

Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde - FS  
Graduação em Farmácia

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DOENÇA CELÍACA

LAISE ANANIAS DE MORAIS

Brasília – DF,

2015

Universidade de Brasília  
Faculdade de Ciências da Saúde - FS  
Graduação em Farmácia

## DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DOENÇA CELÍACA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito obrigatório para obtenção do grau de Farmacêutico.

Orientadora: Prof. Dra. YANNA KARLA DE MEDEIROS NÓBREGA

Brasília – DF,

2015

LAISE ANANIAS DE MORAIS

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DOENÇA CELÍACA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de Brasília, como requisito obrigatório para obtenção do grau de Farmacêutico.

Aprovada em 03 de julho de 2015

Yanna Karla de Medeiros Nóbrega  
Prof. Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega

A Deus que nos criou, e foi criativo nesta tarefa. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Ananias Ana de Moraes e Luis das Chagas Moraes pelo apoio incondicional e por todo amor que sempre me deram.

Ao meu querido noivo Glauber Lindemberg do Espírito Santo por seu amor, por sempre me apoiar nos momentos difíceis, pelo seu incentivo, pela sua paciência e compreensão e por ser um grande exemplo profissional.

A minha orientadora professora Dra. Yanna Karla de Medeiros Nóbrega por sua dedicação e pelas sugestões que contribuíram positivamente para realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de curso, Luma Filiú, Karla Braz, Valéria Santos, Glívia Santana, Priscila Dorneles, João Carlos e tantos outros por todo carinho e apoio, pela união durante esses mais de cinco anos de graduação, pelo apoio mútuo e por sempre estarem presentes quando precisei.

A minha prima e madrinha Rosa Oliveira que sempre muito experiente me deu apoio, carinho e palavras positivas que deram força para continuar.

A todos meus amigos, incluindo meus queridos primos e primas, que sempre me incentivaram, pela compreensão, paciência e carinho.

Ao corpo de docentes do curso de Farmácia Noturno da Universidade de Brasília, em especial Dra. Angélica Amorim Amato, Dra, Yanna Karla de Medeiros Nóbrega, Dr. Francisco de Assis Rocha Neves, Dra. Patrícia Medeiros de Souza e Dr. Rafael Mota Pinheiro por serem grandes exemplos na minha vida acadêmica, por promoverem o conhecimento e experiências de aprendizado e por todas as oportunidades ofertadas.

A todos os profissionais da secretaria do curso de Farmácia, em especial as coordenadoras Dra. Sílvia Ribeiro de Souza e Dra. Dayde Lane Mendonça, pela dedicação e competência.

## RESUMO

A doença celíaca (DC) é uma enteropatia autoimune causada por glúten em indivíduos geneticamente predispostos, que desencadeia um estado inflamatório da mucosa duodenal e pode levar à atrofia completa das vilosidades. Os fatores mais bem caracterizados de susceptibilidade genética em DC são os genes HLA responsáveis pela síntese MHC de classe II conhecidos como HLA-DQ2 e HLA-DQ8. A DC era subdiagnosticada, entretanto, com o desenvolvimento de marcadores sorológicos específicos para DC, o diagnóstico e o monitoramento dos pacientes com a doença melhoraram. Atualmente a prevalência de DC é estimada em 1% na população geral. Com base nestes dados, o presente estudo pretende avaliar a prevalência e a predisposição genética de indivíduos suspeitos de terem a doença utilizando testes sorológicos anti-tTG IgA, anti-EMA IgA e genotipagem. Para o estudo foram utilizadas amostras de 20 pacientes sintomáticos, para a dosagem de tTG IgA e EMA IgA. Para a genotipagem, foram pesquisados os genes HLA-DQ2 e DQ8 através da técnica qPCR e os resultados foram confirmados por PCR SSP. Os resultados revelaram alta especificidade para o teste EMA IgA (100%), comparado ao teste tTG IgA (85%) e a prevalência de DC no grupo foi de 100%. A tipagem dos genes revelou que não houve amostras sem a presença dos alelos predisponentes para a doença, mesmo aquelas que inicialmente apresentaram negatividade para o teste tTG-IgA, e positividade apenas ao anti-EMA IgA. Portanto, a predisposição genética encontrada nestes pacientes foi 100%. Diante destes achados é possível concluir que uso de marcadores sorológicos, mais especificamente, tTG IgA e EMA IgA são adequados na abordagem de diagnóstico de DC. E que o teste genético HLA usado para exclusão da doença, pode ser utilizado para confirmar o diagnóstico da DC ou a predisposição genética à doença, quando o resultado é positivo, já que HLA DQ2 ou DQ8 está presente em aproximadamente 95% dos pacientes que têm DC.

**Palavras chaves:** *doença celíaca, diagnóstico laboratorial, HLA, tTG e EMA.*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Vídeo endoscopia do intestino delgado.....	11
<b>Figura 2:</b> Fatores envolvidos na fisiopatologia da DC.....	15
<b>Figura 3:</b> Receptor CD71 medeia o transporte de complexos de imunoglobulina A na DC...17	
<b>Figura 4:</b> Mecanismos descritos da resposta imunitária na Doença Celíaca.....	18
<b>Figura 5:</b> Mecanismos de lesão da mucosa na DC.....	24
<b>Figura 6:</b> Aplicação clínica do teste de HLA.....	26
<b>Figura 7:</b> Representação gráfica das curvas de melting do alelo DQA1*05 e do controle da reação (HGH).....	36
<b>Figura 8:</b> Fotografias de testes EMA IgA.....	38

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sequência de <i>iniciadores</i> utilizados para q-PCR.....	33
<b>Tabela 2:</b> Resumo das condições das reações de qPCR.....	34
<b>Tabela 3:</b> Condições da qPCR para os alelos DQA1*05, DQB1*02 e DQA1*03.....	34
<b>Tabela 4:</b> Condições da qPCR para o alelo DQB1*03:02.....	35
<b>Tabela 5:</b> Resultados dos exames de TTG e EMA.....	38



## SUMÁRIO

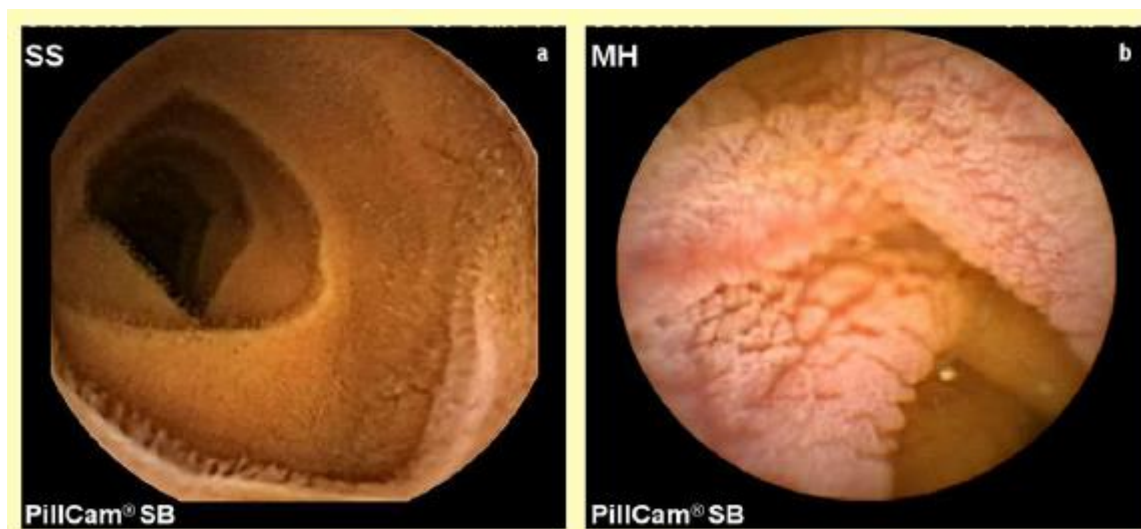
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
1.1	DEFINIÇÃO E HISTÓRICO .....	11
1.2	PATOGÊNESE .....	13
1.3	EPIDEMIOLOGIA.....	18
1.4	APRESENTAÇÃO CLÍNICA .....	20
1.5	DIAGNÓSTICO .....	21
	<i>1.5.1 Testes Sorológicos.....</i>	<i>22</i>
	1.5.1.1 Anticorpos Gliadina deamidada (AGA).....	22
	1.5.1.2 Anticorpos transglutaminase tecidual (tTG).....	22
	1.5.1.3 Anticorpos anti-Endomísio (EMA) .....	24
	<i>1.5.2 Testes Genéticos .....</i>	<i>25</i>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>28</b>
3.1	TIPO DE ESTUDO .....	28
3.2	POPULAÇÃO ESTUDADA .....	28
3.3	COLETA DA AMOSTRA .....	29
3.4	ANTICORPOS ANTI-TRANSGLUTAMINASE TECIDULAR IGA (tTG2-IGA).....	30
	<i>3.4.1 Princípio do método tTG2-IgA.....</i>	<i>30</i>
3.5	ANTICORPOS ANTI-ENDOMÍCIO (EMA) .....	31
	<i>3.5.1 Princípio do método anti-Endomísio (EMA).....</i>	<i>31</i>
3.6	EXTRAÇÃO DO DNA E QUANTIFICAÇÃO .....	31
3.7	ANÁLISE DO DNA EXTRAÍDO .....	32
3.8	TIPAGEM HLA DQ2 E DQ8.....	32
3.9	ANÁLISE DOS DADOS PROCESSADOS PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL .....	35
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>37</b>
4.1	ANÁLISE DESCRITIVA DA POPULAÇÃO ESTUDADA .....	37
4.2	ANTICORPOS ANTI-TRANSGLUTAMINASE TECIDUAL IGA (tTG2-IGA).....	37
4.3	ANTICORPOS ANTI-ENDOMÍCIO (EMA) .....	37
4.4	TIPAGEM HLA DQ2 E DQ8.....	39
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>

<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Definição e histórico

A doença celíaca (DC) é uma desordem crônica e imuno-mediada, que se manifesta com uma variedade de sintomas clínicos provocados pelo consumo de glúten e prolaminas relacionadas, em indivíduos geneticamente susceptíveis (TONUTTI & BIZZARO, 2014; SZAJEWSKA et al, 2015). A DC é caracterizada por lesão da mucosa intestinal em graus variados e má absorção de nutrientes (BARBERO et al, 2014), a mucosa do intestino delgado afetada resulta em graus progressivos de inflamação e destruição das vilosidades, com consequente indução da hiperplasia da cripta (Figura 1). A destruição começa no duodeno e ao longo do tempo avança distalmente para o íleo. A perda de vilosidades que absorvem o fluido, e hipertrofia das criptas que produzem fluido, resultam em excesso de fluido no lúmen do intestino delgado (MOHAMED et al, 2013).



