

Importância do ponto de corte dos exames sorológicos na indicação de biópsia intestinal para diagnóstico de doença celíaca

The importance of determining accurate cut-off point for serological assays before indicating intestinal biopsy for coeliac disease diagnosis

Magda Bahia¹, Aline Cristina Vieira², Daniel Werneck Rocha Pessoa³, Rafael Ferreira Simões², Francisco José Penna⁴

RESUMO

Objetivo: comparar os resultados da determinação de anticorpos IgA e IgG anti gliadina positivos em laboratórios privados com os resultados dos mesmos exames no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais. **Métodos:** foram encaminhados 101 pacientes ao Ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica para avaliação de biópsia intestinal, com resultados de anticorpos IgA e/ou IgG anti gliadina positivos. Foram obtidas novas amostras de sangue e realizados os mesmos exames pela técnica de ELISA *in house*, cujo ponto de corte foi estabelecido em estudos anteriores para nossa população. **Resultados:** dos 101 pacientes com resultados positivos em laboratórios privados, 73 apresentaram resultados negativos no Laboratório do HC. Nos outros 28 pacientes, houve concordância em 13 resultados, sendo um apenas IgA anti gliadina positivo, nove IgG anti gliadina positivo e três com ambos marcadores positivos. Os demais 15 pacientes apresentaram resultados divergentes. **Conclusão:** os marcadores sorológicos são de grande valia para a triagem dos pacientes a serem submetidos à biópsia intestinal para o diagnóstico definitivo de doença celíaca. No entanto, os pontos de corte devem ser estabelecidos para cada população estudada e para cada *kit* utilizado, devido à grande possibilidade de resultados falso-positivos, secundária à alta prevalência de outras enteropatias no nosso meio.

Palavras-chave: Doença Celíaca; Marcadores Biológicos; Anticorpos; Pesquisa Biomédica; Estudos Transversais; Imunoglobulina A; Imunoglobulina G; Gastroenteropatias.

ABSTRACT

Objective: To compare the positive results for anti gliadin IgA and IgG antibodies tested in private laboratories with those tested at the Central Lab of UFMG University Hospital. **Methods:** A total of 101 patients were referred to the Pediatric Gastroenterology Outpatient Center for intestinal biopsy upon positive test results for anti gliadin IgA and/or IgG antibodies. New blood samples were collected to perform the same tests using in-house ELISA technique assuming the cut-off point established in previous studies for our population. **Results:** Out of the 101 patients with positive results in private laboratories, 73 had negative results in the tests carried out at UFMG University Hospital. Among the 28 remaining patients, results were consistent with previous test reports for 13: positive anti gliadin IgA for one of them, positive anti gliadin IgG for 9 of them, and positive results in both tests for three patients. The results of the other 15 patients were inconsistent with their previous

¹ Professora Adjunta do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG, Belo Horizonte, MG – Brasil.

² Acadêmico do curso de Medicina da Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, MG – Brasil.

³ Acadêmicos do curso de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG – Brasil.

⁴ Professor Titular do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte, MG – Brasil

Recebido em: 29/08/2011

Aprovado em: 13/12/2011

Instituição

Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, MG – Brasil

Endereço para correspondência:

Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da UFMG
Av. Prof. Alfredo Balena, 190, 2º andar
Bairro: Santa Efigênia
CEP 30130 - 100
Belo Horizonte, MG - Brasil
E-mail: magbahia@gmail.com

reports. Conclusion: Serological markers are crucial to screen patients that should undergo intestinal biopsy for definitive diagnosis of coeliac disease. However, cut-off points should be determined specifically for each population studied and for each kit used, as the possibility of false positive results is great and influenced by the high prevalence of other enteropathies in our environment.

Key words: Coeliac Disease; Biological Markers; Antibodies; Biomedical Research; Transversal Studies; Immunoglobulin A; Immunoglobulin G; Gastroenteropathies.

INTRODUÇÃO

Tem se tornado evidente que a doença celíaca ocorre mais frequentemente do que se pensava. 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 ferropriva¹ ou queixas inespecíficas, discreta distensão abdominal ou flatulência, além da sua associação com outras doenças como diabetes *mellitus* insulino-dependente^{2,3}, epilepsia⁴, trissomia do cromossoma 21⁵, enxaqueca⁶, baixa estatura⁷⁻⁹, hepatite crônica¹⁰⁻¹², lúpus eritematoso sistêmico^{13,14}, deficiência de IgA¹⁵, entre outros.

