostrou hipotrofia grau III, com AGAA e AGAG positivos, apenas anticorpos IgA antiendomísio (AAE) negativos. Ela foi colocada em dieta isenta de glúten, sem melhora. Foi acompanhada em outro serviço.

A TAB. 2 mostra média, mediana, desvio-padrão, mínimo e máximo das leituras das densidades ópticas das determinações dos anticorpos realizados pela técnica ELISA nos três grupos avaliados.

TABELA 2

Comparação das leituras das densidades ópticas da determinação dos anticorpos IgA e IgG antigliadina e IgA antitransglutaminase dos grupos com e sem doença celíaca

Marcadores sorológicos	Densidade óptica (nm)	Grupo 1 Doença celíaca	Grupo 2 Sem queixas gastrointestinal	Grupo 3 Com outras enteropatias	p
.1.1.1.1	Média	0,278	0,008	0,011	<0,001
	A Mediana	0,211	0,003	0,004	
	G Desvio-padrão	0,287	0,014	0,023	
	A (Mínimo–Máximo)	(0,000–1,149)	(0,000–0,097)	(0,000–0,241)	
AGAG	Média	0,343	0,038	0,051	<0,001
	Mediana	0,315	0,022	0,030	
	Desvio-padrão	0,208	0,051	0,066	
	(Mínimo–Máximo)	(0,000–1,090)	(0,000–0,371)	(0,000–0,341)	
ATGT	Média	0,309	0,010	0,010	<0,001
	Mediana	0,239	0,008	0,006	
	Desvio-padrão	0,278	0,010	0,016	
	(Mínimo–Máximo)	(0,001–1,054)	(0,001–0,044)	(0,000–0,118)	

A diferença das densidades ópticas entre os grupos foi significativa. Os pacientes com doença celíaca apresentaram leitura sempre mais alta para os três marcadores sorológicos.

Os GRAF. 1 e 2 mostram as leituras das densidades ópticas nos três grupos analisados para os anticorpos classes IgA e IgG antigliadina.

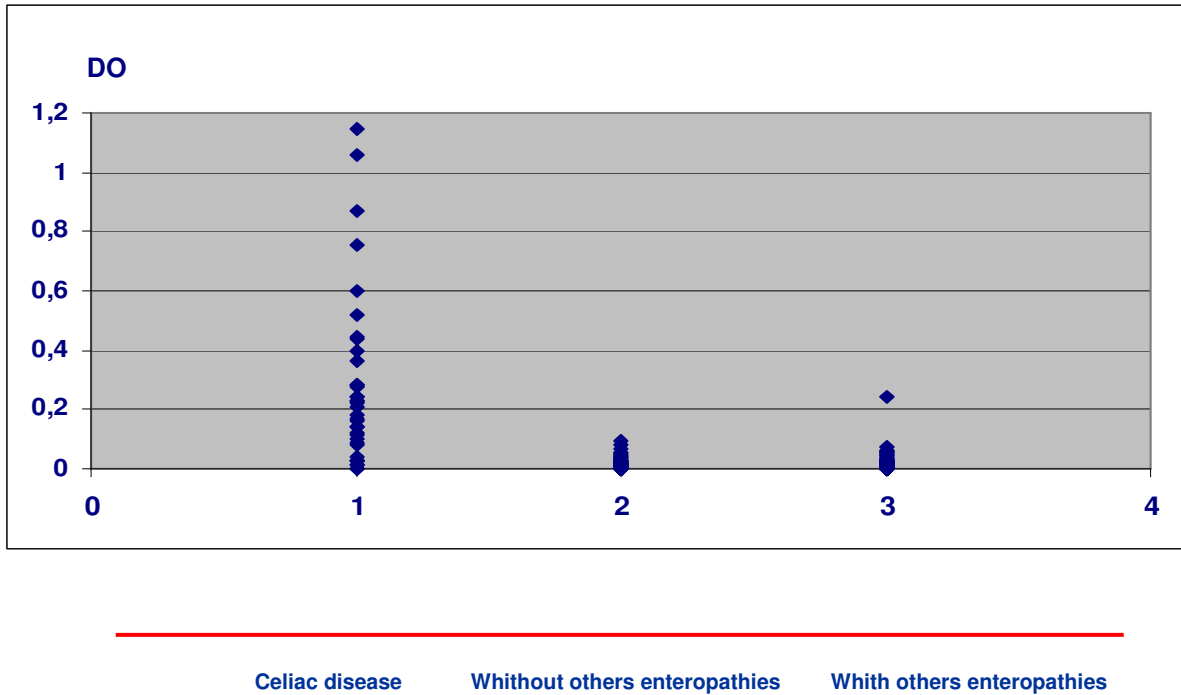


GRÁFICO 1 – Comparação das densidades ópticas (DO) dos anticorpos da classe IgA antigliadina dos pacientes com e sem doença celíaca.

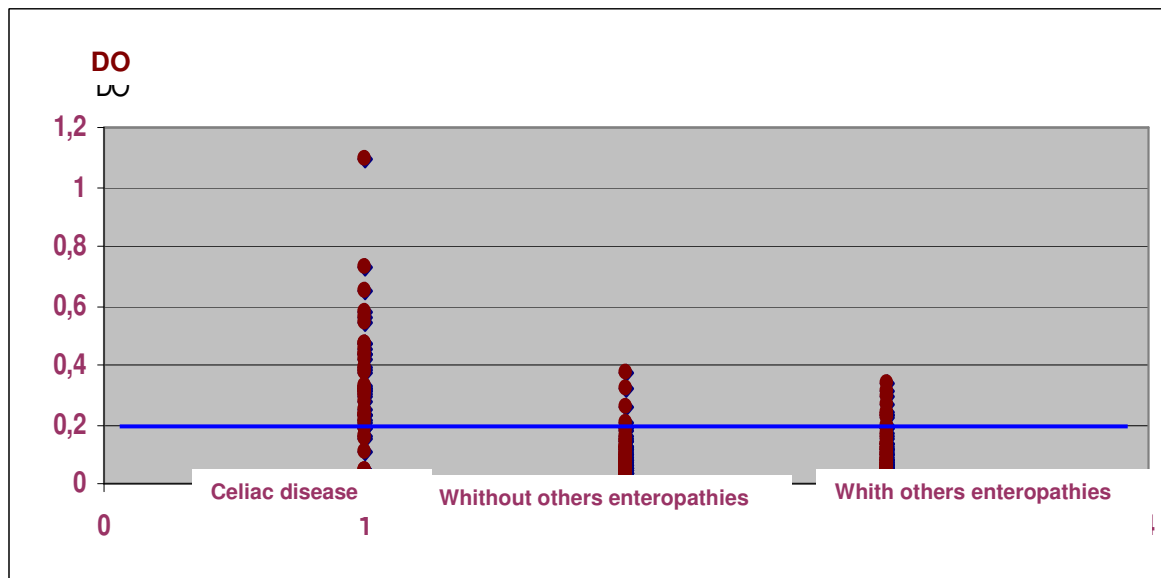


GRÁFICO 2 – Comparação das leituras das densidades ópticas (DO) dos anticorpos da classe IgG antigliadina dos pacientes com e sem doença celíaca.

O GRAF. 3 mostra a leitura das densidades ópticas nos três grupos estudados para a determinação de anticorpos da classe IgA antitransglutaminase tecidual.

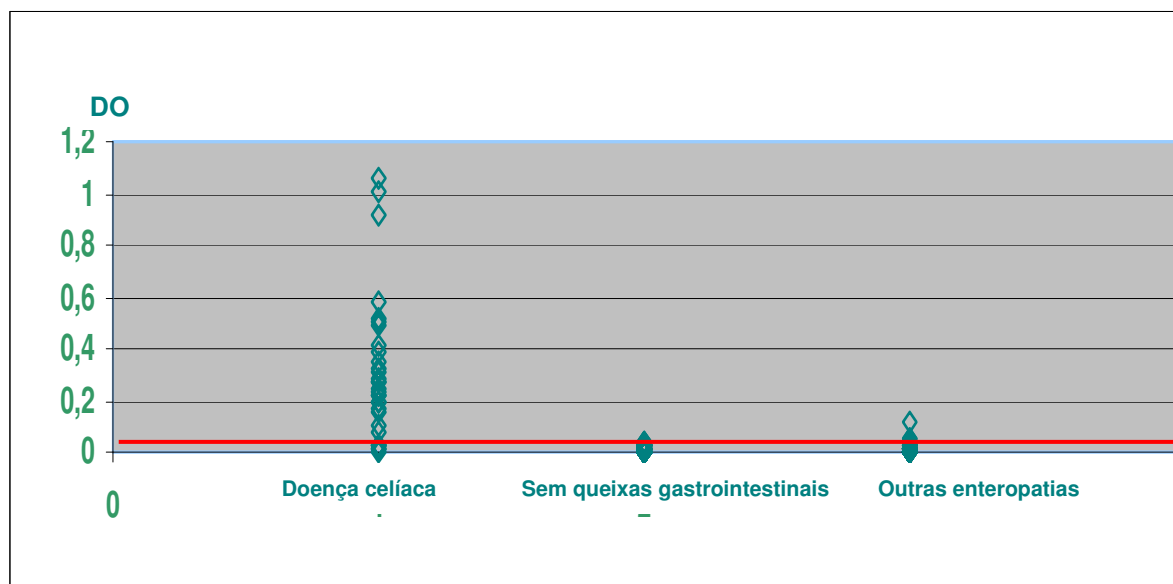


GRÁFICO 3 – Comparação das leituras das densidades ópticas (DO) dos anticorpos da classe IgA antitransglutaminase tecidual dos pacientes com e sem doença celíaca.

Verifica-se, nos gráficos apresentados, grande dispersão de valores para o grupo 1 para os três marcadores, com valores que variaram de 0,000 a 1,040nm. A maioria, entretanto, permaneceu acima da linha de ponto de corte.

Em relação ao grupo 2, houve sobreposição de valores para os anticorpos IgA antitransglutaminase e antigliadina. O mesmo não aconteceu em relação à IgG antigliadina, que teve dispersão mais ampla devido ao grande número de pacientes com resultados falsos-positivos. De forma mais acentuada, a situação foi idêntica em relação ao grupo 3, com menor dispersão para os anticorpos IgA antitransglutaminase e antigliadina e grande dispersão para os anticorpos IgG antigliadina.

5.2.3 Anticorpos antiendomísio em cordão umbilical humano

Os anticorpos antiendomísio em cordão umbilical humano foram determinados em 33 pacientes do grupo 1, em 169 do grupo 2 e em 110 do grupo 3.

- Grupo 1 - dos 37 pacientes com diagnóstico histológico de doença celíaca, foi realizada a determinação de anticorpos antiendomísio em cordão umbilical humano, no soro de 33, com biópsia intestinal apresentando hipotrofia grau IV. Destes, quatro foram negativos na diluição 1:40, sendo que três foram positivos na diluição 1:2,5, mas apresentaram padrão de leitura de fluorescência compatível com músculo liso. Apenas um foi negativo nessa diluição.
- Grupo 2 - dos 208 pacientes, foi realizada em soro de 169 a determinação dos anticorpos classe IgA antiendomísio utilizando-se como substrato cordão umbilical humano, dos quais 24 foram submetidos à biópsia, sendo observada histologia jejunal normal em 21, hipotrofia grau 1 em dois e hipotrofia grau 2 em um. Todos, com e sem biópsia, apresentaram resultados negativos para anticorpos classe IgA antiendomísio.
- Grupo 3 - dos 155 pacientes com outras enteropatias, foi realizado o exame para identificação de anticorpos da classe IgA antiendomísio, utilizando-se como substrato cordão umbilical humano em 110. Destes, 69 foram submetidos à biópsia intestinal, que foi considerada normal em 21, hipotrofia grau I em 31, hipotrofia grau II em nove e hipotrofia grau III em oito. Todos, com e sem biópsia, apresentaram resultados negativos para anticorpos classe IgA antiendomísio.

5.2.4 Anticorpos antiendomísio em esôfago de macaco

Os anticorpos antiendomísio em esôfago de macaco foram determinados em 35 pacientes do grupo 1, 172 do grupo 2 e em 115 do grupo 3.

- Grupo 1 - dos 37 pacientes, realizou-se a determinação de anticorpos antiendomísio em esôfago de macaco no soro de 35, todos com biópsia intestinal com hipotrofia grau IV. Quatro apresentaram resultados negativos, sendo três positivos na diluição 1:2,5, mas com padrão de leitura de fluorescência compatível com músculo liso. Apenas um foi negativo nessa diluição.
- Grupo 2 - dos 208 pacientes desse grupo, foi realizada a determinação de anticorpos antiendomísio, em esôfago de macaco, em soro de 172 pacientes, sendo 24 submetidos à biópsia intestinal, que foi considerada normal em 21, com hipotrofia grau I em dois e hipotrofia grau II em um. Todos, com e sem biópsia, apresentaram resultados negativos para anticorpos classe IgA antiendomísio.
- Grupo 3 - dos 155 pacientes, foi realizada no soro de 115 a determinação dos anticorpos antiendomísio utilizando-se como substrato o esôfago de macaco. Destes, 63 foram submetidos à biópsia intestinal, considerada normal em 19, hipotrofia grau I em 28, hipotrofia grau II em oito e hipotrofia grau III em oito. Todos, com e sem biópsia, apresentaram resultados negativos para anticorpos classe IgA antiendomísio.