**Figura 1.** Vídeo endoscopia do intestino delgado, (a) Normal com vilosidades visíveis (b) Fissura e atrofia. Fonte: WALKER. & WOODWARD, 2012.

O intestino humano se desenvolveu, ao longo de mais de 2 milhões de anos em um órgão sofisticado que poderia tolerar antígenos de alimentos. Mas com a revolução agrícola

do período neolítico gerou toda uma bateria de alimentos previamente desconhecidos ao homem, incluindo proteínas de vaca, cabra e leite de burra, bem como os ovos de aves e cereais. A maioria dos indivíduos foram capazes de se adaptar. Entre os que não podiam, surgiram as intolerâncias alimentares, e entre elas a DC, uma intolerância alimentar permanente (GUANDALIN, 2007).

Aretaeus da Capadócia, um médico grego que viveu no primeiro século d.C., escreveu sobre "afecção celíaca", a quem inicialmente chamou de "koiliakos", depois da palavra grega "koelia" (abdômen) (GUANDALIN, 2007), e descreveu a doença como sendo uma afecção intestinal associada à diarreia prolongada, atrofia do corpo e comprometimento do estado geral. Somente séculos depois, em 1888 o médico inglês Samuel Gee chamou a atenção novamente para essa doença, reconhecendo a importância da dieta no manejo dos pacientes celíacos, apesar de não ter identificado o fator desencadeante (AURICCHIO, 1996).

A importância da dieta foi confirmada em 1940 por Willem Karel Dicke, pediatra holandês que associou o consumo de cereais ao desenvolvimento de DC. No entanto, ainda não eram conhecidos quais cereais continham o fator desencadeante da DC. Somente após a Segunda Guerra Mundial, em colaboração com van Kamer e Weyers, Dicke identificou que a gliadina, componente do glúten, era responsável pela síndrome mal absorvível. Depois desse achado foi definitivamente preconizada a dieta livre de glúten como único tratamento de DC (VAN BERGE-HENEGOUWEN & MULDER, 1993).

Em meados da década de 60, tornou-se claro que a DC pode ser diagnosticada com a biópsia jejunal mostrando atrofia das vilosidades. No entanto, uma vez que a lesão poderia ter outras causas, a comunidade médica exortou os médicos não diagnosticar DC até que pudesse ser provado que o glúten fosse realmente a causa da atrofia da mucosa. Os passos foram variados: em primeiro lugar, uma completa remissão clínica com uma dieta isenta de glúten, seguida da documentação da normalização da lesão, e finalmente por sua recorrência, quando

o glúten foi reintroduzido na dieta. Estes critérios foram formalizados em 1969 por um painel de especialistas na Sociedade Européia de Gastroenterologia Hepatologia e Nutrição Pediátrica (*European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition -ESPGHAN*) como os critérios de *Interlaken*, que há mais de 20 anos atuou em todo o mundo como o padrão de diagnóstico aceito (GUANDALIN, 2007; HUSBY et al, 2012).

A primeira categoria a ser descoberta foram os anticorpos anti-gliadina, detectado e reportado por Berger em 1964. Sete anos mais tarde Seah et al. identificaram pela primeira vez não uma proteína anti-alimentar, mas verdadeiros autoanticorpos no soro de crianças com DC: os anticorpos anti-reticulina, embora levou anos antes da sua utilidade de diagnóstico (GUANDALIN, 2007).

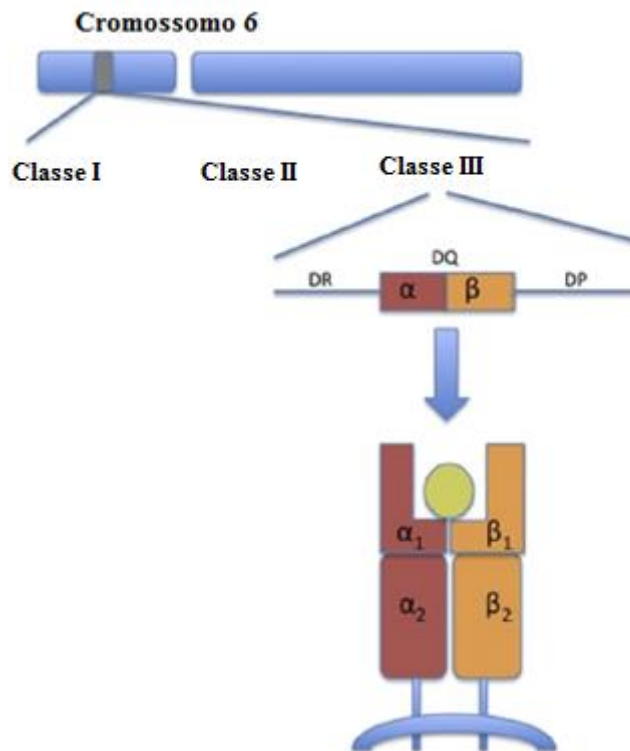
No final dos anos 80, um grande estudo italiano multicêntrico demonstrou que, baseando-se em critérios clínicos e laboratoriais rigorosos, um diagnóstico correto de DC pode ser alcançado em 95% dos casos, limitando à biópsia inicial, e novas diretrizes diagnósticas foram publicadas em 1990 pela ESPGHAN, as orientações que estão até hoje. Depois de 1990, a DC foi cada vez mais aceita como um exemplo de uma doença autoimune, associada com um gene específico (HLA DQ2 ou DQ8) e o autoantígeno em falta foi finalmente identificado na enzima transglutaminase tecidual. Finalmente, houve aceitação universal que a DC é uma condição autoimune, cujo gatilho (glúten) e autoantígeno (transglutaminase tecidual) são conhecidos (GUANDALIN, 2007).

## **1.2 Patogênese**

Enquanto a patogênese da doença e fisiopatologia ainda possuem lacunas a serem preenchidas, sabe-se que a DC ocorre a partir da interação de fatores ambientais, genéticos e imunológicos (KUPFER & JABRI, 2012).

A DC tem um forte componente hereditário, os fatores mais bem caracterizados de susceptibilidade genética em doença celíaca são os genes HLA de classe II conhecidos como HLA-DQ2 e HLA-DQ8 (Figura 2), as moléculas responsáveis pela síntese de receptores responsáveis pela apresentação de antígenos às células imunes (LEIVERS et al, 2014; SCHUPPAN & ZIMMER, 2013).

HLA é o conjunto de genes que codificam as moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC), em seres humanos. Estes genes residem no cromossoma 6, são divididos em três classes (I-III) e estão envolvidos na regulação da resposta imunitária. Existem dois tipos de moléculas de HLA-DQ2, a DQ2.5, codificadas pelos alelos DQA1\*0501 e DQB1\*02, com um elevado risco relativo de DC e DQ2.2, codificados pelo DQA1\*0201 e DQB1\*02, com um baixo risco relativo. O haplótipo de HLA-DQ8 é codificado pelos alelos DQA1\*03:01 e DQB1\*03:02, com alto risco relativo a DC. DQ2 e DQ8 positivos reconhecem linfócitos T de determinados peptídeos de glúten, quando apresentados por células apresentadoras de antígenos (APC's) (KNEEPKENS & BLOMBERG, 2012).

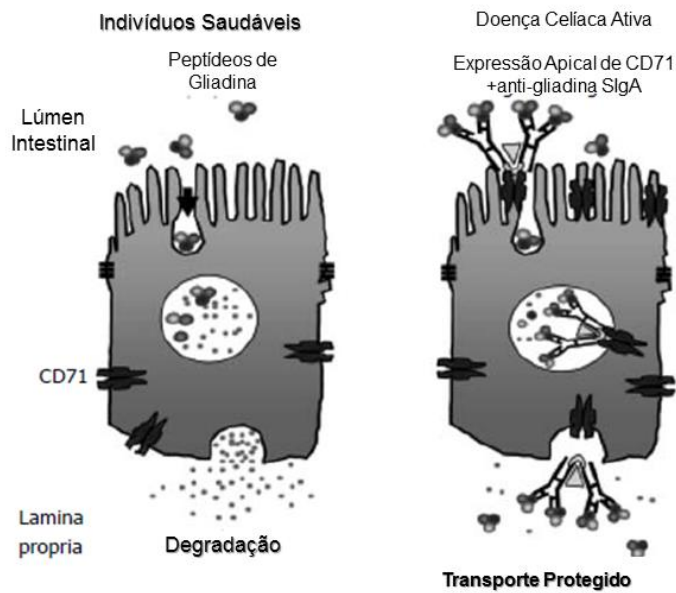


**Figura 2 – Fatores envolvidos na fisiopatologia da DC.** Os genes que codificam as moléculas de HLA são encontrados no MHC do cromossoma 6. Moléculas HLA envolvidas em DC são codificadas numa região conhecida como de classe II; pelos genes -DQ (outros genes de classe II incluem -DR e -DP). Os genes da classe II HLA-DQ codificam as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  que estão associadas com heterodímeros na superfície de células apresentadoras de antígeno. Os genes HLA-DQA1 codificam uma cadeia  $\alpha$  (A1 e A2) e os genes HLA-DQB1 codificam duas cadeias  $\beta$  (B1 e B2). Adaptado de KUPFER & JABRI, 2012.

O glúten é um complexo proteico encontrado em cereais, tais como trigo, centeio e cevada que são largamente utilizados na dieta humana em todo o mundo, sua composição é de prolamina e glutamina (ARONSSON et al, 2015; KUPFER & JABRI, 2012). As prolaminas são a maior parte das proteínas responsáveis pela reação imune na DC. Além disso, as prolaminas são encontradas em vários grãos, tais como o trigo (gliadina), a cevada (hordeína) e o centeio (secalina), o milho (zeína) e como uma proteína menor, avenina em aveia (KUPFER & JABRI, 2012; GUJRAL et al, 2012). Devido ao seu elevado teor de glutamina e padrões com sequências específicas, as prolaminas são resistentes às enzimas proteolíticas gastrointestinais e são excelentes substratos para a deamidação pela transglutaminase do tipo 2 (tTG2) (KNEEPKENS & BLOMBERG, 2012).