Estudos de prevalência da doença no Brasil mostram incidência entre 1 e 681 e 1 e 214.¹⁶⁻²⁰ Os familiares dos pacientes acometidos são considerados de risco para enteropatia, pelo caráter hereditário da doença. Nesses indivíduos, a triagem sorológica é de grande benefício para se estabelecer o diagnóstico precoce. Rostami *et al.*²¹ encontraram incidência de 21,0% em familiares de primeiro grau. Estudo realizado em Brasília encontrou prevalência de 4,8% em parentes de primeiro grau de pacientes com doença celíaca e, no Paraná, estudo realizado em 177 familiares de pacientes com DC por meio da pesquisa de anticorpos antiendomíseo e antitransglutaminase tecidual encontrou positividade dos marcadores sorológicos de 21%.^{22,23} Outra pesquisa realizada no sul do Brasil encontrou prevalência de 5,6% em familiares dos pacientes com doença celíaca.²⁴

Com a mudança da forma de apresentação da doença, os quadros assintomáticos ou oligossintomáticos fazem com que o diagnóstico da doença seja tardio. Collin *et al.*²⁵ relataram 18 casos diagnosticados por triagem sorológica em pacientes com doenças articulares, alergias,

doenças pulmonares ou diabetes *mellitus* tipo 1, sem sintomas gastrointestinais ou apenas sintomas leves. A faixa etária desses pacientes variou de 24 a 70 anos.

O diagnóstico precoce da doença é fundamental, já que o início do tratamento adequado diminui o risco de possíveis complicações que podem ocorrer nos pacientes não tratados, 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.^{26,27} Os marcadores sorológicos têm tido importante papel no reconhecimento desses casos.²⁸

No ambulatório de Gastroenterologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG foram recebidos pacientes encaminhados para realização de biópsia jejunal e confirmação de doença celíaca devido aos resultados de anticorpos classe IgG e IgA anti gliadina positivos, realizados na rede comercial. Esses exames foram repetidos no serviço utilizando-se técnica de ELISA *in house* e ponto de corte baseado em estudos anteriores em crianças de nossa população, sem queixas gastrointestinais.²⁹ Foi constatada discordância de 72,3% entre os resultados dos exames sorológicos. A biópsia para confirmação ou exclusão da doença foi feita nos pacientes que apresentavam algum resultado positivo no HC, exame sorológico de outros laboratórios fortemente positivo ou clínica sugestiva de doença celíaca. Essa decisão foi baseada nos estudos realizados no serviço, que mostravam sensibilidade para AGAA e AGAG de 81,1 e 89,2%, respectivamente, e especificidade para AGAA e AGAG de 95,2%³⁰. Todos os pacientes são acompanhados periodicamente no Ambulatório do HC, sendo realizados avaliação clínica e exames laboratoriais com o objetivo de detectar sintomas sugestivos de doença celíaca e/ou viragem sorológicas.

Os valores de referência de exames laboratoriais devem ser obtidos a partir de uma população semelhante àquela em que o teste será aplicado. Assim, têm-se valores de referência para recém-nascidos, homens, mulheres e idosos. Os valores de referência de exame laboratorial estabelecido para uma população que vive em condições sanitárias ideais serão inadequados se forem adotados para uma população que vive em precárias condições de higiene, pois esta sofre constantes agressões infecciosas do trato gastrointestinal, levando a resultados falso-positivos.

Este trabalho tem como objetivo comparar os resultados dos exames realizados em *kits* comerciais estrangeiros e em *kit* caseiro, cujo ponto de corte foi determinado a partir de soros de pacientes atendidos

nos ambulatórios de Gastroenterologia e de Endocrinologia pediátricas.

PACIENTES E MÉTODOS

Foram coletados 5 mL de sangue de 101 pacientes encaminhados com AGAA e/ou AGAG positivos em laboratório comercial. O sangue foi centrifugado e o soro separado e conservado em temperatura de -20°C. Para a determinação dos anticorpos antigliadina foram empregadas placas de poliestireno para microELISA, sensibilizadas com gliadina bruta (Sigma), diluída em tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, na concentração de 50 mg/mL, 100 mL 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 foram submetidas a bloqueio com albumina bovina (Sigma) diluída em PBS-Tween 20, a 2%, 150 mL 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, negativo e branco, 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 anti-IgG e anti-IgA humana, ligados à peroxidase (Sigma), eram colocados nas placas, na concentração de 1:1.000, 100 mL/poço, tanto para IgG como para IgA, em estufa a 37°C durante uma hora, que eram lavadas novamente cinco vezes. Para a revelação do sistema enzimático, eram colocados 100 mL 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 então interrompida com sulfato sódico de duodocil (SDS – Sigma) a 10% e a leitura de densidade

óptica feita em comprimento de onda de 405 nm, em espectrofotômetro para microELISA Bio Rad 680.

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

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

O ponto de corte foi estabelecido pela média dos resultados das leituras das densidades ópticas dos soros das crianças sem queixa gastrintestinal, mais dois desvios-padrão, em 0,041 para a IgA (média = 0,008 desvio-padrão = 0,014) e 0,141 para a IgG (média = 0,038 desvio-padrão = 0,051).

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG com o número ETIC 293/07.

RESULTADOS

Foram analisados os soros de 101 pacientes encaminhados ao ambulatório de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas com exames sorológicos positivos. A Tabela 1 mostra os resultados dos exames obtidos nos laboratórios comerciais e no laboratório do HC.

Dos 12 pacientes que obtiveram, em laboratório comercial, apenas AGAA positivo, um teve esse mesmo resultado no laboratório do HC e um foi AGAA e AGAG positivos. Este último foi submetido à biópsia intestinal, que não mostrou alterações compatíveis com doença celíaca. O paciente que exibiu resultado concordante foi submetido à biópsia intestinal, que mostrou linfócitos intraepiteliais aumentados. Essa criança foi acompanhada no serviço e teve diagnóstico confirmado de doença celíaca; 10 pacientes apresentaram AGAA e AGAG negativos e não foram submetidos à biópsia.