As FIG. 3 e 4 mostram o padrão de leitura dos resultados das imunofluorescência indireta positiva e negativa para o endomísio no aumento de 250 vezes.

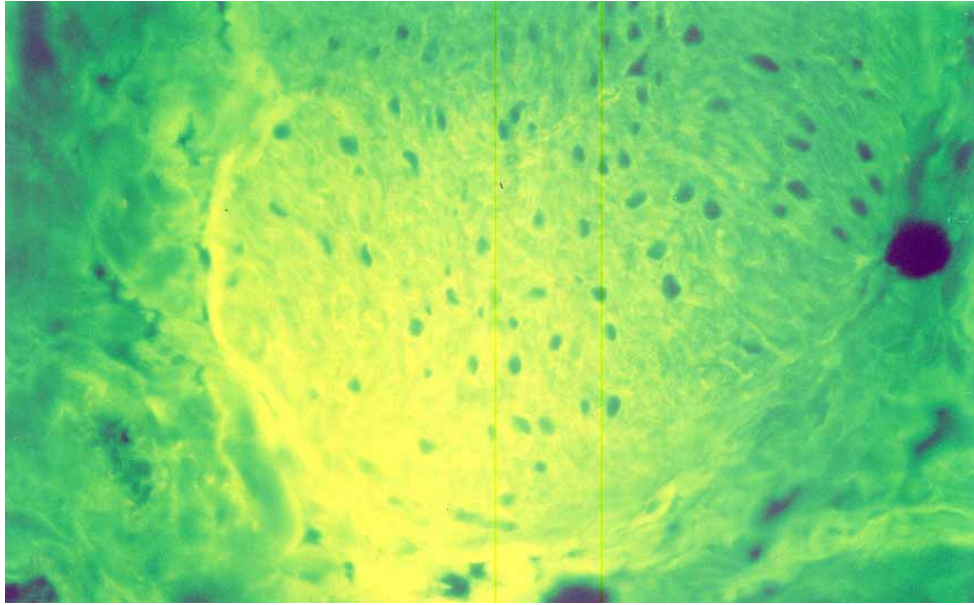


FIGURA 3 – Imunofluorescência negativa (grande aumento).

Na FIG. 3 não se percebe a definição das células musculares do esôfago de macaco, observando-se com clareza apenas os núcleos, sem um contorno preciso do citoplasma.

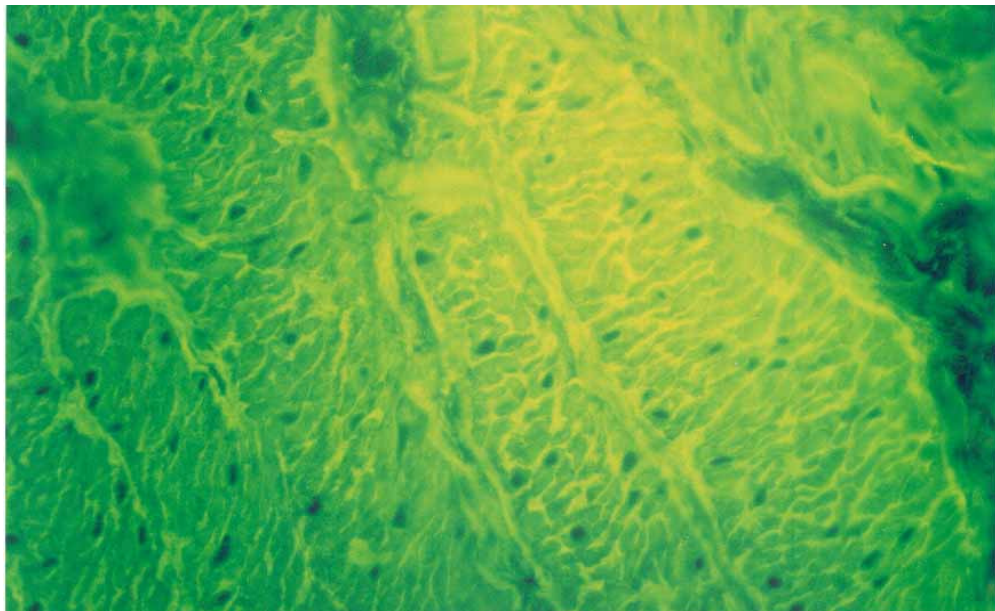


FIGURA 4 – Imunofluorescência positiva (grande aumento).

A FIG. 4 mostra a definição das células musculares do esôfago de macaco, com fluorescência em volta do citoplasma.

Os GRAF. 4 e 5 resumem os resultados da determinação dos anticorpos antiendomísio nos três grupos estudados.

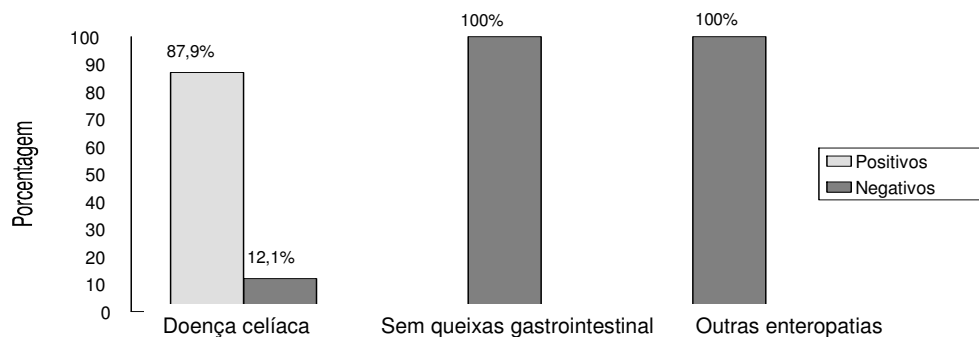


GRÁFICO 4 – Resultados positivos e negativos da determinação dos anticorpos antiendomísio em cordão umbilical humano para os pacientes com e sem doença celíaca.

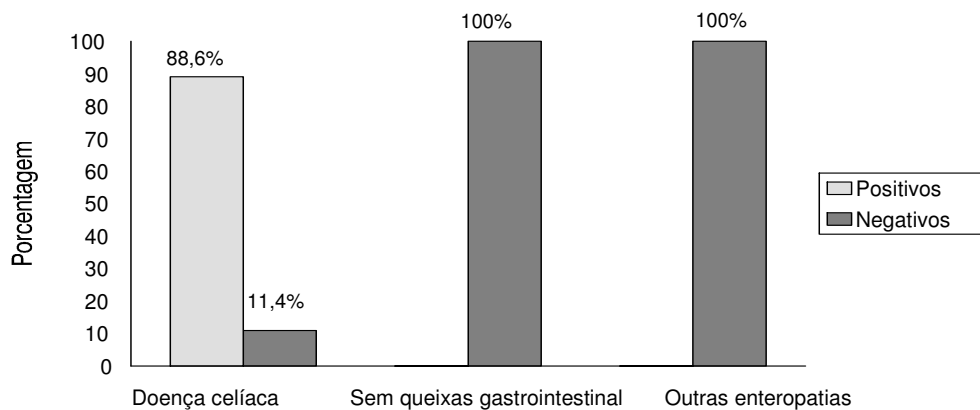


GRÁFICO 5 – Resultados positivos e negativos da determinação dos anticorpos antiendomísio em esôfago de macaco para os pacientes com e sem doença celíaca.

Os GRAF. 4 e 5 mostram que os pacientes sem queixas gastrointestinais e aqueles com outras enteropatias não apresentaram a determinação dos anticorpos antiendomísio positivos, seja utilizando substrato esôfago de macaco ou cordão umbilical humano.

Quando analisados os anticorpos antigliadina dos 37 pacientes com biópsia intestinal compatível com doença celíaca, 30 eram positivos para IgA (s = 81,1%) e 33 para IgG (s = 89,2%). Dos 31 soros de pacientes analisados para ATGT, 26 eram positivos (s = 83,8%). Para antiendomísio em cordão umbilical humano, dos 33 analisados 29 eram positivos (s = 87,9%) e dos 35 analisados em esôfago de macaco 31 eram positivos (s = 88,6%).

Dos pacientes sem queixas gastrointestinais, 208 foram avaliados para anticorpos antigliadina, sendo 10 positivos e 198 negativos para AGAA e AGAG (e = 95,2%). Dos 156 avaliados para ATGT, cinco foram positivos e 151 negativos (e = 96,8). Dos 169 avaliados para AAECO, todos foram negativos (e = 100,0%), o mesmo ocorrendo com os 172 avaliados para AAEEM.

Dos 155 pacientes com outras enteropatias avaliados para AGAA, nove foram positivos (6,0%) e 146 negativos (94,0%). Dos 155 avaliados para AGAG, 14 foram positivos (9,0%) e 141 negativos (91,0%). Dos 103 avaliados para ATGT, oito foram positivos (6,8%) e 95 negativos (92,4%). Foram avaliados 110 pacientes para AAECO e 115 para AAEEM, tendo sido todos negativos (100,0%).

A TAB. 3 mostra os resultados obtidos com as determinações dos anticorpos IgA e IgG antigliadina, IgA transglutaminase e antiendomísio em esôfago de macaco e cordão umbilical humano nos três grupos de pacientes, todos submetidos à biópsia intestinal.

TABELA 3
Resultado das determinações dos anticorpos classes IgG e IgA antigliadina, classe IgA antitransglutaminase, classe IgA antiendomísio em cordão umbilical humano e esôfago de macaco, nos pacientes com biópsia intestinal, com doença celíaca (grupo 1), sem queixas gastrointestinais (grupo 2) e com outras enteropatias (grupo 3)

	AGAA		AGAG		ATGT		AAECO		AAEEM	
	Pos/n (%)	Neg/n (%)	Pos/n (%)	Neg/n (%)	Pos/n (%)	Neg/n (%)	Pos/n (%)	Neg/n (%)	Pos/n (%)	Neg/n (%)
Grupo 1	30/37 (81,1)	7/37 (18,9)	33/37 (89,2)	4/37 (10,8)	26/31 (83,8)	5/31 (16,2)	29/33 (87,9)	4/33 (12,1)	31/33 (88,6)	4/35 (11,4)
Grupo 2	1/24 (4,2)	23/24 (95,8)	1/24 (4,2)	23/24 (95,8)	2/21 (9,5)	19/21 (90,5)	0/22 (0,0)	22/22 (100,0)	0/24 (0,0)	24/24 (100,0)
Grupo 3	6/69 (8,7)	63/69 (91,3)	12/69 (17,4)	57/69 (82,6)	6/48 (12,5)	42/48 (87,5)	0/60 (0,0)	60/60 (100,0)	0/63 (0,0)	63/63 (100,0)

Pos/n – número de positivos/número total de pacientes avaliados; Neg/n – número de negativos/número total de pacientes avaliados.

Na TAB. 4 encontram-se os resultados de sensibilidades, especificidades, valores preditivos positivo e negativo dos marcadores sorológicos nos pacientes com biópsia intestinal, dos grupos de doença celíaca não tratada e do grupo dos pacientes sem queixas gastrointestinais.

TABELA 4
 Resultados de sensibilidades, especificidades e valores preditivos da
 determinação dos anticorpos classes IgA e IgG antigliadina, IgA
 antitransglutaminase (ATGT), IgA antiendomísio em cordão umbilical humano
 (AAECO) e esôfago de macaco (AAEEM) dos pacientes com biópsia intestinal,
 com doença celíaca e sem queixas gastrointestinais

	AGAA	AGAG	ATGT	AAECO	AAEEM
Sensibilidade (%)	81,1	89,2	83,8	87,9	88,6
IC (95%)	64,3 – 91,4	73,6 – 96,5	65,5 – 93,9	70,9 – 96,0	72,3 – 96,3
Especificidade (%)	95,8	95,8	90,5	100,0	100,0
IC (95%)	76,9 – 99,8	76,9 – 97,1	68,2 – 98,3	87,0 – 100	87,7 – 100
VPP (%)	96,8	97,1	92,9	100,0	100,0
IC (95%)	81,5 – 99,8	82,9 – 99,8	75,0 – 98,8	85,4 – 100	86,3 – 100
VPN (%)	76,7	85,2	79,2	89,2	89,7
IC (95%)	57,3 – 89,4	65,4 – 95,1	57,3 – 92,1	73,6 – 96,5	74,8 – 96,7

O mesmo cálculo foi feito para os pacientes com e sem biópsia intestinal, nos três grupos, com doença celíaca, com outras enteropatias e sem queixas gastrointestinais para avaliação de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo. As TAB. 5 e 6 resumem os resultados encontrados.