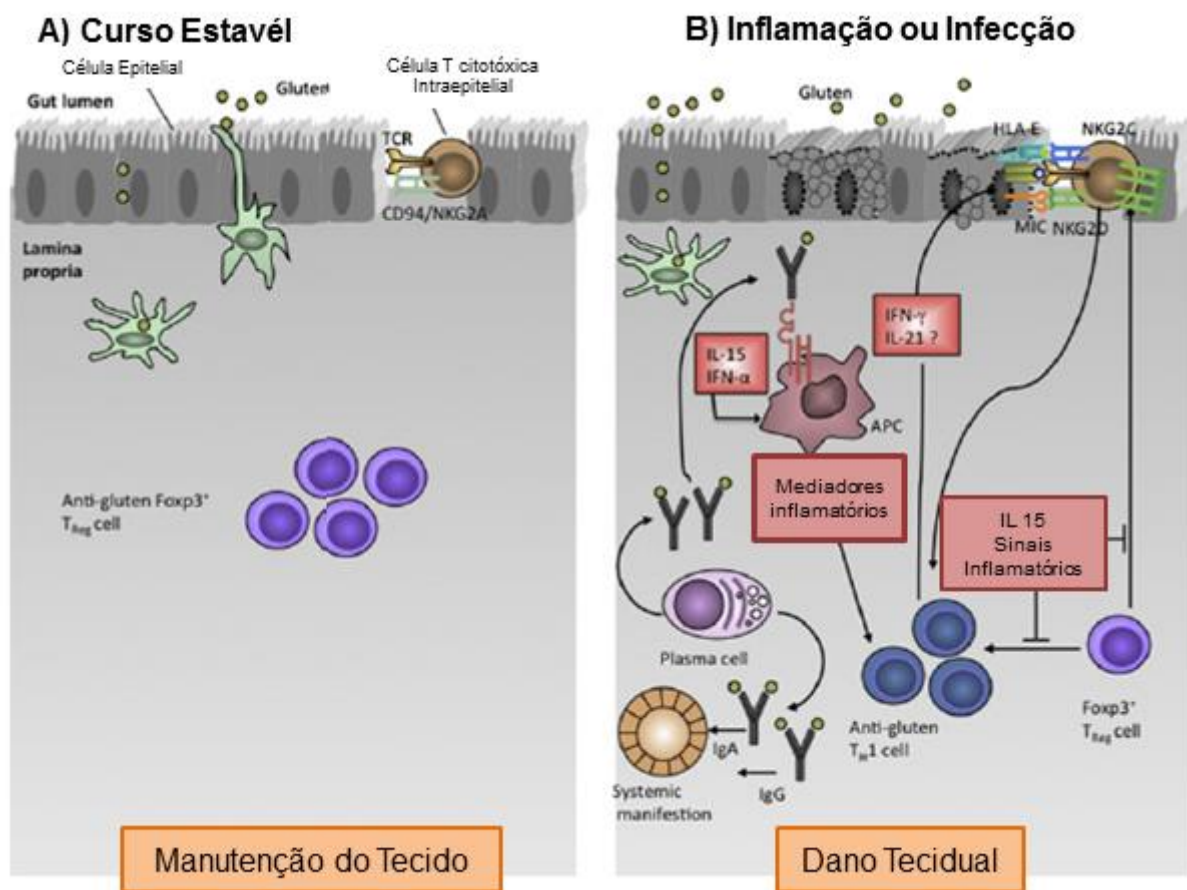
A digestão gastrointestinal incompleta do glúten leva ao aparecimento de peptídeos derivados da gliadina. Os fragmentos peptídicos que foram resistentes à degradação podem ser transportados através do epitélio principalmente por três vias, (1) por via transcelular, onde o glúten é endocitado em lisossomos, que o degradam em pequenos peptídeos não imunogênicos, (2) Por via paracelular, através da regulação das junções TJ responsáveis pela união das células epiteliais, promovendo uma alteração da permeabilidade celular e consequentemente a entrada de peptídeos da gliadina na mucosa, como por exemplo, a regulação através de zonulina produzida pelas células epiteliais de pacientes celíacos que alteram a permeabilidade entre as células epiteliais (HEYMAN & MENARD, 2009; FASANO, 2011); (3) por transporte transepitelial, em células epiteliais de pacientes celíacos, onde há aumento na expressão de CD71 ou TfR (receptor de transferrina) (Figura 3). Esse receptor reconhece o IgA complexada com gliadina através da porção Fc da imunoglobulina, e libera essa associação sem processamento na lâmina própria (MATYSIAK-BUDNIK *et al*, 2008). Os peptídeos são então deamidados pela tTG2, uma enzima que catalisa a hidrólise de glutamina para resíduos de ácido glutâmico. A deamidação mediada pela enzima tTG2 introduz cargas negativas aos peptídeos da gliadina ricos em glutamina de modo a que a sua avidéz pelo MHC oriundo do HLA DQ2 e DQ8 é aumentada (GUJRAL *et al*, 2012; MATOORI *et al*, 2013).





**Figura 3 - Receptor CD71 medeia o transporte de complexos de imunoglobulina A na DC.** Gliadina ligada ao receptor CD71 expressa em indivíduo com DC ativa permite o transporte de gliadina protegido para a lâmina própria. Adaptado de GUJRAL et al, 2012.

As APC's apresentam o antígeno reativo relacionado ao glúten por meio das células T CD4<sup>+</sup>, que o ativam. Estes linfócitos T secretam citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, INF $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ) e induzem a resposta de anticorpos específicos pela ativação do glúten (Figura 4). As células T ativadas na lâmina própria e no interior do epitélio são citotóxicos, com efeitos incluindo a apoptose dos enterócitos, remodelação atrófica da mucosa, e má absorção (SCHUPPAN & ZIMMER, 2013). E ainda, a desregulação na imunidade inata também está implicada na patogênese da DC, já que enterócitos, células dendríticas e macrófagos são recrutados. Os macrófagos secretam citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-15 (IL-15), que promovem uma citotoxicidade celular anormal nos linfócitos intraepiteliais (IEL) (MATOORI et al, 2013).



**Figura 4 – Mecanismos descritos da resposta imunitária na Doença Celíaca (DC).** (a) Em indivíduos saudáveis, o glúten é tolerado na presença de células T regulatórias. Além disso, os linfócitos intraepiteliais (IELs) expressam receptores inibitórios natural killer (NK) que impedem a ativação de células T não controlada. (b) com inflamação (por exemplo, DC), HLA-DQ2 ou -DQ8 ligam-se ao glúten em células apresentadoras de antígeno e apresentam às células T conduzindo a uma resposta de células T que libera interferon (IFN)  $\gamma$  e, possivelmente, a interleucina (IL) -21, levando a danos epiteliais. A regulação de IL-15 e IFN- $\alpha$  na lâmina própria induzem as células dendríticas a adquirir um fenótipo pró-inflamatório. O sistema imunológico humoral produz anticorpos específicos para glúten que medeiam às manifestações sistêmicas. Adaptado de KUPFER & JABRI, 2012.

Além disso, há vários outros fatores ambientais que podem ser relacionados ao desenvolvimento de DC, incluindo a microbiota intestinal comensal, infecções na infância, o tipo de parto, a introdução de glúten para bebês e a amamentação (GUJRAL et al, 2012).

### 1.3 Epidemiologia

A prevalência de DC durante as últimas décadas tem aumentado de forma significativa. E foi com a disponibilidade e generalizada utilização de marcadores sorológicos específicos e

sensíveis que se resultou em notáveis avanços na compreensão da prevalência e de seu aumento (TONUTTI & BIZZARO, 2014; SCHUPPAN & ZIMMER, 2013; KNEEPKENS & BLOMBERG, 2012; TRIGONI et al, 2014). Até meados da década de 70 e 80, a prevalência de DC havia sido subestimada por ter uma grande variedade de apresentações clínicas, dentre elas manifestações assintomáticas, e ser considerada uma doença rara e restrita a Europa (caucasianos). Mas agora é considerada uma das doenças genéticas mais comuns no Ocidente, com prevalência de 1% (GUJRAL et al, 2012). A prevalência de DC na população em geral varia consideravelmente de <0,25% a > 1%, mas pode ser tão elevado quanto 3% (SZAJEWSKA et al, 2015).

A DC é cada vez mais reconhecida no Oriente Médio e Norte da África, onde está se tornando um crescente problema econômico de saúde. Estudos recentes revelam uma prevalência de DC de 0,5% para 1,0% entre os americanos e europeus, bem como nas populações da Austrália, África do Norte, Oriente Médio, Índia, e provavelmente também o norte da China (dependendo da prevalência de HLA DQ2 e DQ8) (SCHUPPAN & ZIMMER, 2013). Em populações na Finlândia e no México, e inclusive entre as crianças saharauis do Norte de África, onde a prevalência varia 0,28% e 5,6% e afeta 5,6% da população infantil, uma das mais elevadas do mundo (CATASSI et al, 1999; FASANO et al, 2004; SCHUPPAN & ZIMMER, 2013).

Um estudo internacional de triagem sorológica (Mustalahti et al, 2010) revelou diferenças nas populações em toda a Europa com valores elevados na Finlândia (2,4%) e baixos na Alemanha (0,3%), enquanto que a prevalência na Itália foi de 0,7% (REILLY & GREEN, 2012). Não se sabe por que a DC é menos comum na Alemanha do que no resto da Europa. As possíveis razões incluem diferenças de nutrição (maior taxa de aleitamento materno, menor ingestão de glúten na infância) ou maior prevalência de infecções (SCHUPPAN & ZIMMER, 2013).

Na América do Sul a DC era considerada rara, entretanto, estudos realizados no Brasil e na Argentina mostram que a doença é comum também nesses países (GUJRAL et al, 2012). Estudos de rastreamento no Brasil mostram que a prevalência de DC varia de 1:119 a 1:417 na população geral (CROVELLA et al, 2007; PRATESI et al, 2003) e de 1:214 a 1:681 em doadores de sangue (OLIVEIRA et al, 2007; GANDOLFI et al, 2007). Na Argentina, a prevalência encontrada foi de 1:167 em 2000 adultos (GOMEZ et al, 2001).

Em resumo, os dados disponíveis sugerem que a incidência de DC está realmente aumentando e que a doença é atualmente muito mais comum em algumas áreas do que anteriormente apreciado. O estudo de parâmetros relevantes (como ingestão de glúten e genótipos predisponentes) em novas áreas geográficas podem subsidiar uma maior conscientização referentes à prevalência e a detecção da DC (CATASSI et al, 2014).

#### **1.4 Apresentação Clínica**

A DC é hoje reconhecida como uma doença que apresenta sinais e sintomas clínicos muito diversos, e que pode afetar pessoas de qualquer idade, de muitas raças e grupos étnicos. (FASANO & CATASSI, 2012). O espectro clínico da DC varia de raros sinais ou sintomas de forma clara a formas sintomáticas com síndrome de má absorção grave (AGARDH et al, 2015; MOHAMED et al, 2013). Os sintomas da DC (Quadro 1) podem ser divididos em sintomas gastrointestinais (típico) e extra-intestinais (atípico) (HUSBY & MURRAY, 2014).

Os sintomas gastrointestinais incluem os relacionados com má absorção, tais como diarreia crônica, distensão abdominal, constipação crônica, vômitos, caquexia, desnutrição grave e perda de peso. Mais raramente, outras doenças, como distúrbios eletrolíticos, hipotensão e letargia podem acompanhar o quadro clínico. Os sintomas extraintestinais da DC envolvem fadiga, anemia por deficiência de ferro, dermatite herpetiforme, hipoplasia do esmalte dental, ulcera aftosa, artralgia, artrite, osteopenia e osteoporose, fraturas, níveis

ligeiramente elevados e AST e ALT (GUANDALINI & ASSIRI, 2014; HUSBY & MURRAY, 2014).