TABELA 5

Resultado das determinações dos anticorpos classes IgG e IgA antigliadina, classe IgA antitransglutaminase, classe IgA antiendomísio em cordão umbilical humano e esôfago de macaco, nos pacientes com e sem biópsia intestinal, com doença celíaca (grupo 1), sem queixas gastrointestinais g(grupo 2) e com outras enteropatias (grupo 3)

	AGAA		AGAG		ATGT		AAECO		AAEEM	
	Pos/n (%)	Neg/n (%)	Pos/n (%)	Neg/n (%)	Pos/n (%)	Neg/n (%)	Pos/n (%)	Neg/n (%)	Pos/n (%)	Neg/n (%)
Grupo 1	30/37 (81,1)	7/37 (18,9)	33/37 (89,2)	4/37 (10,8)	26/31 (83,8)	5/31 (16,2)	29/33 (87,9)	4/33 (12,1)	31/35 (88,6)	4/35 (11,4)
Grupo 2	10/208 (4,8)	198/208 (95,2)	10/208 (4,8)	198/208 (95,2)	5/156 (3,2)	151/156 (96,8)	0/169 (0,0)	169/169 (100,0)	0/172 (0,0)	172/172 (100,0)
Grupo 3	9/155 (6,0)	146/155 (94,0)	14/155 (9,0)	141/155 (91,0)	8/103 (6,8)	95/103 (92,2)	0/110 (0,0)	110/110 (100,0)	0/115 (0,0)	115/115 (100,0)

Pos/n – número de positivos/número total de pacientes avaliados, Neg/n – número de negativos/número total de pacientes avaliados.

TABELA 6

Resultados de sensibilidades, especificidades e valores preditivos da determinação dos anticorpos classes IgA e IgG antigliadina, IgA antitransglutaminase (ATGT), IgA antiendomísio em cordão umbilical humano (AAECO) e esôfago de macaco (AAEEM) dos pacientes com e sem biópsia intestinal, com doença celíaca e sem queixas gastrointestinais

	AGAA	AGAG	ATGT	AAECO	AAEEM
Sensibilidade (%)	81,1	89,2	83,8	87,9	88,6
IC (95%)	64,3 – 91,4	73,6 – 96,3	65,5 – 93,9	70,9 – 96,0	72,3 – 96,3
Especificidade(%)	95,2	95,2	96,8	100,0	100,0
IC (95%)	91,1 – 97,6	91,1 – 97,3	92,3 – 98,8	97,2 – 100	97,3 – 100
VPP (%)	75,0	76,7	83,9	100,0	100,0
IC (95%)	58,5 – 86,8	61,0 – 87,7	65,5 – 93,9	85,4 – 100	86,3 – 100
VPN (%)	96,6	98,0	96,8	97,7	97,7
IC (95%)	92,8 – 98,5	94,7 – 99,4	92,3 – 98,8	93,8 – 99,3	93,9 – 99,3

A TAB. 7 estabelece comparação entre sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo nos grupos dos pacientes com biópsia e com e sem biópsia intestinal.

TABELA 7
 Comparação entre as sensibilidades, especificidades, valores preditivos dos marcadores sorológicos entre os pacientes com biópsia e aqueles com e sem biópsia intestinal

	AGAA		AGAG		ATGT		AAECO		AAEEM	
	Com biópsia	Com e sem biópsia	Com biópsia	Com e sem biópsia	Com biópsia	Com e sem biópsia	Com biópsia	Com e sem biópsia	Com biópsia	Com e sem biópsia
Sens.	81,1%	81,1%	89,2%	89,2%	83,8%	83,8%	87,9%	87,9%	88,6%	88,6%
IC 95%	64,3–91,4	64,3–91,4	73,6–96,5	73,6–96,3	65,5–93,9	65,5–93,9	70,9–96,0	70,9–96,0	72,3–96,3	72,3–96,3
Espec.	95,8%	95,2%	95,8%	95,2%	90,5%	96,8%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
IC 95%	76,9–99,8	91,1–97,6	76,9–99,8	91,1–97,3	68,2–98,3	92,3–98,8	87,0–100,0	97,2–100,0	87,7–100,0	97,3–100,0
VPP	96,8%	75,0%	97,1%	76,7%	92,9%	83,9%	100,0%	100,0,0%	100%	100,0%
IC 95%	81,5–99,8	58,5–86,8	82,9–99,8	61,0–87,7	75,0–98,8	65,5–93,9	85,4–100,0	85,4–100,0	86,3–100,0	86,3–100,0
VPN	76,7%	96,6%	85,2%	98,0%	79,2%	96,8%	89,2%	97,7%	89,7%	97,7%
IC 95%	57,3–89,4	92,8–98,5	65,4–95,1	94,7–99,4	57,3–92,1	92,3–98,8	73,6–96,5	93,8–99,3	74,8–96,7	93,9–99,3

Sens – sensibilidade, Espec – especificidade, IC – intervalo de confiança, VPP – valor preditivo positivo, VPN – valor preditivo negativo.

A análise estatística multivariada dos componentes principais foi descrita por Pearson (1901 *apud* SAMPAIO, 1993) e desenvolvida por Hotelling (1933 *apud* SAMPAIO, 1993). Ela permite que variáveis sejam analisadas concomitantemente, possibilitando avaliar a relação existente entre elas e, através de modelo gráfico, observar o comportamento de cada uma em relação às demais. Normalmente, a análise é feita através dos três primeiros componentes principais – o primeiro contendo um valor mais alto de inércia e os demais definidos seqüencialmente no sentido decrescente. Juntos devem somar mais de

70% de inércia, segundo critério citado por Sampaio (1993). O resultado é observado em um gráfico de três dimensões correspondentes aos três primeiros componentes principais. A inércia define o percentual da variação existente na nuvem de pontos em um sistema p dimensional que o sistema tridimensional eleito consegue justificar, ou seja, um alto valor de inércia mostra que a relação entre as variáveis estudadas está bem definida. Variáveis situadas em um mesmo quadrante e próximas entre si são fortemente associadas. Variáveis situadas em quadrantes diferentes, mas não opostos, não estão correlacionadas e em quadrantes opostos são inversamente associadas.

A análise estatística multivariada dos componentes principais foi realizada em dois grupos de pacientes, nos quais foram realizadas as determinações dos cinco marcadores sorológicos (AGAA, AGAG, ATGT, AAEEM, AAECO). O primeiro grupo com 49 pacientes: 18 sem alteração histológica na biópsia intestinal, sem queixa gastrointestinal e 31 com doença celíaca não tratada, que apresentavam hipotrofia grau IV na biópsia intestinal, dicotomizados em pacientes com e sem DC, com inércia de 94%. O segundo grupo com 283 pacientes: 252 sem queixas gastrointestinais e com outras enteropatias, com e sem biópsia intestinal e 31 com DC não tratada, também dicotomizados em com e sem doença celíaca, com inércia de 93%. Em ambos os grupos a idade máxima estudada foi de 21,4 anos. A TAB. 8 resume os resultados das correlações entre os marcadores sorológicos e a enteropatia e dos marcadores sorológicos entre si, para o grupo dos 283 pacientes.

TABELA 8

Correlação entre os marcadores sorológicos AGAA, AGAG, ATGT, AAECO, AAEEM, a doença celíaca sem queixas gastrointestinais e outras enteropatias, com e sem biópsia intestinal, grupo dos 283 pacientes.

	AGAA	AGAG	ATGT	AAECO	AAEEM	DC
AGAA	1,00					
AGAG	0,66	1,00				
ATGT	0,54	0,52	1,00			
AAECO	0,67	0,65	0,74	1,00		
AAEEM	0,67	0,65	0,74	1,00	1,00	
DC	0,69	0,66	0,72	0,94	0,94	1,00

A TAB. 9 mostra a correlação entre os marcadores sorológicos e a enteropatia e dos marcadores sorológicos entre si no grupo dos 49 pacientes com biópsia intestinal, com diagnóstico de doença celíaca e sem a doença.

TABELA 9

Correlação entre os marcadores sorológicos AGAA, AGAG, ATGT, AAECO, AAEEM e doença celíaca no grupo de 49 pacientes com e sem doença celíaca

	AGAA	AGAG	ATGT	AAECO	AAEEM	DC
AGAA	1,00					
AGAG	0,80	1,00				
ATGT	0,68	0,63	1,00			
AAECO	0,72	0,75	0,79	1,00		
AAEEM	0,72	0,75	0,79	1,00	1,00	
DC	0,78	0,79	0,76	0,88	0,88	1,00

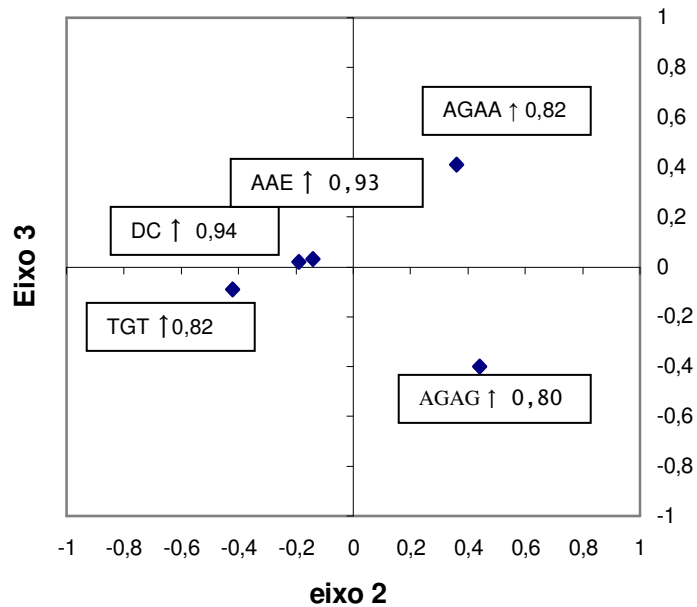
Quando comparados os dois grupos (n = 283 e n = 49), observou-se que, em relação à DC, houve piora da correlação com AGAA, AGAG e ATGT e melhora em relação ao AAE. No grupo dos 49 pacientes, dos 18 pacientes sem queixas gastrointestinais, um apresentou AGAA positivo, um AGAG positivo e um ATGT positivo. Dos 31 pacientes com diagnóstico histológico de doença celíaca, cinco apresentaram AGAA negativos, três AGAG negativos, cinco ATGT negativos e dois anticorpos IgA antiendomísio (AAE) negativos. Apesar do número de falsos-negativos ter sido igual para AGAA e ATGT, o AGAA se opôs à doença celíaca, o que não ocorreu com o ATGT.

Os valores da correlação de cada variável estudada (doença celíaca e os marcadores sorológicos AGAA, AGAG, ATGT, AAECO e AAEEM) com cada um dos três eixos analisados, para o grupo dos 283 pacientes com e sem biópsia intestinal dos três grupos analisados, podem ser observados na TAB. 10 e no GRAF. 6.

TABELA 10
Correlação entre doença celíaca, AGAA, AGAG, ATGT, AAECO e AAEEM nos eixos 1, 2 e 3 para o grupo dos 283 pacientes

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3
.1.1.1.2 AGAA	0,82	0,36	0,41
AGAG	0,80	0,44	0,40
ATGT	0,82	- 0,42	- 0,09
AAEEM	0,93	- 0,19	0,02
AAECO	0,93	-0,19	0,02
DC	0,94	- 0,14	0,03

Devido à semelhança dos resultados da determinação dos anticorpos antiendomísio utilizando os dois substratos (cordão umbilical humano e esôfago de macaco), não houve distinção entre os dois nos resultados, tanto na correlação como na representação gráfica, havendo sobreposição dos valores.



As coordenadas das mesmas no eixo 1 estão representadas após a seta ↑.

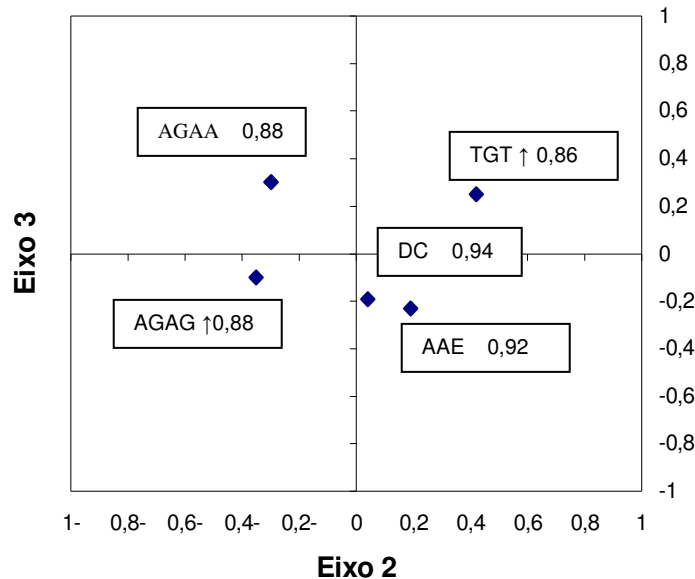
GRÁFICO 6 – Variáveis anticorpos IgA anti gliadina (AGAA), anticorpos IgG anti gliadina (AGAG), anticorpos IgA anti transglutaminase tecidual (ATGT) e anticorpos IgA anti endomísio em cordão umbilical humano e esôfago de macaco (AAE) e doença celíaca (DC) nos eixos fatoriais 2 e 3 para o universo dos 283 pacientes com diagnóstico de doença celíaca, sem queixas gastrointestinais e com outras enteropatias, com e sem biópsia intestinal.

Os valores da correlação de cada variável estudada (doença celíaca e os marcadores sorológicos AGAA, AGAG, ATGT, AAECO e AAEEM) com cada um dos três eixos analisados para o grupo dos 49 pacientes com biópsia intestinal dos dois grupos analisados (doença celíaca, sem queixas gastrointestinais) podem ser observados na TAB. 11 e GRAF. 7.

TABELA 11

Correlação entre doença celíaca, AGAA, AGAG, ATGT, AAECO e AAEEM nos eixos 1, 2 e 3 para o grupo dos 49 pacientes com doença celíaca e sem queixas gastrointestinais clínica e histológica

	Eixo 1	Eixo 2	Eixo 3
.1.1.1.3 AGAA	0,88	-0,30	0,30
AGAG	0,88	-0,35	- 0,10
ATGT	0,86	0,42	0,25
AAEEM	0,92	0,19	- 0,23
AAECO	0,92	0,19	- 0,23
DC	0,94	0,04	- 0,19



As coordenadas das mesmas no eixo 1 estão representadas após a seta ↑.

GRÁFICO 7 – Variáveis anticorpos IgA antigliadina (AGAA), anticorpos IgA antigliadina (AGAG), anticorpos IgA antitransglutaminase tecidual (ATGT) e anticorpos IgA antiendomísio em cordão umbilical humano e esôfago de macaco (AAE) e doença celíaca (DC) nos eixos fatoriais 2 e 3 para o universo de 49 pacientes com diagnóstico de doença celíaca (biópsia hipotrofia grau IV) e sem queixas gastrointestinais (biópsia considerada normal).

No grupo dos 49 pacientes houve oposição entre AGAA e DC, entre AGAA e AAE e entre AGAG e ATGT e no grupo dos 283 pacientes entre AGAG e DC, entre AGAG e AAE e entre AGAA e ATGT.

Não houve oposição entre AGAA e AGAG, entre AAE e DC, entre ATGT e DC e entre ATGT e AAE nos dois grupos analisados.

Os resultados dos exames sorológicos dos 31 pacientes com doença celíaca mostram que AGAA e AGAG discordaram em dois pacientes. O AGAA e o ATGT foram discordantes em quatro pacientes e entre AGAG e ATGT em seis.

Nos 18 pacientes sem queixas gastrointestinais e com biópsia normal, um paciente foi positivo para AGAA, um para AGAG, um para ATGT e nenhum para AAE. Nenhum foi positivo para mais de um marcador.

Quando analisado o grupo dos 283 pacientes, a disposição dos marcadores foi alterada pela entrada de mais um grupo (outras enteropatias), no qual AGAG apresentou-se positivo em maior número de pacientes que ATGT e AGAA e pelo grupo de pacientes que não apresentaram queixas gastrointestinais, mas que não foram submetidos à biópsia intestinal. Desse total, 252 foram colocados como não doentes para análise, sendo que 37 apresentaram algum marcador sorológico positivo: AGAA positivo em 13, ATGT em 12, AGAG em 20 e AAE em nenhum.

Dos 37, AGAA concordou com AGAG em 15 pacientes (nove negativos e seis positivos), com ATGT em 13 (todos negativos) e AAE em 24 (todos negativos). O AGAG concordou com ATGT em sete pacientes (seis negativos e um positivo) e o ATGT concordou com AAE em 24 (todos negativos).

Os resultados das associações entre os marcadores sorológicos no grupo dos 283 pacientes, em que foram realizadas as determinações de todos os marcadores sorológicos, mostraram que nenhum marcador sorológico isolado foi adequado para se obterem sensibilidade e especificidade de 100,0%. As melhores associações de marcadores, nesse universo de 283 pacientes

classificados com ou sem doença celíaca, são AGAA e AAE; AGAA, AGAG e AAE; AGAG e AAE; AGAG, ATGT e AAE, com sensibilidades e especificidades de 100,0%.

Essas associações deverão ser feitas em paralelo, isto é, todos os exames ao mesmo tempo, considerando-se que qualquer resultado positivo deverá ser tido como evidência de doença, pela necessidade de se aumentar a sensibilidade desses marcadores para que a biópsia intestinal seja realizada apenas nos pacientes com grande possibilidade de apresentar DC.

A TAB. 12 resume os resultados obtidos.

TABELA 12

Avaliação da associação dos marcadores sorológicos no universo de 283 pacientes com diagnóstico histológico de doença celíaca e nos pacientes com e sem queixas gastrointestinais

Marcadores sorológicos AGAA, AGAG, ATGT e AAE	Pacientes com diagnóstico de DC(n = 31)*	Marcadores sorológicos AGAA, AGAG, ATGT e AAE	Pacientes com e sem queixas gastrointestinais (n = 252)**
Todos positivos	20	Todos negativos	215
Apenas AGAA negativo	2	Apenas AGAA positivo	7
Apenas AGAG negativo	1	Apenas AGAG positivo	13
Apenas ATGT negativo	2	Apenas ATGT positivo	10
Apenas AAE negativo	1	Apenas AAE positivo	0
AGAA e AGAG negativos	2	AGAA, AGAG positivos	5
AGAA e ATGT negativos	1	AGAA, ATGT positivos	0
AGAA e AAE negativos	0	AGAA e AAE positivos	0
AGAA + AGAG + ATGT negativos	0	AGAA + AGAG + ATGT positivos	1
AGAA + AGAG + AAE negativos	0	AGAA + AGAG + AAE positivos	0
AGAG + ATGT negativos	0	AGAG + ATGT positivos	1
AGAG + AAE negativos	0	AGAG + AAE positivos	0
AGAG + ATGT + AAE negativos	0	AGAG + ATGT + AAE positivos	0
ATGT + AAE negativos	1	ATGT + AAE positivos	0
Todos negativos	1	Todos positivos	0

* Não foram realizados os cinco marcadores para seis pacientes

**Não foram realizados os cinco marcadores para 111 pacientes

Dos 31 pacientes com diagnóstico histológico de doença celíaca que realizaram os cinco marcadores sorológicos, 11 apresentaram um ou mais marcadores sorológicos negativo, conforme a TAB. 12. Apenas um foi negativo para os cinco testes realizados. Esse paciente teve o diagnóstico de DC com um ano e cinco meses de idade, apresentou melhora clínica com dieta isenta de glúten, mas não foi realizada a confirmação diagnóstica com biópsia intestinal após o desencadeamento.

Dois pacientes, também com diagnóstico de DC antes de dois anos de idade, apresentaram todos os marcadores sorológicos positivos, com exceção dos anticorpos classe IgA antitransglutaminase. Um deles teve diagnóstico confirmado com o desencadeamento e o outro foi acompanhado até seis anos de idade, não ocorrendo alterações histológicas nas biópsias jejunais realizadas após dois e quatro anos em dieta com glúten. Esse paciente não retornou para acompanhamento clínico subsequente.

Um paciente, com três anos e nove meses, teve apenas os anticorpos IgG e IgA antigliadina positivos. Não houve acompanhamento clínico.

Um outro apresentou AGAA e ATGT negativos e AGAG, AAECO e AAEEM positivos e teve diagnóstico de doença celíaca aos quatro anos de idade, apresentou melhora clínica com dieta isenta de glúten e, após a dieta, a determinação dos anticorpos foi negativa. Não foi feita a confirmação diagnóstica com o desencadeamento e nova biópsia, seguindo-se, portanto, os critérios de

diagnóstico de doença celíaca da Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição de 1990.

Apenas um paciente foi ATGT positivo e endomísio negativo, mas três foram ATGT negativo e endomísio positivo. Este resultado merece avaliação posterior e, como dito anteriormente, pode ser devido a outros auto-antígenos que não a transglutaminase.

As sensibilidades dos anticorpos IgA e IgG anti gliadina para os pacientes com menos de quatro anos de idade foram de 88,0 e 92,0% e para os com mais de quatro anos de idade foram de 64,0 e 82,0%, respectivamente. Em relação aos anticorpos IgA anti endomísio, a sensibilidade foi de 88,0% para as idades até quatro anos e 89,0% para as acima de quatro anos. Houve, portanto, diferença de sensibilidade em relação à idade para a determinação dos anticorpos anti gliadina, o que não ocorreu com a determinação dos anticorpos anti endomísio.

Houve contraposição entre AGAA e ATGT na análise multivariada no grupo dos 283 pacientes, com os marcadores em quadrantes opostos, sugerindo que quando AGAA é positivo, ATGT é negativo e vice-versa. O que se pode observar, pelos resultados analisados, é que o ATGT é positivo em pacientes com mais de 2,6 anos de idade e AGAA é positivo naqueles abaixo de 2,6 anos de idade, havendo, portanto, correlação entre a idade e a sensibilidade desses exames.

Em relação à determinação de IgA sérica dos pacientes, esta só foi realizada quando havia suspeita clínica ou laboratorial da sua deficiência. Um paciente

apresentou anticorpos antigliadina IgG positivo e todos os marcadores de IgA negativos. O paciente foi submetido à biópsia intestinal, que foi compatível com DC, e realizada a determinação de IgA sérica, que foi abaixo dos valores de referência. Após um ano de dieta isenta de glúten, a biópsia intestinal apresentou-se dentro dos limites da normalidade e, após o desencadeamento, piora do padrão histológico, estabelecendo-se o diagnóstico de doença celíaca. Além de doença celíaca, este paciente apresentava também hepatite auto-imune.

Em todos os pacientes que apresentaram anticorpos antigliadina IgG positivo e os outros marcadores negativos, foi realizada a determinação de IgA sérica.

6 DISCUSSÃO

Os resultados dos exames sorológicos para DC variam muito de serviço para serviço. Uma das causas dessas variações a ser considerada é a falta de padronização das técnicas utilizadas e a definição correta de seus valores de referência para população, sexo e idade definidos.

São expressivas as variações dos resultados de sensibilidade e especificidade para a determinação dos anticorpos antigliadina, nos trabalhos publicados.

Observam-se, na literatura, variações de 36,0 a 100,0% para sensibilidade e de 84,0 a 100,0% para especificidade dos anticorpos classe IgA antigliadina. Para os anticorpos da classe IgG antigliadina, a variação de sensibilidade vai de 82,0 a 100,0% e da especificidade de 42,0 a 86,0% (LANE; CLARK; ZONE, 1983; O'FARRELLY; KELLY; FEIGHERY, 1984; RIBES *et al.*, 1986; VOLTA *et al.*, 1986; CALABUIG *et al.*, 1990; McMILLAN *et al.*, 1991). Resultados tão díspares em exames laboratoriais levam a questionar a validade dos valores extremos.

Hill *et al.* (2005), em revisão realizada sobre doença celíaca, recomendaram exames sorológicos para o diagnóstico da doença em pacientes com sintomas gastrointestinais persistentes, naqueles que apresentam alguma alteração compatível com a doença: como dermatite herpetiforme, alteração do esmalte dentário, osteoporose, baixa estatura, retardo da puberdade e anemia ferropriva, refratária ao tratamento com ferro e, também, para os pacientes que apresentam

alguma condição associada à doença, como diabetes *mellitus* insulino-dependente, parentes de primeiro grau de pacientes com doença celíaca, tireoidite auto-imune, entre outras. Eles consideraram que a avaliação dos resultados sorológicos da literatura é dificultada pela falta de padronização das técnicas, pela diversidade das populações avaliadas e pela forma de definição histológica da doença (número, tamanho e local da biópsia intestinal). Os autores constataram, em dados da literatura, que a sensibilidade dos anticorpos classe IgA antigliadina variou de 52,0 a 100,0% em crianças e de 65,0 a 100,0% em adultos e a especificidade de 92,0 a 97,0% em crianças e 71,0 a 97,0% em adultos. Os anticorpos classe IgG antigliadina foram similares em relação à sensibilidade, mas bem mais baixos em relação à especificidade, que ficou próxima de 50,0%. A sensibilidade da determinação dos anticorpos antiendomísio variou de 91,0 a 100,0% em crianças e foi de 99,0% em adultos. A sensibilidade para a determinação dos anticorpos antitransglutaminase tecidual, extraída de *Cavia porcellus*, foi de 89,0 a 94,0% e a especificidade de 74,0 a 98,0%. Quando se utilizou a transglutaminase humana, houve melhora dos valores das sensibilidades, que variaram de 96,0 a 100,0%, e das especificidades, de 84,0 a 100,0%. Apesar de considerarem todas as possibilidades de interferências nos resultados dos exames sorológicos, eles indicaram a utilização da determinação dos anticorpos antitransglutaminase para triagem de biópsia intestinal no diagnóstico de doença celíaca.

Tonutti; Visentini; Bizzaro *et al.* (2005) apresentaram dados semelhantes aos de Hill *et al.* (2005), chegando à conclusão que a determinação dos anticorpos antitransglutaminase de *Cavia porcellus* é mais sensível que a de anticorpos

antiendomísio, enquanto que os anticorpos IgA antitransglutaminase humana são mais específicos e tão sensíveis quanto os de *Cavia porcellus*. Eles afirmaram que a determinação dos anticorpos antiendomísio apresenta interferência humana na sua interpretação e dificuldade para ser padronizada.