Do ponto de vista endocrinológico, baixa estatura, puberdade tardia, infertilidade inexplicada e abortos espontâneos em mulheres têm sido descritos associados com DC. Apresentações neurológicas incluem ataxia cerebelar, epilepsia idiopática, neuropatia periférica, e especialmente comum, dores de cabeça recorrentes (GUANDALINI & ASSIRI, 2014; RIVERA et al, 2013).

### **1.5 Diagnóstico**

Os pilares do diagnóstico de DC incluem a presença de sinais e sintomas clínicos, soropositividade para autoanticorpos anti-transglutaminase (anti-tTG), e anti-endomísio (anti-EMA), presença de qualquer um dos haplótipos de risco HLA DQ2 ou DQ8, e histológico típico em biópsias intestinais, caracterizado por atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas com linfócitos intra-epiteliais elevados. Nenhum desses quatro critérios por si só é suficiente para comprovar o diagnóstico. A relação entre a expressão clínica, presença de alelos HLA, os níveis tTG, e histologia em pacientes sintomáticos e assintomáticos com DC detectada permanece indefinida (AGARDH et al, 2015).

A Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica, Hepatologia e Nutrição (ESPGHAN) sugeriu que a biópsia duodenal pode não ser necessária em todos os casos. Novas linhas de orientação incluem omissão da biópsia se a concentração de anticorpos específicos anti-tTG IgA para DC exceder 10 vezes o limite superior normal (LSN 10) e se outros critérios forem preenchidos, como por exemplo, crianças e adolescentes com sinais típicos ou sintomas sugestivos de DC (WOLF et al, 2012).

### 1.5.1 Testes Sorológicos

O diagnóstico sorológico é indicado para os pacientes com suspeita ou com risco da doença. A DC é caracterizada pela presença de diferentes anticorpos no soro que são feitos contra os anticorpos da gliadina deamidada (AGA), anticorpos contra a transglutaminase tecidual (tTG) e anticorpos anti-endomísio (EMA). Em geral, estes testes são úteis para o diagnóstico de DC, embora o desempenho de diagnóstico possa ser diferente para cada teste (LEBWOHL et al, 2012).

#### 1.5.1.1 Anticorpos Gliadina deamidada (AGA)

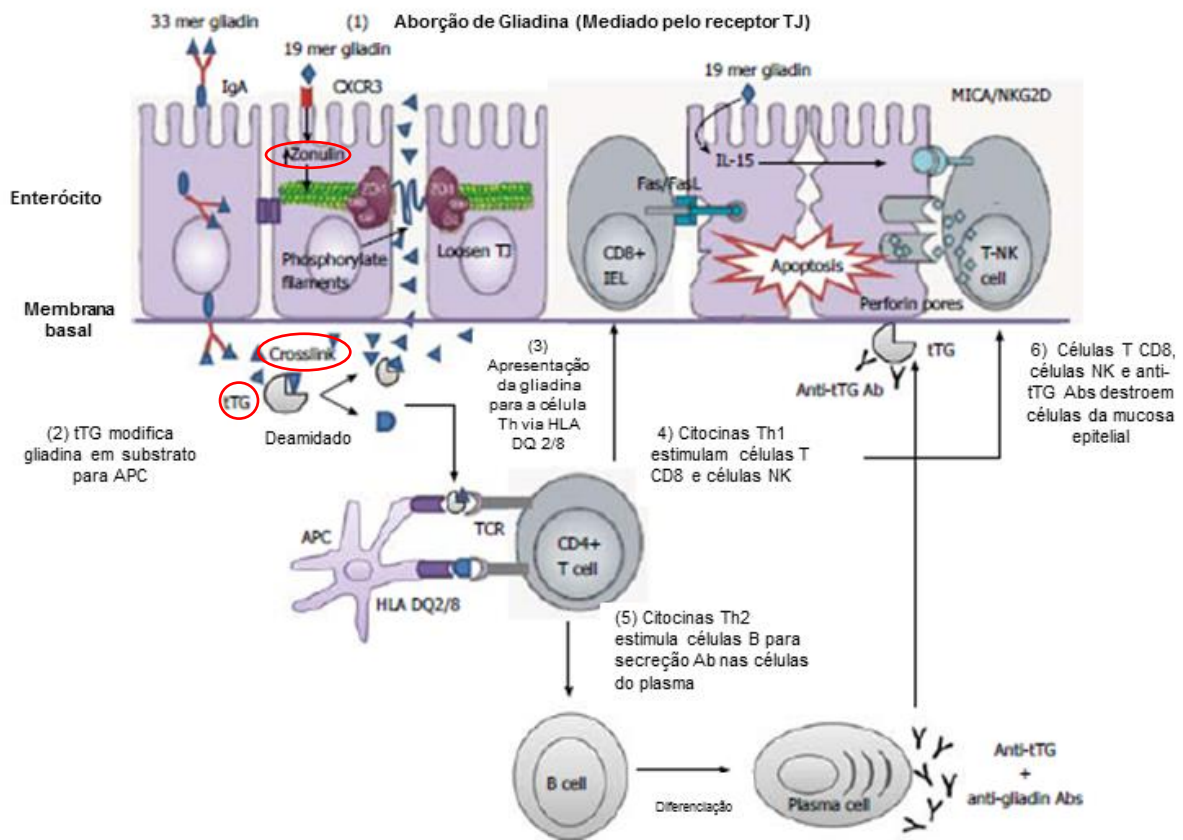
Anticorpos anti-gliadina convencionais já não são recomendados devido à menor sensibilidade e especificidade em comparação com outros testes sorológicos disponíveis. No entanto, há um grande interesse no uso de nova geração peptídeos deamidado de gliadina (DGP) porque estes novos testes têm melhorado a acurácia diagnóstica em comparação com anticorpos anti-gliadina convencionais (RASHTAK et al, 2008).

#### 1.5.1.2 Anticorpos transglutaminase tecidual (tTG)

A descoberta da enzima tTG como o principal autoantígeno de células B, foi um grande avanço que destaca a face autoimune da patogênese da DC e levou ao desenvolvimento de ensaios de rotina para anti-tTG2 IgA (HUSBY & MURRAY, 2014). Esta enzima pertence a uma família de enzimas cálcio dependente que catalisam o *crosslinking* de proteínas (Figura 6). Ela tem várias funções, incluindo deamidação de peptídeos da gliadina (LEBWOHL et al, 2012).

A DC é caracterizada pela presença de auto-anticorpos que são gerados como resultado da resposta imunológica ao glúten e que são altamente específicos para esta

condição. Como tal, eles têm também sido extensivamente validados e utilizados para fins de diagnóstico e de seguimento (GUANDALINI & ASSIRI, 2014). A relação entre o nível de anticorpos associados a DC, principalmente anticorpos anti-tTG2 IgA e o grau de inflamação da mucosa duodenal foi abordado na literatura durante os últimos 5 anos. O aumento da concentração de anticorpos anti-IgA tTG2 como medido por ELISA quantitativo foi associada com graus mais graves de atrofia das vilosidades, tal como definido pela classificação de Marsh (HUSBY & MURRAY, 2014).



**Figura 5** - Mecanismos de lesão da mucosa na DC. (1) A gliadina cruza os enterócito pelas junções paracelulares (TJ), como consequência do aumento da liberação de zonulina. (2) A transglutaminase tecidual (tTG) deamida os peptídeos de gliadina que é então reconhecido pelo antígeno leucocitário humano (HLA) -DQ2 ou -DQ8). (3) APC apresenta o peptídeo tóxico às células T CD4<sup>+</sup>. As células T CD4<sup>+</sup> ativadas produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias. (4) As citocinas T auxiliares 1 (Th1) promovem o aumento da citotoxicidade de linfócitos intraepiteliais (IELs) e células natural killer (NK) T que causam a morte apoptótica dos enterócitos. (5) A produção de citocinas Th2 induzem a expansão clonal de células B, que se diferenciam em células plasmáticas e secretam anticorpos. (6) A Interação entre com o tTG extracelular e anti-tTG-auto-anticorpos podem induzir dano epitelial. Adaptado de GUJRAL et al, 2012.

A medição de anticorpos anti-tTG IgA no soro é recomendado para os testes iniciais em pessoas que não têm deficiência de IgA devido à sua alta sensibilidade (98%) e elevada especificidade (96%) (GUANDALINI & ASSIRI, 2014; FASANO & CATASSI, 2012). Os anticorpos anti-tTG IgG podem ser medidos em pessoas com deficiência de IgA (LEBWOHL et al, 2012).

A medição pode ser realizada em amostras de soro ou plasma por meio de diferentes métodos imunométricos (ELISA, radioimunoensaio, ensaios fluorimétricos, etc). Os substratos podem ser fígado de cobaias (ensaios de primeira geração), glóbulos vermelhos humanos e recombinante humano. Os testes anti-tTG fornecem resultados quantitativos expressos em unidades arbitrárias (UA) e calculado com base em padrões de referência específicos para o teste (TONUTTI & BIZZARO, 2014; LEBWOHL et al, 2012).

### **1.5.1.3 Anticorpos anti-Endomísio (EMA)**

O teste anti-EMA IgA tem perto de 100% de especificidade e sensibilidade e ainda é o padrão ouro para o diagnóstico de DC (GUANDALINI & ASSIRI, 2014). A detecção de anticorpos anti-EMA é realizada utilizando-se a técnica de imunofluorescência indireta e cortes histológicos esôfago de macaco, jejuno humano, ou do cordão umbilical humano como substrato (LEBWOHL et al, 2012). Este teste tem algumas desvantagens, incluindo a alta variabilidade inter observador (TONUTTI & BIZZARO, 2014; GIERSIEPEN et al, 2012). É semi-quantitativo, demorado e de custo moderado. No entanto, ensaios anti-EMA podem ser clinicamente muito úteis, se o resultado do teste de anti-tTG IgA é ambíguo. Um teste IgA EMA positivo é uma forte evidência para DC (LEBWOHL et al, 2012).



### 1.5.2 Testes Genéticos

A grande maioria dos pacientes com DC (95%) carregam o heterodímero HLA DQ2 em cis ou trans, e no restante dos pacientes o DQ8 (KNEEPKENS & BLOMBERG, 2012). Assim, a ausência destes heterodímeros tem um elevado valor preditivo negativo.