A avaliação da determinação dos anticorpos classe IgA antigliadina realizada por Johnston *et al.* (2003) mostrou sensibilidade de 76,0% e especificidade de 79,0%. Os exames foram feitos em *kit* comercial (IMMCO). A sensibilidade para os anticorpos antitransglutaminase foi de 86,0% e a especificidade de 84,0%. Os anticorpos antiendomísio utilizando como substrato o esôfago de macaco apresentaram sensibilidade de 90,0% e especificidade de 98,0%. Os autores concluíram que os resultados da determinação dos anticorpos antitransglutaminase tecidual apresentam valor intermediário entre AGA e AAE e que a biópsia intestinal ainda permanece como indispensável para o diagnóstico.

Resultados semelhantes foram encontrados por Laadhar *et al.* (2004) para anticorpos antigliadina, com sensibilidade e especificidade de 88,6 e 64,6% para IgG e de 74,3 e 93,9% para IgA, respectivamente.

No presente estudo, os valores de sensibilidade e especificidade dos anticorpos antigliadina foram de 81,1 e 95,2% para AGAA e 89,2 e 95,2% para AGAG, respectivamente, estando de acordo com a maioria dos trabalhos publicados.

No Brasil, ainda não foi realizada uma padronização para a determinação dos anticorpos antigliadina, mesmo sabendo-se que em países subdesenvolvidos

resultados falsos-positivos para esses marcadores são mais freqüentes. A maior prevalência de enteropatias secundárias à desnutrição, ao supercrescimento bacteriano de intestino delgado e à giardíase resulta em aumento da permeabilidade da mucosa intestinal, que interfere nos resultados dos exames. A utilização, nesses países, de *kits* importados de países desenvolvidos cria um viés de interpretação, pois o ponto de corte é baseado em controles cuja quantidade de anticorpos é menor.

A análise dos componentes principais, no grupo dos 283 pacientes, mostra que a relação entre os anticorpos antigliadina e doença celíaca são compatíveis com os resultados das especificidades dos exames, estando os anticorpos classe IgG antigliadina em posição oposta à enteropatia, o que é justificado quando se observa o número de resultados falsos-positivos (20/252) desse marcador em relação aos pacientes considerados sem doença celíaca. O número de falsos-positivos para AGAA foi de 13/252 e de ATGT de 12/252.

Quando analisado o grupo de 49 pacientes com biópsia considerada normal e aqueles com biópsia considerada padrão celíaco, observou-se contraposição entre AGAA e DC. Nesse grupo, o AGAA foi negativo em seis dos 31 pacientes com doença celíaca, ATGT negativo em cinco, AGAG negativo em quatro e AAE em três. É interessante notar que, mesmo sendo negativo em número praticamente igual de pacientes com biópsia padrão celíaco, o ATGT não se opõe nem à DC nem ao AAE e se opõe ao AGAA em relação ao eixo 2.

Houve oposição, na análise multivariada, entre AGAG e DC e entre AGAA e ATGT no grupo dos 283 pacientes. Os resultados dos marcadores sorológicos explicam a oposição entre DC e AGAG, isto é, o fato de haver marcador positivo para AGAG não significa que o paciente tenha a doença, pois há grande número de pacientes falsos-positivos. A oposição entre AGAA e ATGT pode ser explicada pela idade dos pacientes, estando o ATGT, neste trabalho, mais relacionado aos pacientes com mais de 2,6 anos de idade. Tiberti *et al.* (2003) sugeriram que a resposta imunológica para transglutaminase sofre influência de sexo e idade e do alvo da transglutaminase.

Os anticorpos antiendomísio apresentaram menos variação nos resultados de sensibilidade e especificidade nos trabalhos publicados, apesar da técnica de imunofluorescência indireta sofrer interferência do fator humano na leitura dos resultados. Além desse fator, há variações nas diluições tanto do soro como do conjugado, no tipo de substrato utilizado e no ponto de corte para considerar-se a leitura como positiva. Há trabalhos, como o de Dubel *et al.* (1996), que mostram sensibilidade para anticorpos antiendomísio de 56,0% e especificidade de 100,0%, cujo resultado pode ser explicado pela diluição utilizada, de 1:20, para considerar-se o exame positivo.

Este resultado não é o que se encontra habitualmente na literatura. Há consenso em que a sensibilidade e a especificidade para esses marcadores variam de 90 a 100%, inclusive no Brasil (Kotze *et al.*, 2001).

Apesar dessa constância de resultados, as diluições utilizadas para considerar-se o exame positivo são várias: para Dubel *et al.* (1996), a leitura da imunofluorescência indireta é considerada positiva com o soro na diluição de 1:20; para Leon *et al.* (2001) na diluição de 1:10; para Shamir *et al.* (2002) e Kotze *et al.* (2003) 1:2,5; para Johnston *et al.* (2003) na diluição de 1:5.

A diluição do soro para a determinação dos anticorpos antiendomíseo é fator decisivo para a definição dos resultados. Entretanto, os diversos autores apresentaram resultados concordantes em relação à sensibilidade e especificidade. Ghedira *et al.* (2001) constataram sensibilidade de 86,0% e especificidade de 100,0% na diluição 1:50; Kotze *et al.* (2001) referenciaram sensibilidade de 100,0% e especificidade de 99,3%, na diluição 1:2,5; Carroccio *et al.* (2002) descreveram sensibilidade de 96,0% e especificidade de 100%, não informando a diluição utilizada para que o exame seja considerado positivo; Tesei *et al.* (2003) relataram sensibilidade e especificidade de 86,0 e 100,0%, respectivamente, na diluição de 1:5.

No presente trabalho, os valores obtidos encontram-se de acordo com as publicações e a sensibilidade do exame poderia ter sido mais alta se se tivesse utilizado a diluição de 1:2,5 e não 1:40, como ponto de corte. Dos quatro pacientes do grupo 1, que foram negativos para AAE, três apresentaram leitura positiva nessa diluição, mas com padrão diferente de endomíseo, assumindo padrão de fluorescência para músculo liso, não podendo ser considerado positivo. Dos pacientes do grupo 2, 39 de 173 apresentaram leitura positiva para músculo liso na diluição 1:2,5. Se fosse considerada essa diluição, a sensibilidade do

exame seria de 96,9%, mas a especificidade seria de 77,5%. Não há relato, na literatura consultada, desse tipo de padrão de leitura.

Estes resultados foram confirmados pela análise multivariada dos componentes principais, nos dois grupos analisados, mostrando que o marcador sorológico que mais se correlaciona com a doença celíaca é o anticorpo antiendomísio, que apresentou especificidade de 100,0%.

A correlação entre a determinação dos anticorpos antiendomísio, utilizando-se como substrato esôfago de macaco e cordão umbilical humano, foi de 100,0%, não havendo possibilidade de duas representações gráficas na análise multivariada dos componentes principais nos dois grupos analisados (grupos 1 e 2).

Vários autores referenciaram baixa sensibilidade dos anticorpos antiendomísio nos pacientes com idade inferior a dois anos. Grodzinsky *et al.* (1995) sugeriram o uso de AGAA para crianças abaixo de dois anos de idade. Ghedira *et al.* (2001) relataram sensibilidade de 57% para essa faixa etária. No presente estudo, foi observado que, dos 33 pacientes com doença celíaca não tratada, em que foram feitas as determinações dos anticorpos IgA antiendomísio, 16 tinham menos de dois anos e um (6,2%) exibiu resultado negativo. Dos outros 17, com idade acima de dois anos, três (17,6%) tiveram resultados negativos, diferentemente dos dados descritos na literatura. Essa discordância pode ser explicada pelas variações nas técnicas empregadas. A utilização adequada de controles positivos

e negativos é importante para diminuir-se a interferência do fator humano e avaliar em qual diluição se deve considerar o resultado como positivo.

Um novo teste diagnóstico é sempre descrito com grande entusiasmo quando inicialmente utilizado, mas, à medida que mais experiências vão se acumulando, suas falhas começam a ser descritas. Isso aconteceu quando a determinação dos anticorpos antiendomísio começou a ser adotada no diagnóstico de doença celíaca e também em relação à determinação dos anticorpos antitransglutaminase tecidual. As variações nas técnicas utilizadas para sua determinação também têm trazido as mesmas dificuldades para as comparações entre os dados publicados pelos diversos autores. Levine *et al.* (2000) utilizaram PBS T20 e não tris HCl para a sensibilização e a diluição do soro e do conjugado, como preconizado por Dieterich *et al.* (1998). Scoglio *et al.* (2003) usaram gliadina na fase de sensibilização, juntamente com transglutaminase. Esse mesmo procedimento foi descrito por Lepers *et al.* (2003), avaliando *kits* comerciais para a determinação de anticorpos antigliadina, antiendomísio e antitransglutaminase tecidual. Neste trabalho foi utilizada, para sensibilização das placas, a concentração de 2,45µg de transglutaminase de *Cavia porcellus* por 100µl. Os soros foram colocados nas placas e levados à estufa a 35°C por 60 min. Foi empregado ABTS para revelar a reação e a leitura das densidades ópticas realizadas em comprimento de onda de 405nm. Já Dieterich *et al.* (1998) utilizaram 1µg/poço de transglutaminase de *Cavia porcellus*, hidrocloreto de o-feniledilamina como revelador e a leitura das densidades ópticas realizadas com comprimento de onda de 450nm.

Outras variações ocorrem em relação à diluição do conjugado, com alguns autores utilizando a diluição de 1:1000 (DIETERICH *et al.*, 1998) e outros 1:2000

(SCOLGLIO *et al.*, 2003). Da mesma forma que para os outros marcadores sorológicos, faltam padronização e informação sobre a metodologia utilizada para a execução desse exame.

Esses fatos talvez expliquem os relatos de sensibilidade para os anticorpos antitransglutaminase tecidual variando de 82,0 a 100,0% e a especificidade de 76,0 a 100,0% (LEON *et al.*, 2001).

A definição da melhor concentração para a sensibilização das placas se faz baseando-se na melhor leitura do branco, do controle positivo e negativo, variando-se a concentração para a sensibilização, diluição do soro e do conjugado. Aquela que apresentar melhor definição entre positivo e negativo, sem apresentar reação inespecífica, é definida como adequada. Hoje tem sido utilizada a transglutaminase humana para a fase de sensibilização, com melhora nos resultados da sensibilidade e especificidade, mas com custo mais alto.

Além dessas variações, deve-se considerar a forma de se estabelecer o ponto de corte para esses exames, pois a quantidade de anticorpos dos pacientes varia muito de países desenvolvidos para subdesenvolvidos, levando a resultados falsos-positivos naqueles que moram em países subdesenvolvidos.

Essa preocupação foi manifestada em consenso sobre diagnóstico de doença celíaca (WALKER-SMITH *et al.*, 1990). Neste trabalho não houve interferência desse fator em relação aos anticorpos antiendomísio utilizando-se como substrato o esôfago de macaco ou cordão umbilical humano. A especificidade e o valor

preditivo positivo, para ambos, foram de 100,0% e o valor preditivo negativo de 89,2% para o substrato de cordão umbilical humano e 89,7% para o substrato de esôfago de macaco. O mesmo não ocorreu em relação a AGAA, AGAG e ATGT, com especificidade de 95,2, 95,2 e 96,8%, valor preditivo positivo de 75,0, 76,7 e 83,9% e valor preditivo negativo de 96,6, 98,0 e 96,8%, respectivamente.

Apesar de todas as variações na técnica da determinação dos anticorpos antitrasnglutaminase, há também consenso entre os autores sobre a sensibilidade e especificidade do exame. O mesmo pode ser observado neste estudo, pela análise multivariada dos componentes principais, que demonstrou ser ele o segundo marcador mais relacionado à doença celíaca.

Um fato a ser observado na análise multivariada dos componentes principais é que AGAA e ATGT estão em quadrantes opostos, o que sugere uma exclusividade dos marcadores, ou seja, quando um está presente, o outro muito provavelmente estará ausente. Neste estudo, nos pacientes com doença celíaca houve concordância de 77,6% entre os dois marcadores. Foi observado que, dos sete pacientes em que havia discordância, os três que apresentaram AGAA positivo e ATGT negativo tinham menos de 2,6 anos de idade e os que apresentavam AGAA negativo e ATGT positivo estavam acima de 2,6 anos de idade.

Este é um dado importante, pois vem sendo preconizada a determinação dos anticorpos antitrasnglutaminase tecidual para triagem de pacientes a serem

submetidos à biópsia intestinal, sem se levar em consideração a idade do paciente.