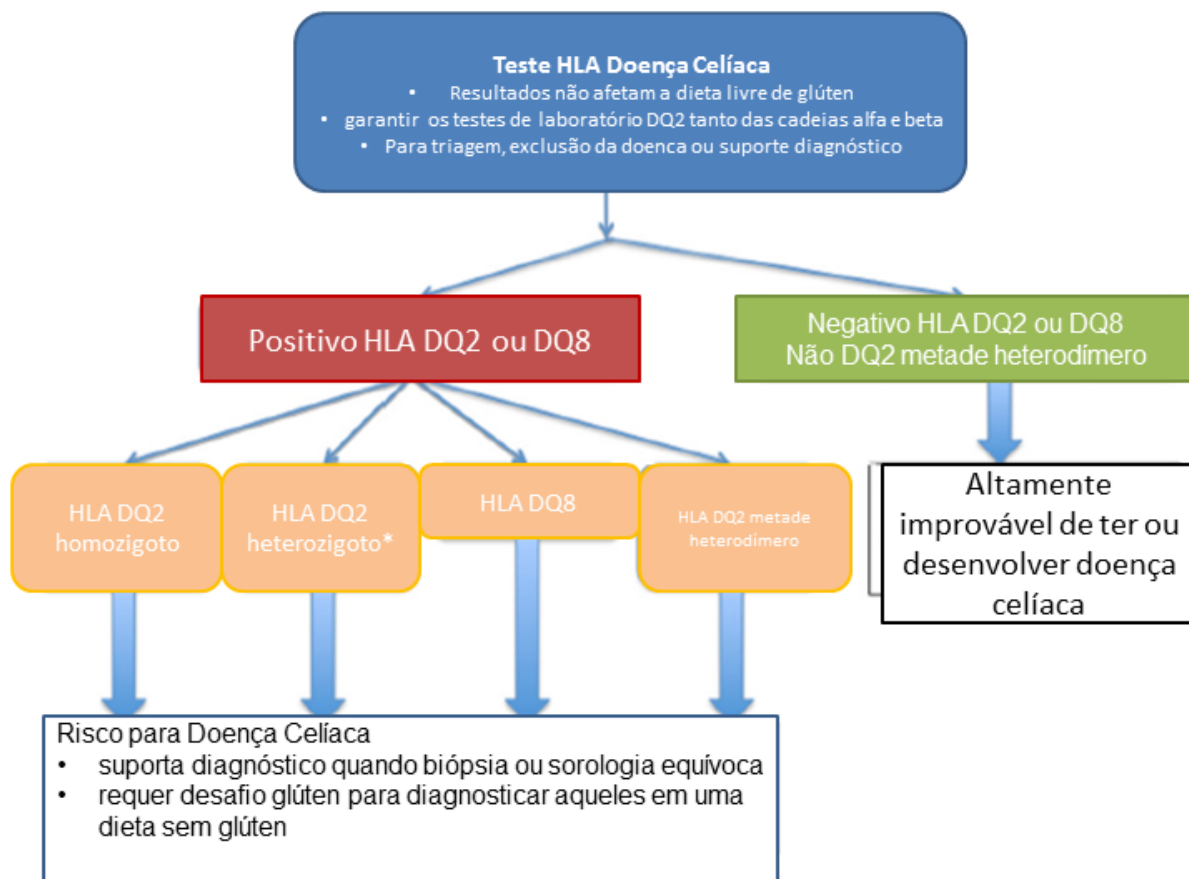


Figura 6. **Aplicação clínica do teste de HLA.** Testes HLA devem ser considerados para rastrear, exclusão da doença ou para confirmar o diagnóstico. O teste não é afetado por uma dieta livre de glúten. Os provedores devem garantir que tanto DQ2 cadeias alfa e beta sejam testadas. Se um paciente carrega HLA-DQ2 ou DQ8, eles carregam um fator de risco para DC. Indivíduos portadores de HLA-DQ2 meio-heterodímero, também estão em risco. Se o HLA-DQ2 e DQ8 não estão presentes, é altamente improvável o risco de DC e a triagem de anticorpos não é necessária.

Adaptado de KUPFER & JABRI, 2012.

Os testes genéticos não aumentam o desempenho do diagnóstico em comparação a testes isolados. Assim, a genotipagem HLA-DQ não é indicada na avaliação inicial da DC. Estes testes podem ser úteis para excluir diagnóstico de DC (teste genético negativo) quando

o diagnóstico é incerto ou quando os pacientes já fazem dieta sem glúten, já que a genotipagem não é afetada pela exclusão do glúten (LEBWOHL et al, 2012).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral do trabalho é avaliar os métodos utilizados para o diagnóstico laboratorial de DC nos pacientes que fazem uso do ambulatório de Doença Celíaca do Hospital Universitário de Brasília (HUB). E para isso se faz necessário:

- I. Avaliar a prevalência de testes sorológicos anti-tTG IgA e anti-EMA IgA em um grupo de pacientes e verificar o grau de concordância entre os métodos.
- II. Estudar a predisposição genética por meio da genotipagem nos haplótipos HLA DQ2 e DQ8.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Tipo de estudo**

O presente trabalho foi delineado a partir do método de investigação conhecido como estudos transversais, também chamados seccionais ou de corte transversal (*cross sectional*). São chamados de estudos seccionais aqueles que produzem “instantâneos” da situação de saúde de uma população ou comunidade com base na avaliação individual do estado de saúde de cada um dos membros do grupo (SITTA et al, 2010). Os estudos transversais descrevem uma situação ou fenômeno em um momento não definido, apenas representado pela presença de uma doença ou transtorno, como, por exemplo, um estudo dos testes sorológicos e genéticos em pessoas portadoras de DC (HOCHMAN et al, 2005).

Assim sendo, não havendo necessidade de saber o tempo de exposição de uma causa para gerar o efeito, o modelo transversal é utilizado quando a exposição é relativamente constante no tempo e o efeito (ou doença) é crônico. Portanto, esse modelo apresenta-se como uma fotografia ou corte instantâneo que se faz numa população por meio de uma amostragem, examinando-se nos integrantes da casuística ou amostra, a presença ou ausência da exposição e a presença ou ausência do efeito (ou doença). Possui como principais vantagens o fato de serem de baixo custo, e por praticamente não haver perdas de seguimento (HOCHMAN et al, 2005).

#### **3.2 População Estudada**

O estudo incluiu 20 pacientes, de ambos os sexos (75% do sexo feminino e 25% do sexo masculino) que foram atendidos no ambulatório de Doença Celíaca do HUB. Indicados por suspeita de DC.

Os pacientes procuram o ambulatório com queixas clínicas intestinais em sua grande maioria, ou são indicados por médicos de outras especialidades médicas, e são atendidos por um médico gastroenterologista. Depois de atendidos os pacientes que apresentam indicação clínica fazem a coleta de sangue para a realização dos exames anti-tTG IgA, anti-EMA IgA e genotipagem do HLA para DC. Esses exames são realizados gratuitamente no Laboratório de Pesquisas em Doença Celíaca da Universidade de Brasília (UnB), e os pacientes são acompanhados com seguimento terapêutico, médico, nutricional, farmacêutico, e outras especialidades. Após a obtenção do consentimento livre e esclarecido procedeu-se a coleta da amostra.

### **3.3 Coleta da amostra**

Foram coletados dois tubos de 3mL de sangue total cada um, de cada um dos participantes da pesquisa em tubos sem anticoagulante contendo gel separador e acelerador de coagulação e o segundo tubo contendo o anticoagulante EDTA (extração do material genético), seguindo a norma H3-A6 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Após a coleta, o tubo com gel separador foi centrifugado a 3500 rpm por 5 minutos após a coagulação para separação do soro. Para o armazenamento, seguimos as recomendações da norma H18-A2 da CLSI não armazenar as amostras à temperatura ambiente durante mais de 8 horas, se o teste não for concluído num prazo de 8 horas, guardar a amostra a 2-8°C, se o teste não for concluído num prazo de 48 horas, ou se houver transporte da amostra, congelar a -20°C ou a uma temperatura inferior. As amostras congeladas devem ser bem homogeneizadas depois de descongelarem e antes de serem testadas.

### **3.4 Anticorpos Anti-Transglutaminase tecidular IgA (tTG2-IgA)**

O kit comercial QUANTA Lite™ htTG IgA (Inova Diagnostics, Inc. San Diego, CA, USA), foi utilizado no soro dos pacientes para a pesquisa de anticorpos IgA anti-transglutaminase tecidular (TTG). O kit é um ensaio imunoenzimático ELISA, (*Enzyme Linked Immunossorbent Assay*) para a detecção quantitativa de anticorpos no soro humano, utilizado somente para o diagnóstico *in vitro*. O ensaio foi realizado utilizando o equipamento BEST 2000 (Werfen group, Barcelona, Espanha), e a leitura em filtro de 450nm.

#### **3.4.1 Princípio do método tTG2-IgA**

Segundo as recomendações do fabricante, o antígeno da transglutaminase tecidular humana nativa (h-tTG) isolado de glóbulos vermelhos frescos é ligado aos micropoços de uma placa de poliestireno sob condições que vão preservar o antígeno no seu estado nativo. Os controles (positivos e negativos) e o soro diluído dos pacientes são adicionados aos diferentes poços, permitindo que quaisquer anticorpos h-tTG IgA presentes se liguem ao antígeno imobilizado. A amostra não ligada é lavada e adiciona-se um conjugado IgA anti-humano marcado a cada poço. Uma segunda incubação permite ao conjugado enzimático ligar-se a quaisquer anticorpos de doentes que tenha ficado ligado aos micropoços. Depois da segunda lavagem para retirar o excesso de conjugado, a restante atividade das enzimas é medida adicionando um substrato cromogênico e medindo a intensidade da cor que se desenvolve. O ensaio pode ser avaliado por espectrometria, medindo e comparando a intensidade da cor desenvolvida nos poços dos doentes com a cor dos poços do controle após leitura em filtro de 405nm. Os resultados serão expressos em Unidade.

### **3.5 Anticorpos anti-Endomísio (EMA)**

O kit comercial NOVA Lite<sup>R</sup> Monkey Oesophagus IFA Kit/Slides, Inova Diagnostics, Inc. San Diego, CA – USA foi utilizado para a pesquisa de Anticorpos Anti-endomísio IgA (IgA-EMA). As secções do esôfago do macaco são utilizadas como substrato e tem especificidade superior ao teste de anti h-tTG. Os resultados foram obtidos por dois observadores independentes utilizando microscopia de Imunofluorescência (Ziezz, Axiophot 2) empregando aumento de 400x, são expressos como negativos ou positivos.

#### **3.5.1 Princípio do método anti-Endomísio (EMA)**

O kit utiliza uma técnica de imunofluorescência indireta através do qual as amostras dos doentes e os controles apropriados são incubados com as secções de esôfago de macaco. Os anticorpos que não reagem são lavados e, em seguida, aplica-se anti-IgA humana conjugada com fluoresceína (FITC). O conjugado não ligado é lavado como anteriormente. As lâminas são observadas com um microscópio de fluorescência e as amostras positivas produzem uma fluorescência verde-maçã, no padrão reticulina correspondente a áreas de secções de esôfago de macaco onde o anticorpo se ligou.