Outro fator que deve ser avaliado na definição dos melhores marcadores sorológicos para o *screening* diagnóstico da DC é o custo do exame. Ladinser e Rossipal (1994); Not *et al.* (1997) já relatavam que o custo da determinação dos anticorpos antiendomísio em esôfago de macaco era maior que em cordão umbilical humano. Entretanto, poucos autores utilizam o cordão umbilical humano em seus trabalhos (KOLHO; SAVILAHTI, 1997; NOT *et al.*, 1997; KOTZE *et al.*, 2001; BOOK; ZONE; NEUHAUSEN, 2003). O custo do material gasto para cada teste, no presente estudo, foi de R\$1,32 para IgA e IgG antigliadina, R\$8,00 para anticorpos IgA antitransglutaminase e R\$2,00 para anticorpos IgA antiendomísio em cordão umbilical humano.

A definição de DC após a padronização histológica feita por Marsh (1992) varia de serviço para serviço. Alguns autores consideram que o paciente tem doença celíaca quando há anticorpos positivos e presença de linfócitos intra-epiteliais aumentados na biópsia intestinal. No nosso serviço, considera-se ser grande a probabilidade diagnóstica, do ponto de vista histológico, de DC nos pacientes que apresentam atrofia vilositária juntamente com infiltrado inflamatório de lâmina própria e presença de linfócitos intra-epiteliais aumentados. Acredita-se que tal precaução deva ser adotada pela importância do diagnóstico da doença e de sua implicação, do ponto de vista pessoal, familiar e social, já que o paciente terá de fazer dieta isenta de glúten para toda a vida.

Quando se comparou a especificidade dos marcadores sorológicos dos grupos dos pacientes submetidos à biópsia intestinal com a especificidade do grupo com e sem biópsia intestinal, concluiu-se que são muito semelhantes, sendo 95,7 e 95,2% para AGAA, 95,7 e 95,2% para AGAG, 90,5 e 96,5% para ATGT e 100% para AAEEM e AAECO. Entretanto, houve variação nos valores preditivos positivos, que foram de 96,8 e 75,0% para AGAA, 97,1 e 76,7% para AGAG, 92,9 e 83,9% para ATGT e 100,0% para AAEEM e AAECO para os pacientes com biópsia e do grupo com e sem biópsia intestinal, respectivamente. Os valores preditivos negativos, também para os grupos com biópsia e sem biópsia, foram de 76,7 e 96,6% para AGAA, 85,2 e 98,0% para AGAG, 79,2 e 96,8% para ATGT, 89,2 e 97,7% para AAECO e 89,7 e 97,7% para AAEEM, respectivamente. Quanto mais sensível for um teste diagnóstico, melhor será o seu valor preditivo negativo; e quanto mais específico, melhor o resultado do valor preditivo positivo. Como o objetivo dos exames sorológicos é a triagem dos pacientes para biópsia intestinal, considera-se que o valor preditivo negativo tem mais importância na interpretação dos resultados desses marcadores. A necessidade de grupo-controle com biópsia intestinal não parece ser absoluta.

Apesar de todas as variações nas técnicas, os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com a literatura internacional, que apresenta grande variação de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo entre os marcadores sorológicos para o diagnóstico de doença celíaca (CICLITIRA, 2001; GHEDIRA *et al.*, 2001; ABDULKARIM; MURRAY, 2003).

7 CONCLUSÕES

Estas conclusões basearam-se no estudo da sensibilidade e especificidade dos três grupos estudados com e sem biópsia e na análise multivariada dos componentes principais do grupo dos 283 pacientes, com e sem biópsia intestinal, pois se considerou que são eles os que melhor representam o universo dos pacientes a serem avaliados.

- O marcador que mais se correlaciona com DC é o endomísio, seguido de transglutaminase tecidual.
- Devido a semelhança entre sensibilidade e especificidade entre AGAA e ATGT, às correlações com DC na análise multivariada, à maior incidência de DC em pacientes com deficiência de IgA, ao menor custo de AGA, pode-se utilizar a determinação dos anticorpos IgA e IgG antigliadina seguidos de anticorpos antiendomísio em cordão umbilical humano como triagem eficiente dos pacientes a serem submetidos à biópsia intestinal para o diagnóstico de doença celíaca, mesmo nos países subdesenvolvidos, desde que o ponto de corte para o resultado desses exames seja estabelecido nesses países.
- A determinação dos anticorpos antiendomísio utilizando o cordão umbilical humano como substrato pode substituir o esôfago de macaco.
- Houve boa correlação entre doença celíaca e os marcadores sorológicos, que podem ser utilizados como indicadores de doença, seja ela sintomática ou assintomática, devendo ser empregados na avaliação da indicação de biópsia intestinal nos pacientes com suspeita da doença.

8 PROPOSIÇÕES

- Estabelecer o ponto de corte dos marcadores sorológicos para os *kits* comerciais ou desenvolver *kit* próprio que seja adequado à nossa população.
- Investigar os motivos da interferência da idade na determinação dos anticorpos antiendomísio e antitransglutaminase tecidual.
- Investigar os motivos que determinaram, na análise multivariada dos componentes principais, oposição entre anticorpos IgA antigliadina e antitransglutaminase tecidual.

REFERÊNCIAS

ABDULKARIM, A.S.; MURRAY, J.A. Review article: the diagnosis of coeliac disease. **Aliment Pharmacol Ther**, Rochester, v. 17, p. 987-995, 2003.

BAHIA, M.; RABELLO, A.; BRASILEIRO-FILHO, G.; PENNA, F.J. Serum antigliadin antibody levels as a screening criterion for celiac disease in a developing country. **Br J Med Biol Res**, São Paulo, v. 34, p. 415-420, 2001.

BODÉ, S.; WEILE, B.; KRASILNIKOFF, P.A.; HOYER, E.G. The diagnostic value of the gliadin antibody test in celiac disease in children: a prospective study. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, Copenhagen, v. 17, p. 200-264, 1993.

BOOK, L.; ZONE, J.J.; NEUHAUSEN, S.L. Prevalence of celiac disease among relatives of sib pairs with celiac disease in US families. **Am J Gastroenterol**, Salt Lake, v. 98, n. 2, p. 377-381, 2003.

BROWN, I.L.; FERGUSON, A.; CARSWELL, F.; HORNE, C.H.W.; MACSWEEN, R.N.M; Autoantibodies in children with celiac disease. **Clin Exp Immunol**, Cambridge, 13, 373-382, 1973.

BÜRGIN-WOLFF, A.; HERNANDEZ, R.; JUST, M.; SIGNER, E. Immunofluorescent antibodies against gliadin: a screening test for coeliac disease. **Helv Paediatr Acta**, Berna, v. 31, p. 375-380, 1976.

BÜRGIN-WOLFF, A.; BERTELE, R.M.; BERGER, R.; GAZE, H.; HARMS, H.K.; JUST, M.; KHANNA, S.; SCHÜRMAN, K.; SINGER, E.; TOMOVIC, D. A reliable screening test for childhood celiac disease: fluorescent immunosorbent test for gliadin antibodies. **J Pediatr**, Boston, v. 102, p. 655-660, 1983.

BÜRGIN-WOLFF, A.; GAZE, H.; HADZISELIMOVIC, F.; HUBER, H.; LENTZE, M.J.; NUSSLÉ, D.; REYMOND-BERTHET, C. Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. **Arch Dis Child**, London, v. 66, p. 941-947, 1991.

CALABUIG, S.; ALVAREZ ANGEL, V.; MARTIN, P.P.; RATES, C.T.; TUSET RUIZ, L.; TORREGOSA, S.; GARCIA, V.; BRINES, S.; MARTINEZ, C.; CODOÑER, F. Anticuerpos antiendomiosio: un nuevo marcador serológico para el diagnóstico y seguimiento de pacientes afectados de enteropatía sensible al gluten: estudio preliminar. **Esp Pediatr**, Barcelona, v. 30, n. 6, p. 432-434, 1989.

CALABUIG, S.; TORREGOSA, S.; POLO, P.; TUSET, L.; TOMÁS, C.; ALVAREZ, V.; GARCIA-VILA, A.; BRINES, S.; VILAR, P.; FARRÉ, C.; VAREA, V. Serological markers and celiac disease: a new diagnostic approach? **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, New York v. 10, p. 435-442, 1990.

CALVANI JR., M.; PARISI, P.; GUAITOLINI, C.; PARISI, G.; PAOLONE, G. Latent coeliac disease in a child with epilepsy, cerebral calcifications, drug-induced systemic lupus erythematosus and intestinal folic acid malabsorption associated with impairment of folic acid transport across the blood brain barrier. **Eur J Pediatr**, Germany, v. 160, p. 288-292, 2001.

CARLSSON, A.; AXELSSON, I.; BORULF, S.; BREDBERG, A.; FORSLUN, M.; LINDBERG, B.; SJÖBERG, K.; IVARSSON, S.-A. Prevalence of IgA anti gliadin antibodies and IgA anti endomysium antibodies related to celiac disease in children with down syndrome. **Pediatrics**, Washington, v. 101, n. 2, p. 272-275, Feb. 1998.

CARROCCIO, A.; VITALE, G.; DI PRIMA, L.; CHIFARI, N.; NAPOLI, S.; LA RUSSA, C.; GULOTTA, G.; AVERNA, M.R.; MONTALTO, G.; MANSUETO, S.; NOTARBARTOLO, A. Comparison of antitransglutaminase ELISA and an anti endomysial antibody assay in the diagnosis of celiac disease: a prospective study. **Clin Chem**, Palermo, v. 48, n. 9, p. 1546-1550, 2002.

CATALDO, F.; TRIPPIEDI, M.A.; MARINO, V.; MALTESE, I.; TRAVERSO, G.; PATERNOSTRO, D.; ALBEGGIANI, A. Anticorpi anti endomysio ed anticorpi anti gliadina nella diagnosi e nel follow-up della malattia celiaca. **Minerva Pediatr**, Palermo, v. 45, p. 29-33, 1993.

CATALDO, F.; VENTURA, A.; LAZZARI, R.; BALLI, F.; NASSIMBENI, G.; MARINO, V. Anti endomysium antibodies and coeliac disease: solved and unsolved questions: an Italian multicentre study. **Acta Paediatr**, Berna, v. 84, p. 1125-1131, 1995.

CHARTRAND, L.J.; AGULNIK, J.; VANOUNOU, T.; RUSSO, P.A.; BAEHLER, P.; SEIDMAN, E.G. Effectiveness of anti gliadin antibodies as a screening test for celiac disease in children. **Can Med Assoc J**, Montreal, v. 157, n. 5, p. 527-533, Sept. 1997.

CHORZELSKI, T.P.; SULEJ, J.; TCHORZEWSKA, H.; JABLONSKA, S.; BEUTNER, E.H.; KUMAR, V. IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and celiac disease. **Ann NY Acad Sci**, New York, v. 420, p. 325-334, 1983.

CICLITIRA, P.J.; ELLIS, H.J.; EVANS, D.J. A solid-phase radioimmunoassay for measurement of circulating antibody titres to wheat gliadin and its subfractions in patients with adult coeliac disease **J Immunol Methods**, Elsevier, v. 62, p. 231-239, 1983.

CICLITIRA, P.J. AGA technical review on celiac sprue. **Gastroenterology**, London, v. 120, p. 1526-1540, 2001.

COLLIN, P.; HÄLLSTRÖM, A.; MÄKI, M.; VIANDER, M.; KEYRILÄINEN, O. Atypical coeliac disease found with serologic screening. **Scand J Gastroenterol**, Stockholm, v. 25, p. 245-250, 1990.

COLLIN, P.; MÄKI, M.; KEYRILÄINEN, O.; HÄLLSTRÖM, O.; REUNALA, T., PASTERNAK, A. Selective IgA deficiency and coeliac disease. **Scand J Gastroenterol**, Stockholm, v. 27, p. 367-371, 1992.

CORNELL, H.J. Circulating antibodies to wheat gliadin fractions in celiac disease **Arch Dis Child**, London, 49, 454-458, 1974.

DEAN, A.G.; DEAN, J.A.; COULOMBIER, D.; BREMDE, K.A.; SMITH, D.C.; BURTON, A.H.; DICKER, R.C.; SULLIVAN, K.; FAGAN, R.F.; ARNER, T.G. **Epi Info, Version 6**: a word processing, database and statistic program for epidemiology on microcomputers. Atlanta, Georgia, USA: Center of Disease Control and Prevention, 1994.

DIETERICH, W.; EHNIS, T.; BAUER, M.; DONNER, P.; VOLTA, U.; RIECKEN, E.O.; SCHUPPAN, D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. **Nat Med**, New York, v. 3, n. 7, p. 797-801, 1997.

DIETERICH, W.; LAAG, E.; SCHOPPER, H.; VOLTA, U.; FERGUNSON, A.; GILLETT, H.; ; RIECKEN, E.O.; SCHUPPAN, D. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. **Gastroenterology**, London, v. 998, n. 115, p. 1317-1321, 1998.

DUBEL, L.; ABSALON, Y.B.; BAUDON, J.J.; JOHANET, C. Étude comparative des marqueurs serologique de l'intolerance au gluten. **Ann Biol Clin**, Paris, v. 54, p. 303-306, 1996.