Anticorpos anti-endomísio são específicos contra as fibras de reticulina do tecido conjuntivo que fica à volta das fibras do músculo liso no trato intestinal de primatas.

### **3.6 Extração do DNA e quantificação**

As amostras de sangue foram utilizadas para extração do DNA pelo método de coluna de sílica, usando *kit* comercial *Illustra<sup>TM</sup> Blood genomicPrep Mini Spin* (GE Helathcare, Buckinghamshire, UK) seguindo as recomendações do fabricante. A concentração final de cada amostra de DNA variou de 10ng/μL a 100ng/μL. Todas as amostras de DNA foram

armazenadas a uma temperatura de -20° C. Após a extração do DNA, as amostras de sangue foram devidamente tratadas e descartadas como resíduos biológicos.

### **3.7 Análise do DNA extraído**

A quantidade do DNA extraído foi determinada através do equipamento *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer* (*Nanodrop Technologies*, Wilmington, DE, USA), que utiliza a leitura espectrofotométrica nas densidades óticas (DO) 260 nm e 280 nm. Quando a razão dessas densidades óticas (A260/A280) foi entre 1.8 e 2.0, o grau de pureza do DNA foi considerado adequado para a realização das análises.

### **3.8 Tipagem HLA DQ2 e DQ8**

As amostras de soro dos pacientes com resultado positivo para o teste tTG-IgA e EMA-IgA foram submetidas ao teste de tipagem dos genes HLA DQ2 e DQ8. As amostras de DNA foram utilizadas para amplificação dos alelos DQA1\*05, DQB1\*02 (DQ2), e DQA1\*03, DQB1\*03:02 (DQ8). Amplificação desses alelos foi realizada pelo método de PCR em tempo real (q-PCR ou *real time PCR*), utilizando o aparelho *Step-One Instrument* (*Applied BioSystems – Life Technologies<sup>TM</sup>*, Carlsbad, USA). Foram utilizadas sequências específicas de *primers* para os alelos DQA1\*05, DQB1\*02 e DQA1\*03:01 como descrito por Olerup et al (1993), e as sequências dos *primers* para o alelo DQB1\*03:02 foram utilizadas de acordo como descrito por Profazer et al (2011) (Tabela 2). Como controle da reação de PCR foi usado um par de *primers* de uma região conservada do gene HGH, o Hormônio do Crescimento (*growth hormone*) conforme Profazer et al (2011) descreveu (ALMEIDA, 2014)



**Tabela 1** – Sequência dos *iniciadores* utilizados para q-PCR

Alelo	Cadeia	Iniciadores	
		Senso (5'-3')	Anti-senso (5'-3')
DQA1*05	$\alpha$ DQ2	5'-ACG GTC CCT CTG GCC AGT A- 3'	5'-AGT TGG AGC GTT TAA TCA GCA-3'
DQB1*02	$\beta$ DQ2	5'-GTG CGT CTT GTG AGC AGA AG-3'	5'-GCA AGG TCG TGC CGA GCT- 3'
DQA1*03	$\alpha$ DQ8	5'-TTC ACT CGT CAG CTG ACC AT- 3'	5'-CAA ATT GCG GGT CAA ATC TTC T-3'
DQB1*03:02	$\beta$ DQ8	5'-GCG CGT GCG TCT TGT GAC C- 3'	5'-CTG TTC CAG TAC TCG GCG GCA-3'
HGH	Controle da reação - GH	5'-GCC TTC CCA ACC ATT CCC TTA-3'	5'-TCA CGG ATT TCT GTT GTG TIT-3'

Foram realizadas quatro reações por amostra para amplificar individualmente cada alelo. Essas reações foram feitas em triplicatas e foram efetuadas conforme descrito a seguir e na tabela 3: 1 $\mu$ L do *primer* senso, 1 $\mu$ L do *primer* anti-senso, 10 $\mu$ L de *SYBR Green* (*Absolute qPCR SYBR Green Rox Mix - Thermo Fisher Scientific Inc, Vilnius, Lithuania*), 2 $\mu$ L de DNA genômico e 6 $\mu$ L de água ultra pura (*Thermo Fisher Scientific Inc, Vilnius, Lithuania*) para um volume total de 20 $\mu$ L por reação. Foram usadas como controles positivos amostras previamente tipadas para cada um dos alelos HLA estudados. Como controle de reação e de contaminação foi usada uma amostra que não continha DNA. As reações de PCR foram adicionadas a placas de 48 poços (*Applied BioSystems – Life Technologies™, Carlsbad, USA*), depois centrifugadas por um minuto a 1300rpm e em seguida foram colocadas no aparelho *Step-One Instrument*.

**Tabela 2-** Resumo das condições das reações de qPCR

<b>Componentes</b>	<b>Volume</b>	<b>Concentração</b>
<i>Primer senso</i>	1µL	10µM
<i>Primer anti-senso</i>	1µL	10µM
<i>SYBR Green</i>	10µL	2X
DNA	2µL	10ng/µL a 100ng/µL
Água ultra pura	6µL	-
Total	20µL	-

Os alelos DQA1\*05, DQB1\*02 e DQA1\*03 foram amplificados sob as seguintes condições (tabela 4): uma etapa inicial de ativação da enzima de 10 minutos a 95°C, seguida de uma sequência de 32 ciclos de 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 60 segundos a 60°C (anelamento e extensão); após a amplificação dos alelos segue-se a etapa da curva de *melting* (essa etapa é realizada em 3 passos: 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e novamente 95°C por 15 segundos).

**Tabela 3** - Condições da qPCR para os alelos DQA1\*05, DQB1\*02 e DQA1\*03

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturação inicial	95°C	10 minutos	1
Desnaturação	95°C	15 segundos	32
Anelamento e extensão	60°C	60 segundos	
Curva de <i>melting</i> passo 1	95°C	15 segundos	1
Curva de <i>melting</i> passo 2	60°C	60 segundos	
Curva de <i>melting</i> passo 3	95°C	15 segundos	

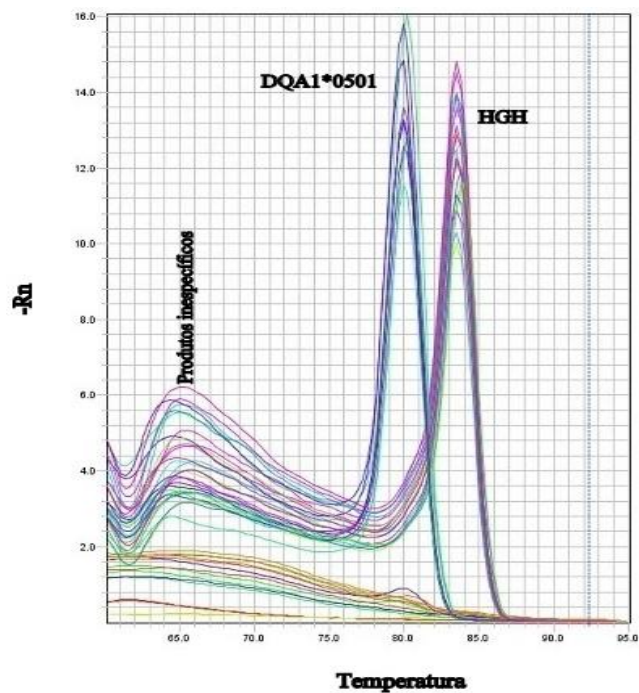
O alelo DQB1\*03:02 foi amplificado de acordo com as condições descritas por Profaizer et al (2011): uma etapa inicial de desnaturação de 5 minutos a 95°C, seguida de 6 etapas de amplificação e por fim segue-se a etapa da curva de *melting*; essas condições estão descritas em detalhes na tabela 5.

**Tabela 4** - Condições da qPCR para o alelo DQB1\*03:02 descritos por Profaizer et al, 2011

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturação inicial	95°C	5 minutos	1
Amplificação 1	95°C	20 segundos	2
	71°C	45 segundos	
	72°C	10 segundos	
Amplificação 2	95°C	20 segundos	10
	70°C	45 segundos	
	72°C	10 segundos	
Amplificação 3	95°C	20 segundos	10
	69°C	45 segundos	
	72°C	10 segundos	
Amplificação 4	95°C	20 segundos	5
	67°C	45 segundos	
	72°C	10 segundos	
Amplificação 5	95°C	20 segundos	5
	66°C	45 segundos	
	72°C	10 segundos	
Amplificação 6	95°C	20 segundos	2
	65°C	45 segundos	
	72°C	10 segundos	
Curva de <i>melting</i>	95°C	5 segundos	1
	50°C	1 minuto	
	97°C	Contínuo	

### 3.9 Análise dos dados processados pela técnica de PCR em tempo real

Para analisar e garantir a qualidade do produto amplificado pela técnica de PCR em tempo real, em todas as reações foram analisados os produtos da amplificação dos alelos. A figura 6 representa os picos de desnaturação dos alelos, que são gerados a partir da derivada da intensidade de fluorescência da curva de desnaturação, onde se observa um único pico de *Temperature melting* (T<sub>m</sub>), que é única para cada alelo estudado, o que demonstra a presença de um único produto amplificado para cada alelo individualmente.



**Figura 7** – Representação gráfica das curvas de *melting* do alelo DQA1\*05 e do controle da reação (HGH). Temperatura em °C.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Análise descritiva da população estudada**

No presente estudo foram analisadas 20 amostras de pacientes acompanhados no ambulatório de Doença Celíaca do Hospital da Universidade de Brasília (HUB) no período de janeiro de 2013 a dezembro de 2015. Com idades variando entre 3 a 60 anos (idade média  $21,45 \pm 17,5$ ), 5 pacientes eram do sexo masculino e 15 do sexo feminino.

### **4.2 Anticorpos anti-Transglutaminase tecidual IgA (tTG2-IgA)**

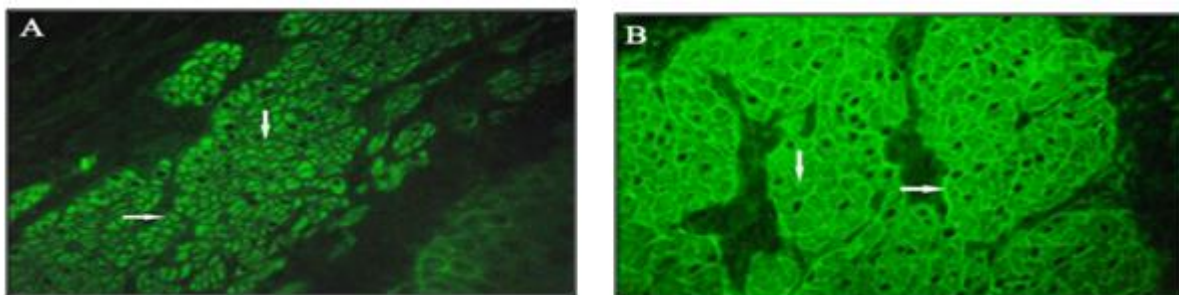
Das amostras testadas com o *kit* QUANTA Lite™ htTG IgA ELISA para detecção de anticorpos h-tTG IgA foram consideradas positivas aquelas com os resultados maior ou igual a 30 UA e negativas com valores abaixo de 30 UA.

Do total de 20 amostras, 17 (85%) apresentaram positividade para o teste h-tTG IgA, e apenas 3 (15%) apresentaram resultados negativos para a presença deste anticorpo. Nos resultados positivos, os valores médios obtidos deste analito foram  $120,22 \pm 72,8$ , e nos negativos  $22,31 \pm 6,7$ .

Dos 17 pacientes com tTG-IgA positivos, 4 eram do sexo masculino e 13 eram do sexo feminino. Dentre os 3 pacientes com resultados negativos, 2 eram do sexo feminino e um do sexo masculino.

### **4.3 Anticorpos anti-Endomísio (EMA)**

As amostras analisadas pelo kit NOVA Lite<sup>R</sup> Monkey Oesophagus IFA foram consideradas positivas conforme a figura 9.



**Figura 8 – Fotografias de testes EMA IgA** (a) EMA IgA negativo: ausência de fluorescência (b) EMA IgA positivo: fluorescência de cor verde brilhante. Imagem cedida por Laboratório de Pesquisa em Doença Celíaca.

O presente estudo apresentou resultados de todos os 20 pacientes positivos (100%) para a presença de anticorpos anti-endomísio IgA, e em 3 pacientes (15%) apresentou resultados positivos somente ao exame de EMA.

**Tabela 5 – Resultados dos pacientes avaliados para a presença de anticorpos anti-tTG e anti-EMA IgA**

PACIENTE	IDADE	SEXO	TTG	EMA
1	44	Feminino	95,91	Positivo
2	17	Feminino	29,5	Positivo
3	10	Feminino	197	Positivo
4	38	Masculino	54,13	Positivo
5	30	Feminino	148,05	Positivo
6	6	Masculino	24,11	Positivo
7	33	Feminino	175,5	Positivo
8	13	Masculino	165,52	Positivo
9	3	Feminino	99,67	Positivo
10	10	Feminino	132,91	Positivo
11	40	Masculino	88,36	Positivo
12	3	Masculino	288	Positivo
13	8	Feminino	242,7	Positivo
14	7	Feminino	103	Positivo
15	12	Feminino	96,77	Positivo
16	4	Feminino	54,61	Positivo
17	60	Feminino	84,83	Positivo
18	8	Feminino	13,32	Positivo
19	45	Feminino	126,74	Positivo
20	38	Feminino	183,85	Positivo

#### **4.4 Tipagem HLA DQ2 e DQ8**

As amostras de DNA dos pacientes com resultados positivos e negativos para os testes tTG-IgA e EMA-IgA foram submetidas a tipagem dos genes HLA DQ2 e DQ8. Dos 20 pacientes pesquisados 17 (85%) pacientes apresentaram alelos que codificam apenas o heterodímero DQ2 completo (DQA1\*05 e DQB1\*02) e apenas 3 (17%) apresentaram tanto o heterodímero DQ2 quanto o DQ8. Não houve amostras sem a presença dos alelos, mesmo aquela que inicialmente apresentaram negatividade do tTG-IgA, e positividade apenas o anti-EMA IgA, estas também apresentaram a presença de alelos para a DC.

## 5 DISCUSSÃO

A última década aprofundou nossa apreciação das manifestações multiformes da DC, que se apresenta em todas as fases da vida, tem uma distribuição geográfica diversificada, e é uma doença autoimune comum (KELLY et al, 2015). Em geral, a prevalência de DC na América Latina (AL) é semelhante ao relatado na Europa, principalmente em populações e regiões com ascendência caucasiana (MEDINA et al, 2015). Apesar de ser bem caracterizada, a maioria dos pacientes ainda são pouco diagnosticados. Avanços na compreensão da patogênese e fatores genéticos levaram ao desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico não invasivas e terapias alternativas (CASTILLO et al, 2015; KELLY et al, 2015).

Vários ensaios sorológicos estão disponíveis para ajudar a fazer o diagnóstico com uma alta sensibilidade e especificidade; no entanto, o rastreio de rotina de pacientes assintomáticos ainda não está recomendado (GREEN et al, 2015). Até recentemente, o diagnóstico da DC dependia principalmente de biópsias intestinais. Novas diretrizes propõem diagnosticar DC em pacientes sintomáticos sem biópsia se a concentração de anticorpos específicos para DC exceder a 10 vezes o valor de referência LSN (WOLF et al, 2014). Portanto, os ensaios de anticorpos poderiam tornar biópsias desnecessárias, mas esta sugestão só se aplica ao kit de teste usado aqui e devem ser verificadas para os diferentes ensaios disponíveis no mercado.

Os resultados do presente estudo evidenciaram que em pacientes celíacos com altos níveis de anticorpos há uma excelente correlação da pesquisa dos anticorpos anti-tTG-IgA com o EmA-IgA, não se incorrendo em risco de resultados falso-negativos. Embora, os peptídeos deamidado de gliadina (DGP), recentemente introduzidos, mostre desempenho promissor em comparação a resultados de EMA e tTG (SCHYUM & RUMESSEN, 2013).



Estudos prospectivos exploraram o valor específico de análises sorológicas de populações com alta e baixa probabilidade pré-teste, em que o diagnóstico da doença foi baseado em achados histológicos. Os estudos concluíram que os resultados positivos concomitantes de dois ou três imunoenaios específicos são altamente preditivos de atrofia celíaca (Marsh III) (KELLY et al, 2015). Portanto, a presente pesquisa com 17 pacientes (85%) positivos tanto para o teste EMA IgA quanto para o teste tTG IgA, tem alto valor preditivo de DC.

O presente trabalho encontrou uma alta especificidade de EMA IgA (100%) em comparação ao teste tTG IgA (85%). E que também se mostrou similar a estudos anteriores que avaliam EMA como o melhor teste (comparável com tTG) (SCHYUM & RUMESSEN, 2013). Apesar da elevada acurácia diagnóstica do teste tTG IgA, baixos níveis de anti-TG2 foram descritos num certo número de condições não relacionadas à DC, tais como outras doenças autoimunes, infecções, tumores, dano do miocárdio, perturbações do fígado e psoríase (BIZZARO et al, 2006; FERRARA et al, 2010; VILLALTA et al, 2002). Estes anticorpos não estão associados com a reação de EMA, o que explica porque EMA tem maior fiabilidade para o diagnóstico de DC.

Além disso, deve-se considerar a adesão ou não adesão a dieta livre de glúten (DLG) pelos pacientes do estudo como provável causa aos resultados apresentados pelo teste tTG IgA. Quando analisamos o resultado do teste tTG IgA com a informação que o paciente fornece sobre sua adesão à dieta, observa-se que a maioria dos pacientes que relatam sempre seguir a dieta possuem tTG IgA negativos. Numerosos estudos tem mostrado que marcadores sorológicos para DC tornam-se negativos em pacientes celíacos em dieta sem glúten e que sorologia é uma ferramenta útil em avaliação da adesão dietética (CIACCI et al, 2002).

Um relatório feito pela ESPGHAN sobre sorologia da DC com estudos realizados entre 2004 e 2009 (GIERSIEPEN et al, 2005), mostrou que os resultados de EMA foram mais homogêneos aos resultados obtidos com outros testes de anticorpos e tinha uma razão de diagnóstico alta de 553,6. Notavelmente, a positividade de EMA também está associada com o desenvolvimento posterior de atrofia das vilosidades em casos relatados de adultos e crianças com DC (GIERSIEPEN et al, 2005). E mesmo nos casos de baixa sensibilidade ao teste EMA IgA, geralmente o teste tem uma maior especificidade de todos os ensaios, juntamente com um elevado valor preditivo negativo (VPN), e, portanto, é utilizável para identificar DC (SCHYUM & RUMESSEN, 2013).

O teste tTG IgA tem a maior sensibilidade de todos os ensaios (individuais) e uma elevada especificidade. Isto indica que o ensaio é adequado para a identificação de pessoas com DC e podem ser utilizados para fins de rastreio. Os altos valores coincidem com os resultados de outros estudos que também revelam tTG IgA como o teste mais bem sucedido em conjunto com EMA.

O fator de risco mais importante para DC é a presença dos haplótipos HLA-DQ2 ou DQ8, dos quais um ou ambos estão presentes em praticamente todos os pacientes com DC (CASTILLO et al, 2015). A aplicabilidade da genotipagem HLA é particularmente útil para a exclusão de DC em familiares ou grupos de risco como pacientes com síndrome de Turner, síndrome de Down, diabetes melitus (SOLLID & LIE, 2005).

A prevalência aumentada de 85% para os alelos conferem maior risco para DC e pode ser explicada pelo fato do grupo amostral da pesquisa ter elevado grau de homogeneidade, já que todos os pacientes foram triados corretamente no ambulatório de Doença Celíaca do HUB. A suspeita clínica juntamente com os resultados positivos dos exames sorológicos e genéticos confirma a qualidade do serviço para diagnosticar DC tanto no Hospital da Universidade de Brasília como no Laboratório de Doença Celíaca da UnB.

Na genética da DC, tem havido uma explosão no número de variantes de susceptibilidade identificados devido a melhorias tecnológicas na genotipagem. O impacto total de variantes raras na DC ainda não foi estudado e pode explicar parte da herdabilidade em falta. Além disso, o papel da epigenética (por exemplo, metilação) não foi investigado na DC e pode desempenhar um importante papel na susceptibilidade a doenças. Finalmente, a aplicação de descobertas genéticas na prática clínica permanece indeterminado. Atualmente, o teste genético HLA é usado principalmente por seu valor preditivo negativo, dado que >99% dos pacientes com DC transportam um ou outro destes marcadores, um teste negativo exclui efetivamente DC. Um resultado positivo é menos útil e não pode ser utilizado para diagnosticar DC, porque HLA DQ2 ou DQ8 está presente em pelo menos 50% da população, a maioria dos quais não têm DC (KUPFER & JABRI, 2012; KENRICK et al, 2014).

O estudo mostrou que todos os pacientes possuem os alelos predisponentes, e, portanto, um ou ambos os haplótipos HLA-DQ2 ou DQ-8 presentes, o que confirma o diagnóstico sorológico por meio dos testes de EMA IgA, com prevalência de 100% a DC. Contudo, um estudo feito por Karell et al. (2015) exemplifica casos raros que a DC foi vista sem a ocorrência de HLA DQ2 ou DQ8. No entanto, a possibilidade de que estes representem erros de diagnóstico deve ser considerada (SCHYUM & RUMESSEN, 2013).