FASANO, A.; BERTI, I.; GERARDUZZI, T.; NOT, T.; COLLETTI, R.B.; DRAGO, S.; ELITSUR, Y.; GREEN, P.H.R.; GUANDALINI, S.; HILL, I.D.; PIETZAK, M.; VENTURA, A.; THORPE, M.; KRYSZAK, D.; FORNAROLI, F.; WASSERMAN, S.S.; MURRAY, J.A.; HORWATH, K. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States. **Arch Intern Méd**, Chicago, v. 163, p. 286-292, 2003.

FEIGHERY, L.; COLLIN, C.; FEIGHERY, C.; MAHMUD, N.; COUGHLAN, G.; WILLOUGHBY, R.; JACKSON, J. Anti transglutaminase antibodies and the serological diagnosis of coeliac disease. **Br J Biomed Sci**, [s.l.], v. 60, n. 1, p. 14-18, 2003.

FERREIRA, M.; DAVIES, S.L.; BUTTLER, D.S.; CLARK, M.; KUMAR, P. Endomysial antibody: is it the best screenig test for coeliac disease. **Gut**, London, v. 33, p. 1633-1637, 1992.

FRANÇA, J.L. *et al.* **Manual para normalização de publicações técnico-científicas**. Ed. UFMG, Belo Horizonte. 7ed., 2004. 241p.

GABRIELLI, M.; CREMONINI, F.; FIORE, G.; ADDOLORATO, G.; PADALINO, C.; CANDELLI, M.; DE LEO, M.E.; SANTARELLI, L.; GIACOVAZZO, M.; GASBARRINI, G.; POLA, P.; GASBARRINI, A. Association between migraine and celiac disease: results from a preliminar case control and therapeutic study. **Am J Gastroenterology**, London, v. 96, n. 3, p. 625-629, 2003.

GHEDIRA, I.; SGHIRI, R.; AYADI, A.; SFAR, M.T.; HARBI, A.; ESSOURI, A.S.; AMRI, F.; KORBI, S.; JEDDI, M. Anticorps anti endomysium, anti réticuline et anti gliadine, intérêt dans le diagnostic de la maladie coeliaque chez l'enfant. **Pathol Biol**, Paris, v. 49, p. 47-52, 2001.

GRODZINSKY, E.; JANSSON, G.; SKOGH, T.; STENHAMMAR, L.; FÄLTH-MAGNUSSON, K. Antiendomysium and anti gliadin antibodies as serological markers for coeliac disease in childhood: a clinical study to develop a practical routine. **Acta Paediatr**, Berna, v. 84, p. 294-298, 1995.

GRODZINSKY, E. Screening for coeliac disease in apparently healthy blood donors. **Acta Paediatr Suppl**, Berna, v. 412, p. 36-38, 1996.

GUANDALINI, S.; VENTURA, A.; ANSALDI, N.; GIUNTA, A.M.; GRECO, L.; LAZZARI, R.; MASTELLA, G.; RUBINO, A. Diagnosis of coeliac disease: time for a change? **Arch Dis Child**, London, v. 64, p. 1320-1325, 1989.

HILL, I.; DIRKS, M.; LIPTAK, G.; COLLETTI, R.; FASANO, A.; GUANDALINI, S.; HOFFENBERG, E.; HORVATH, K.; MURRAY A.; PIVOR, M.; SEIDMAN, E. Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, New York, 40, p. 1-19, 2005.

HOLMES, G.K.T.; PRIOR, P.; LANE, M.R.; POPE, D.; ALLAN, R.N. Malignancy in coeliac disease – effect of a gluten free diet. **Gut**, London, v. 30, p. 333-338, 1989.

HOTELLING, H. Analysis of a complex of statistical variables into principal components. *J Educ Psychol*, n. 24, p. 417-441, 498-520, 1933. *In*: SAMPAIO, I. **Relatório das atividades de pós-doutorado desenvolvidas no período de 03.09.1992 a 04.03.1993**. Madrid: Universidade Politécnica de Madrid, 1993, 123f.

HUFF, J.C.; WESTON, W.L.; ZIRKER, D.K. Wheat protein antibodies in dermatitis herpetiformis. **J Invest Dermatol**, London, v. 73, p. 570, 1979.

JAMES, M.W.; SCOTT, B.B. Endomysial antibody in the diagnosis and management of celiac disease. **Postgrad Med J**, Minneapolis, v. 76, p. 466-468, 2000.

JOHNSTON, S.D.; MCMILLAN, S.A.; COLLIN, J.S.A.; THAM, T.C.K.; MCDUGALL, N.I.; MURPHY, P. A comparison of antibodies to tissue transglutaminase with conventional serological tests in the diagnosis of coeliac disease. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, Amsterdam, v. 15, p. 1001-1004, 2003.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Tecido muscular in: **Histologia básica** 9 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1999.

KAPUSCINSKA, A.; ZALEWSKI, T.; CHORZELSKI, T.P.; SULEJ, J.; BEUTNER, E.H.; KUMAR, V.; ROSSI, T. Disease specificity and dynamics of changes in IgA

class anti endomysial antibodies in celiac disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, New York, v. 6, p. 529-534, 1987.

KATZ, J.; KANTOR, F. S.; HERSKOVIC, T. Intestinal antibodies to wheat fractions in celiac disease. **Annals Internal Med**, New Haven, v.69, p. 1149-1153, 1968.

KAUKINEN, K.; PARTANEN, J.; MÄKI, M.; COLLIN, P. HLA-DQ typing in the diagnosis of celiac disease. **Am J Gastroenterol**, Salt Lake, v. 97, n. 3, p. 698-699, 2002.

KÁVAI, M.; SZABOLCS, M.; CSORBA, S.; SZABÓ, B.; FÉSÜS, L. Circulating antibodies in coeliac disease. **Acta Paediatr Acad Sci Hung**, Budapeste, v. 18, n. 3/4, p. 235-238, 1977.

KHOSHOO, V.; BHAN, M.K.; PURI, S.; JAIN, R.; JAYASHREE, S. Serum anti-gliadin antibody profile in childhood protacted diarrhoea due to coeliac disease and other causes in a developing country. **Scand J Gastroentol**, Stockolm, v. 24, p. 1212-1216, 1989.

KIEFFER, M.; FRAZIER, P.J.; DANIELS, N.W.R.; COOMBS, R.R.A. Wheat gliadin fractions and other cereal antigens reative with antibodies in the sera of coeliac patients. **Clin Exp Immunol**, Cambridge, v. 50, p. 651-660, 1982.

KILANDER, A.F.; DOTEVALL, G.; FÄLLSTRÖM, S.P.; GILLBERG, R.E.; NILSSON, L.A.; TARKOWSKI, A. Evaluation of gliadin antibodies for detection of coeliac disease. **Scand J Gastroenterol**, Stockolm, v. 18, v. 277-383, 1983.

KOLHO, K.-L.; SAVILAHTI, E. IgA anti endomysial antibodies on human umbilical cord tissue for celiac disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, New York, v. 24, p. 563-567, 1997.

KOTZE, L.M.S.; UTIYAMA, S.R.R.; NISIHARA, R.M.; MOCELIN, V.; CARVALHO, R.F.A.; ZENI, M.P.B.; AMARANTE, H.M.S. Comparação dos anticorpos anti-reticulina e antiendomísió classe IgA para diagnóstico e controle da dieta na doença celíaca. **Arq Gastroenterol**, São Paulo, v. 36, n. 4, p. 177-183. 1999.

KOTZE, L.M.S.; UTIYAMA, S.R.R.; NISIHARA, R.M.; ZENI, M.P.B.; SENA, M.G.; AMARANTE, H.M.S. Antiendomysium antibodies in brazilian patients with celiac disease an their first-degree relatives. **Arq Gastroenterol**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 94-103, abr.-jun. 2001.

KOTZE, L.M.S.; UTIYAMA, S.R.R.; NISIHARA, R.M.; CAMARGO, V.F.; IOSHII, S. IgA class anti endomysial and anti tissue transglutaminase antibodies in relation to duodenal mucosa changes in celiac disease. **Pathology**, Australasia, v. 35, p. 56-60, 2003.

KUMAR, V.; LERNER, A.; VALESKI, J.E.; BEUTNER, E.H.; CHORZELSKI, T.P.; ROSSI, T. Endomysial antibodies in the diagnosis of celiac disease and the effect of gluten on antibody titers. **Immunol Invest**, [s.l.], v. 18, n. 1-4, p. 533-544, 1989.

KUMAR, V.; JARZABCK-CHORZELSKA, M.; SULCJ, J.; KARNCWSKA, K.; FARRELL, T.; JABLONSKA, S. Celiac disease and Immunoglobulin A deficiency: how effective are the serological methods of diagnosis? **Clin Diagn Lab Immunol**, [s.l.], v. 9, n. 6, p. 1295-1299, 2002.

LAADHAR, L.; BOUAZIZ, N.; AYED, M.B.; CHAABOUNI, M.; BOUDAWARA, T.; HACHICHA, M.; JLIDI, R.; TRIKI, A.; MASMOUDI, H. Dosage des anticorps anti transglutaminase dans le diagnostic de la maladie coeliac de l'enfant: resultants d'une etude prospective sur cinq ans. **Ann Biol Clin**, Paris, v. 62, p. 431-436, 2004.

LADINSER, B.; ROSSIPAL, E. Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. **Gut**, London, v. 35, p. 776-778, 1994.

LANE, A.; CLARK, J.; ZONE, J. Class specific antibodies to gluten in dermatitis herpetiformis. **J Invest Dermatol**, London, v. 80, p. 402-405, 1983.

LEON, F.; CAMARERO, C.; R-PENA, R.; EIRAS, P.; SANCHEZ, L.; BARAGAÑO, M.; LOMBARDIA, M. Anti-transglutaminase IgA ELISA: clinical potential and drawbacks in celiac disease. **Scand J Gastroenterol**, Stockolm, v. 8, p. 849-853, 2001.

LEONARDI, S.; BOTTARO, G.; PATANÉ, R.; MUSUMECI, S. Hipertransaminasemia as the first symptom in infant celiac disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, New York, v. 11, p. 404-406, 1990.

LEPERS, S.; SOULA, F.; FIFY, S.; FONTAINE, E.S.; VUYE, J.-F.; COLOMBEL, D.; GUIMBER, L.; PRIN, S. Dubucquoi Intérêt des anticorps anti transglutaminase tissulaire dans le diagnostic de la maladie coeliaque. **Ann Biol Clin**, Paris, v. 61, p. 337-343, 2003.

LEVINE, A.; BUJANOVER, Y.; RELF, S.; GASS, S.; VARDINON, N.; RELFEN, R.; LEHMANN, D. Comparison of assays for anti endomysial and anti transglutaminase antibodies for diagnosis of pediatric celiac disease. **Isr Med Assoc J**, Tel Aviv, v. 2, p. 122-125, 2000.

LINDBERG, L.A.; NILSSON, S.; BORULF, B.; CAVELL, S.P.; FÄLLSTRÖM, U.; JANSSON, L.; STENHAMMAR, L.; STINTZING, G. Serum IgA and IgG gliadin antibodies and small intestinal mucosal damage in children. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, New York, v4 917-922, 1985.

LINDGREN, S.; SJÖBERG, K.; ERIKSSON, S. Unsuspected coeliac disease in chronic cryptogenic liver disease. **Scand J Gastroenterol**, Stockolm, v. 29, p. 661-664, 1994.

LINDQUIST, B.L.; ROGOZINSKI, T.; MOI, H.; DANIELSSON, D.; OLCÉN, P. Endomysium and gliadin IgA antibodies in children with coeliac disease. **Scand J Gastroenterol**, Stockolm, v. 29, p. 452-456, 1994.

LOGAN, R.F.A. Screening for celiac disease – has the time come for mass screening? **Acta Paediatr Suppl**, Berna, v. 412, p. 15-19, 1996.

MAGGIORE, G.; DE GIACOMO, C.; SCOTTA, M.S.; SESSA, F. Celiac disease presenting as chronic hepatitis in a girl. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, New York, v. 5, p. 501-503, 1986.

MARSH, M.N. Glúten, major histocompatibility complex and the small intestine: a molecular and immunobiologic approach to the spectrum of glúten sensitivity. **Gastroenterology**, London, v. 102, p. 330-354, 1992.

MARSH, M.N. Is celiac disease (gluten sensitivity) a premalignant disorder? **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, New York, v. 24, suppl. 1, p. S25-S27, 1997.

MASCART-LEMONE, F.; LAMBRECHTS, A. Serology of celiac disease: early diagnosis and therapeutic impact. **Acta Gastroenterol Belg**, Bruxelas, v. 58, n. 5/6, p. 388-396, Sep.-Dec., 1995.

MCMILLAN, S.A.; HAUGHTON, D.J.; BIGGART, J.D.; EDGAR, J.D.; PORTER K.G.; MCNEIL, T.A. Predictive value for celiac disease of antibodies to gliadin, endomysium and jejunum in patients attending for jejunal biopsy. **Br Med J**, London, v. 303, p. 1163-1165, 1991.

MEDEIROS, E.H.G.R.; PATRÍCIO, F.R.S.; MORAIS, M.B.; LESER, P.G.; WEHBA, J. Anticorpo sérico antigliadina no diagnóstico e seguimento da doença celíaca. **Arq Gastroenterol**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 154-158, 1994.