## **6 CONCLUSÃO**

Este estudo permitiu a conclusão que o uso de marcadores sorológicos em DC é uma prática não-invasiva, de fácil aplicação, direta e confiável que pode ser usada para o diagnóstico e acompanhamento da doença. Mais especificamente, tTG IgA e EMA IgA são marcadores adequados na abordagem de diagnóstico de DC e no rastreio entre parentes de primeiro grau. Campanhas futuras de sensibilização pública, melhoria do acesso aos cuidados de saúde, bem como o desenvolvimento de testes mais baratos e precisos têm o potencial de aumentar a taxa de diagnóstico desta doença crônica comum.

## 7 REFERÊNCIAS

AGARDH, D.; LEE, H.S.; KURPPA, K.; et al. Clinical Features of Celiac Disease: A Prospective Birth Cohort. *Pediatrics*, v.135, n.4, 2015.

ALMEIDA, F.C. Prevalência dos genes HLA-DQ2 e DQ8, predisponentes para doença celíaca, em recém-nascidos do Distrito Federal. 2014. 71f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Brasília (UnB). Brasília, 2014.

ARONSSON, C. A.; LEE, H.S.; LIU, E; et al. Age at Gluten Introduction and Risk of Celiac Disease. *PEDIATRICS*, v.135, n.2, 2015.

AURICCHIO, S.; TRONCONE, R. History of coeliac disease. *Eur J Pediatr*, v.155, n.6, p.427-428, 1996.

BARBERO, E.M; McNALLY, S.L; DONOHUE, M.C; KAGNOFF, M.F. Barriers impeding serologic screening for celiac disease in clinically high-prevalence populations. *BMC Gastroenterology*, 2014.

BERGE-HENEGOUWEN, G.P.; MULDER, C.J.J. Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten free diet. *Gut*. v. 34, p. 1473-5, 1993.

BIZZARO, N.; TAMPOIA, M.; VILLALTA, D. et al. Low specificity of anti-tissue transglutaminase antibodies in patients with primary biliary cirrhosis. *J Clin Lab Anal* 20:184–9, 2006.

CASTILLO, N. E.; THEETHIRA, T. G.; LEFFLER, D. A. The present and the future in the diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology Report*, 3(1), 3–11. 2015.

CATASSI, C. et al. Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *The Lancet*, v. 354, p. 647-648, 1999.

CATASSI, C.; GATTI, S.; FASANO, A. The New Epidemiology of Celiac Disease. *JPGN*, v.59, Supplement 1, July 2014.

CIACCI, C.; CAVALLARDO, R.; DELLA VALLE, N.; D' ARGENIO, G. The use of serum tTG-ab assay in patients on gluten-free diet as a measure of dietetic compliance. *Gastroenterology*, 122: 588-92, 2002.

CROVELLA S.; BRANDÃO L.; GUIMARÃES R.; DE LIMA FILHO J.L. et al. Speeding up coeliac disease diagnosis in developing countries. *Dig Liver Dis*, v.39, p.900-2, 2007.

FASANO, A. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *The American Physiological Society*, v.91, p. 151-175, 2011.

FASANO, A.; CATASSI, C. Celiac Disease. *The new england journal of medicine*, 367;25, 2012.

FASANO, A.; CATASSI, C.; KRYSZAK, D. et al. Prevalence of celiac disease among school children in Egypt: results of a pilot study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, v.39:s222, 2004.

FERRARA, F.; QUAGLIA, S.; CAPUTO, I. et al. Anti-transglutaminase antibodies in non-coeliac children suffering from infectious diseases. *Clin Exp Immunol* 159:217–23, 2010.

GANDOLFI, L.; PRATESI, R.; CORDOBA, J.C. et al. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol*, 95: 689-92, 2007.

GIERSIEPEN, K.; LELGEMANN, M.; STUHLREHER, N. et al. Accuracy of diagnostic antibody tests for coeliac disease in children: summary from an evidence report. European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Working Group on Coeliac Disease Diagnosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2005.

GOMEZ, J.C.; SELVAGGIO, G.S.; VIOLA, M. et al. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol* 96, 9, 2700-4, 2001.

GREEN, P. H. R.; LEBWOHL, B.; GREYWOODE, R. Celiac disease. *Clinical reviews in allergy and immunology*, 2015.

GUANDALINI, S. A Brief History of Celiac Disease. *University of Chicago Celiac Disease Center*, 2007.

GUANDALINI, S; ASSIRI, Asaad. Celiac Disease: A Review. *JAMA Pediatrics*, 168(3):272-278, 2014.

GUJRAL, N.; FREEMAN, H. J.; THOMSON, A. BR. Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 18(42): 6036-6059, November 2012.

HEYMAN, M.; MÉNARD, S. Pathways of gliadin transport in celiac disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 1165, p. 274-278, 2009.

HOCHMAN, B.; NAHAS, F. X.; FILHO, R. S. O.; FERREIRA, L. M. Desenhos de pesquisa. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.20 (Supl. 2), 2005.

HUSBY S. Guideline - European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *JPGN*, v.54, p.136–160, 2012.

HUSBY, S; MURRAY, J.A. Diagnosing coeliac disease and the potential for serological markers. *Nature Reviews, Gastroenterology Hepatology*, 2014.

KARELL, K.; LOUKA, A. S.; MOODIE, S. J.; et al. HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1\*05–DQB1\*02 (DQ2) heterodimer: Results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol*, 64: 469–477, 2003.

KELLY, C. P.; BAI, J. C.; LIU, E. et al. CELIAC DISEASE: CLINICAL SPECTRUM AND MANAGEMENT. *Advances in Diagnosis and Management of Celiac Disease. Gastroenterology*, 148:1175–1186, 2015.



KENRICK, K.; DAY, A. S. Coeliac disease: where are we in 2014? *Australian Family Physician* v.43(10), 2014.

KNEEPKENS, C. M. F; BLOMBERG, B. M. E. Clinical practice coeliac disease. *Eur J Pediatr*, 171:1011–1021, 2012.

KUPFER, S S; JABRI, B. Pathophysiology of Celiac Disease. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am* 22, 639–660, 2012.

LEBWOHL, B.; RUBIO-TAPIA, A.; ASSIRI, A. Diagnosis of Celiac Disease. *Gastrointest Endoscopy Clin N Am* 22, 661–677, 2012.

LEIVERS C.; Martin, G.; GASPARETTO, M.; SHELLEY, H.; Valente, M. Coeliac disease. *Paediatrics and Child Health*, 2014.

MATOORI, S.; FUHRMANN, G.; LEROUX, J.C. Celiac Disease: A Challenging Disease for Pharmaceutical Scientists. *Pharm Res*, 30:619–626, 2013.

MATYSIAK-BUDNIK, T.; MOURA, I.C.; ARCOS-FAJARDO, M. et al. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via transferring receptor in celiac disease. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 205(1), Jan, p. 143-154, 2008.

MEDINA, R. P.; GONZALEZ, N. M.; VILLARRAGA, A. R et al. Prevalence of Celiac Disease in Latin America: A Systematic Review and Meta-Regression. *PLoS ONE* 10(5): e0124040, 2015.

MOHAMED, E.; AHMED, A.; AHMED, Z. Celiac disease: Do not miss that diagnosis! *The Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine*, 44, 727–735, 2013.

MUSTALAHTI, K.; CATASSI, C.; REUNANEN, A.; FABIANI, E.; HEIER, M.; MCMILLAN, S.; MURRAY, L.; METZGER, M.H. et al. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med*.42(8):587-95, 2010.

OLIVEIRA, R.P.; SDEPANIAN, V.L.; BARRETO, J.A et al. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19: 43-9, 20007.

PENA, S.D.; BASTOS-RODRIGUES, L.; PIMENTA, J.R. et al. DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. *Braz J Med Biol Res*,42:870-6, 2009.

PRATESI, R. et al. Prevalence of Coeliac Disease: Unexplained Age-related Variation in the Same Population. *Scand J Gastroenterol*, v.38, p.747-750, 2003.

PROFAIZER, T.; ECKELS, D.; DELGADO, J.C. Celiac disease and HLA typing using real-time PCR with melting curve analysis. *Tissue Antigens* 78:31-7, 2011.

RASHTAK, S.; ETTORE, M.W.; HOMBURGER, H.A. et al. Comparative usefulness of deamidated gliadin antibodies in the diagnosis of celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 6:426–32, 2008.

REILLY, N.R.; GREEN, P.H.R. Epidemiology and clinical presentations of celiac disease. *Semin. Immunopathol.*34:473–478, 2012.

RIVERA, E.; ASSIRI, A.; GUANDALINI, S. Celiac disease. *Oral Dis*, 19(7):635-641, 2013.

SCHUPPAN, D.; ZIMMER, K.P. The Diagnosis and Treatment of Celiac Disease. *Deutsches Ärzteblatt International*, 110(49): 835–46, 2013.

SCHYUM, A. C.; RUMESSEN, J. J. Serological testing for celiac disease in adults. *United European Gastroenterology Journal*, 1(5): 319–325, 2013.

SITTA, É. I.; ARAKAWA, A. M.; CALDANA, M. L. et al. A Contribuição de Estudos Transversais na área da linguagem com enfoque em afasia. *Rev. CEFAC*, São Paulo, 2010.

SOLLID, L. M.; LIE, B. A. Celiac Disease Genetics: Current Concepts and Practical Applications. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 3:843–851, 2005.

SZAJEWSKA, H.; SHAMIR, R.; CHMIELEWSKA, A. Systematic review with meta-analysis: early infant feeding and coeliac disease – update 2015. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2015.

TJON, J.M.; Van BERGEN, J.; KONING, F. Celiac disease how complicated can it get. *Immunogenetics*, v.62, p.641–651, 2010.

TONUTTI, E; BIZZARO, N. Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. *Autoimmunity Reviews* 13, 472–476, 2014.

TRIGONI, E; TSIROGIANNI, A.; PIPI, E.; MANTZARIS, G. et al. Celiac Disease in Adult Patients: Specific Autoantibodies in the Diagnosis, Monitoring, and Screening. *Autoimmune Diseases*, article ID 623514, 2014.

VILLALTA, D.; BIZZARO, N.; TONUTTI, E. et al. IgG anti-transglutaminase autoantibodies in systemic lupus erythematosus and Sjogren syndrome. *Clin Chem* 48:1133, 2002.

WOLF, J.; HASENCLEVER, D.; PETRO, D.; RICHTER, T. et al. Antibodies in the Diagnosis of Coeliac Disease: A Biopsy-Controlled, International, Multicentre Study of 376 Children with Coeliac Disease and 695 Controls. *PLoS ONE* 9(5): e97853, 2014.