MOLBERG, Ø.; MCADAM, S.N.; SOLLID, L.M. Role of tissue transglutaminase in celiac disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, New York, v. 30, n. 3, p. 232-240, Mar. 2000.

MORILLAS, M.J.; GASPAR, E.; MOLES, J.R.; SILES, S.; GARCIA, E.; NOS, P.; BERENGUER, J. Enfermedad celiac del adulto y hepatopatía. **Rev Esp Enferm Dig**, Barcelona, v. 79, n. 3, p. 197-200, 1991.

NOT, T.; CITTÀ, A.; LUCCHESI, A.; TORRES, G.; MARTELOSSI, S.; VENTURA, A. Anti endomysium antibody on human umbilical cord vein tissue: an inexpensive and sensitive diagnostic tool for the screening of celiac disease. **Eur J Pediatr**, Germany, v. 156, p. 616-618, 1997.

O'FARRELLY, C.; KELLY, J.; FEIGHERY, C. Gliadin antibodies level in screening test for coeliac disease. **Br Med J**, London, v. 1, p. 70-71, 1984.

OLIVEIRA, M.C.L.A.; REIS, F.J.C.; CHAGAS, A.J.; BRASILEIRO FILHO, G.; BAHIA, M.; SILVA, L.D.; PENNA, F.J. Estudo de doenças de má absorção intestinal como causa de baixa estatura monossintomática. **J Pediatr**, Rio de Janeiro, v. 74, n. 3, p. 213-216, 1998.

ORDEIG, J.; RICHART, C.; VILLANUEVA, C.; MARTIN, C.; GALLART, T. Anticuerpos antirreticulina y enfermedad celiaca. **Rev Esp Enf Ap Digest**, Barcelona, 63, 1 (36-39), 1983.

PAPADOPOULOS, G.K.; WIJMENGA, C.; KONING, F. Interplay between genetics and the environment in the development of celiac disease: perspectivas for a healthy life. **J Clin Invest**, Thorofare, v. 108, n. 9, p. 1261-1266, 2001.

PEARSON, K. On line and planes of closest fit to systems of points in space. **Philos. Mag.**, v. 6, n. 2, p. 559-572, 1901. *In*: SAMPAIO, I. **Relatório das atividades de pós-doutorado desenvolvidas no período de 03.09.1992 a 04.03.1993**. Madrid: Universidade Politécnica de Madrid, 1993, 123 f.

PERERA, D.R.; WEINSTEIN, W.M.; RUBIN, C.E. Symposium on pathology of the gastrointestinal tract. Part II. Small intestinal biopsy. **Hum Pathol**, Oxford, v. 6, n. 2, p. 157-217, Mar. 1975.

RAUTONEN, J.; RAUTONEN, N.; SAVILAHTI, E. Antibodies to gliadin in children with coeliac disease. **Acta Paediatr Scand**, Copenhage, v. 80, p. 1200-1206, 1991.

RIBES, C.; PEREDA, R.; FERRER, J.; PEÑA, A. The value of the measurement of IgA antigliadin antibodies in a pediatric unit in Spain: a prospective study. **Clin Nutr Gastroenterol**, [s.l.], v. 1, p. 26-29, 1986.

ROSENBACH, Y.; DINARI, G.; ZAHAVI, I.; NITZAN, M. Short stature as the major manifesttion of celiac disease in older children. **Clin Pediatr**, [s.l.], v. 25, n. 1, p. 13-16, 1986.

ROSSI, T.M.; KUMAR, V.; LERNER, A.; HEITLINGER, L. A.; TUCKER, N.; Fisher, J. Relationship of endomysial antibodies to jejunal mucosal pathology: specificity towards both syntomatic and asyntomatic celiacs. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, New York, v. 7, p. 858-863, 1988.

ROSTAMI, K.; KERCKHAERT, J.; TIEMESSEN, R.; Von BLOMBERG, M.; MEIJER, J.W.R.; MULDER, C.J.J. Sensitivity of antiendomysium and antigliadin antibodies in untreated celiac disease: disappointing in clinical practice. **Am J Gastroenterol**, Salt Lake, v. 94, n. 4, p. 888-894, 1999.

ROSTAMI, K.; MULDER, C.J.J.; VAN OVERBEEK, F.M.; KERCKHAERT, J.; MEIJER, J.W.R.; Von BLOMBERG, M.; HEYMANS, Hugo S.A. Should relatives of coeliacs with mild clinical complaints undergo a small-bowel biopsy despite negative sorology? **Eur J Gastroenterol Hepatol**, Elsevier, v. 12, p. 51-55, 2000.

SAMPAIO, I. **Relatório das atividades de pós-doutorado desenvolvidas no período de 03.09.1992 a 04.03.1993**. Madrid: Universidade Politécnica de Madrid, 1993, 123 f.

SÁRDY, M.; KÁRPÁTI, S.; PETERFY, F.; RÁSKY, K.; TOMSITS, E.; ZÁGONI, T.; HORVÁTH, A. Comparison of a tissue transglutaminase ELISA with the

endomysium antibody test in the diagnosis of glúten-sensitive enteropathy. **Z Gastroenterol**, [s.l.], v. 38, p. 357-364, 2000.

SCHMITZ, U.; KO, Y.; SEEWALD, S.; DÜSING, R.; VETTER, H. Iron deficiency anemia as the sole manifestation of celiac disease. **Clin Investig**, Germany, v. 72, p. 519-521, 1994.

SCHUPPAN, D.; HAHN, E.G. Gluten and gut – lessons for immune regulation. **Science**, Washington, v. 297, p. 2218-2220, Sept. 2002.

SCOGLIO, R.; DI PASQUALE, G.; PAGANO, G.; LUCANTO, M.C.; MAGAZZU, G.; SFERLAZZAS, C. Is intestinal biopsy always needed for diagnosis of celiac disease? **Am J Gastroenterol**, Salt Lake, v. 98, n. 6, p. 1325-1331, 2003.

SHAMIR, R.; EHAKIM, R.; LAHAT, N.; SOBEL, E.; LERNER, A. ELISA of antiendomysial antibodies in the diagnosis of celiac disease: comparison with immunofluorescence of anti-endomysial antibodies and tissue transglutaminase antibodies. **Isr Med Assoc J**, Tel Aviv, v. 4, p. 594-596, Aug. 2002.

SIGNER, E.; BÜRGIN-WOLFF, A.; BERGER, R.; BIRBAUMER, A.; JUST, M. Antibodies to gliadin as a screening test for coeliac disease. **Helv Paediatr Acta**, Berna, v. 34, p. 41-52, 1979.

SIGURS, N.; JOHANSSON, C.; ELFSTRAND, P.-O.; VIANDER, M.; LANNER, A. Prevalence of coeliac disease in diabetic children and adolescents in Sweden **Acta Paediatr**, Berna, v. 82, p. 748-751, 1993.

STAHLBERG, M.R.; SAVILAHTI, E.; VIANDER, M. Antibodies to gliadin by ELISA as screening test for childhood celiac disease. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, New York, v. 5, p. 726-729, 1986.

STENHAMMAR, L.; KILANDER, A.F.; NILSSON, L.A.; STROMBERG, L.; TARKOWSKI, A. Serum gliadin antibodies for detection and control of childhood coeliac disease. **Acta Paediatr Scand**, Copenhage, v. 73, p. 657-663, 1984.

STENHAMMAR, L.; FÄLLSTRÖM, S.P.; JANSSON, G.; JANSSON, U.; LINDBERG, T. Celiac disease in children of short stature without gastrointestinal symptoms. **Eur J Pediatr**, Germany, v. 145, p. 185-186, 1986.

STERN, M.; FISCHER, K.; GRÜTTNER, R. Immunofluorescent serum gliadin antibodies in children with coeliac disease and various malabsorptive disorders. **Eur J Pediatr**, Germany, v. 130, p. 155-164, 1979.

TANURE, M.G., SILVA, I.N., BAHIA, M., PENNA, F. J. Prevalence of coeliac disease in brazilian children with type 1 diabetes mellitus. **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, New York, v.42, p. 155-159, 2006

TAYLOR, K.B.; THOMPSON, D.L.; TRUELOVE, S.C.; WRIGTH, R. An immunological study of celiac disease and idiopathic steatorrhoea. **Br Med J**, London, v. 30, p. 1727-1731, Dec. 1961.

TESEI, N.; SUGAI, E.; VÁZQUEZ, H.; SMECUOL, E.; NIVELONI, S.; MAZURE, R.; MORENO, M.L.; GÓMEZ, J.C.; MAURINO, E.; BAI, J.C. Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase may detect coeliac disease patients undiagnosed bay endomysial antibodies. **Aliment Phamacol Ther**, Rochester, v. 17, p. 415-1423, 2003.

TIBERTI, C.; BAO, F.; BONAMICO, M.; VERRIENTI, A.; PICARELLI, A.; DI TOLA, M.; FERRI, M.; VECCI, E.; DOTTA, F.; EISENBARTH, G.S.; DI MARIO, U. Celiac disease associated transglutaminase auto antibody target domains at diagnosis are age and sex dependent . **Clin Immunol**, Elsevier, v. 199, p. 318-324, 2003.

TONUTTI, E.; VISENTINI, D.; BIZZARO, N.; CARADONNA, M.; CERNI, L.; VILLALTA, D.; TOZZOLI, R.; and the French-Italian Laboratory Study Group on Coeliac Disease. The role of antitissue trasnglutaminase assay for the diagnosis and monitoring of coeliac disease: a French – Italian multicentre study. **J Clin Pathol**, [s.l.], v. 56, p. 389-393, 2005.

TOWNLEY, R.R.W.; ANDERSON, C.M. Coeliac disease: a review. *In*: HEILMEYER, L.; MÜLLER, A.F.; PRADER, A.; SCÖEN, R. (org.). **Ergebnisse der inneren medizin und kinderheilkunde**, Berlin, p.1-44, 1967.

TUCKER, N.T.; BARGHUTHY, F.S; PRIHODA, T.J.; KUMAR, V.; LERNER, A.; LEBENTHAL, E. Antigliadin antibodies detected by enzyme-linked immunosorbent assay as a marker of childhood celiac disease. **J Pediatr**, Nashville, v. 113, p. 286-289, 1988.

UIBO, O.; METSKÜLA, K.; KUKK , T.; RÄGO, T.; UIBO, R. Results of coeliac disease screening in Estonia in 1990-1994. **Acta Paediatr Suppl**, Berna, v. 412, p. 39-41, 1996.

UNSWORTH, D.J.; KIEFFER, M.; HOLBOROW, E.J.; COOMBS, R.R.A.; SMITH, J.A.W. IgA anti-gliadin antibodies in coeliac disease. **Clin Exp Immunol**, Cambridge, v. 46, p. 286-293, 1981.

VAN BERGE-HENEGOUWEN, G.P.; MULDER, C.J.J. Pioneer in the gluten free diet: Willen-Karel Dicke. **Gut**, London, v. 34, p. 1473-1475, 1993.

VARDEL, Y.; BRAESTER, A.; SUPRUN, H.; NUSEM, D.; HORN, Y. Simultaneous occurrence of systemic lupus erythematosus and coeliac disease-like features. **Postgrad Med J**, Minneapolis, v. 65, n. 766, p. 600-602, Aug. 1989.

VITÓRIA, J.C.; ARRIETA, A.; ORTIZ, L.; AYESTA, A. Antibodies to humana tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, New York, v. 33, p. 349-350, 2001.

VOGELSANG, H.; GENSER, D.; WYATT, J.; LOCHS, H.; FERENCI, P.; GRANDITSCH, G.; PENNER, E. Screening for celiac disease: a prospective study on the value of noninvasive test. **Am J Gastroenterol**, Salt Lake, v. 90, n. 3, p. 394-398, 1995.

VOLTA, U.; LENZI, M.; LAZZARI, R.; CASSANI, F.; COLLINA, A.; BIANCHI, F.B.; PISI, E. Antibodies to gliadin detected by immunofluorescence and a micro-ELISA method: markers of active childhood and adult coeliac disease. **Gut**, London, v. 26, p. 667-671, 1985.

VOLTA, U.; LAZZARI, R.; CAFARO, C.; COLLINA, A.; BALDONI, A.; BALLI, F. Validità degli anticorpi antigliadina nella diagnosi di malattia celiaca. **Pediatr Med Chir**, Washington, v. 8, p. 605-610, 1986.

WALKER-SMITH, J.A. Doença celíaca. In: WALKER-SMITH, J.A. **Doenças do aparelho digestivo na infância**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1980. cap. 4, p. 90-136.

WALKER-SMITH, J.A.; GUANDALINI, S.; SCHMITZ, J.; SHMERLING, D.H.; VISAKORPI, J.K. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. **Arch Dis Child**, London, v. 65, p. 909-911, 1990.

WILLIAMSON, N.; ASQUITH, P.; STOKES, P.L.; JOWETT, A.W.; COOKE, W.T. Anticonnective tissue and other antitissue antibodies in the sera of patients with celiac disease compared with the findings in a mixed hospital population. **J Clin Pathol**, [s.l.], v. 29, p. 484-494, 1976.