Tabela 1 - Resultado de anticorpos IgA antigliadina (AGAA) e IgG antigliadina (AGAG) realizados em laboratório comercial e no laboratório do Hospital das Clínicas da UFMG

Laboratório Comercial	Laboratório do Hospital das Clínicas da UFMG				Total
	AGAA positivo	AGAG positivo	AGAA e AGAG positivo	AGAA e AGAG negativo	
AGAA positivo	1	0	1	10	12
AGAG positivo	1	9	1	40	51
AGAA e AGAG positivo	3	3	3	8	17
AGAG indeterminado	0	0	0	3	3
AGAA e AGAG indeterminado	0	1	0	0	1
AGAA ou AGAG positivo	2	2	1	12	17
Total	7	15	6	73	101

Dos 51 pacientes que apresentaram resultados positivos apenas para AGAG em laboratório comercial, nove tiveram o mesmo resultado no HC. Desses nove, um apresentava deficiência de IgA sérica e teve confirmado o diagnóstico de doença celíaca por biópsia intestinal. Dois foram submetidos à biópsia intestinal, que não ressaltou alterações compatíveis com doença celíaca. Dos seis pacientes que não foram submetidos à biópsia, cinco descreveram valores muito próximos do ponto de referência. Um paciente teve resultado de AGAG duas vezes o ponto de corte, porém não retornou ao serviço para acompanhamento. Outro relatou AGAA positivo e AGAG negativo no HC e a biópsia intestinal revelou aumento de linfócitos intraepiteliais (Marsh II). Um paciente referiu AGAA e AGAG positivos no HC, foi submetido à biópsia e foi confirmado DC. Os outros 40 pacientes que tiveram resultado negativo no HC salientaram leituras de densidade óptica próximas do ponto de corte e não foram submetidos à biópsia.

Dos 17 pacientes que tinham resultados positivos tanto para AGAA como para AGAG em laboratório comercial, três tiveram os mesmos resultados no HC, sendo feito diagnóstico de doença celíaca. Três tiveram apenas AGAA positivo no HC, dois foram submetidos à biópsia intestinal, que foi considerada dentro do padrão de normalidade, e o outro apresentava leitura de densidade óptica muito próxima do ponto de corte, não sendo indicada biópsia. Três pacientes tiveram somente AGAG positivo no HC. Desses, um tinha biópsia dentro da normalidade e em dois os resultados foram muito próximos do ponto de corte. Oito pacientes tiveram os resultados negativos no HC, muito próximos do ponto de corte, optando-se pelo acompanhamento clínico dos pacientes.

Os três pacientes que apresentaram resultados AGAG indeterminado nos laboratórios comerciais tiveram resultados negativos para AGAA e AGAG no HC. Nenhum foi submetido à biópsia jejunal.

Um paciente que apresentou AGAA e AGAG indeterminados no laboratório comercial teve resultado positivo para AGAG no HC. A leitura da densidade óptica de AGAG foi de 0,152, considerada muito próxima do ponto de corte. O paciente não foi submetido à biópsia jejunal.

Dos 17 pacientes que tiveram anticorpos antigliadina positivos sem identificação se IgG ou IgA, no laboratório comercial, dois tiveram AGAA positivo no HC. Desses, um foi submetido à biópsia, que foi compatível com doença celíaca. Um paciente não foi submetido

à biópsia, pois não pertencia ao serviço e não foi localizado. Dois tiveram apenas AGAG positivo, um foi submetido à biópsia, que foi considerada normal. Um foi positivo para AGAA e AGAG no HC, foi submetido à biópsia, que foi também considerada normal. Os demais 12 pacientes não foram submetidos à biópsia.

A Tabela 2 mostra a correlação entre os resultados dos exames laboratoriais dos laboratórios comerciais e do laboratório do Hospital das Clínicas e os resultados das biópsias intestinais.

DISCUSSÃO

Os resultados dos anticorpos antigliadina variam muito de serviço para serviço. Uma das causas dessas variações a serem consideradas é a falta de padronização das técnicas utilizadas e a definição correta de seus valores de referência para a população estudada.³⁰

Para se determinar um valor ou um intervalo de referência de um exame é necessário realizar o teste em significativo número de indivíduos de uma população saudável, para sua padronização. Vários fatores devem ser considerados no estabelecimento desse valor. Fatores próprios do teste, como a especificidade e a sensibilidade da técnica e aqueles próprios da população analisada, como a prevalência da doença, idade, gênero e outros, podem interferir no resultado.

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%.³⁰⁻³⁵ Resultados tão díspares em exames laboratoriais permitem questionar a validade dos valores extremos.

Além da técnica utilizada, a idade pode ser um fator interferente na análise de resultados de exames. Vários autores referenciam boa sensibilidade dos anticorpos antigliadina nos pacientes com idade inferior a dois anos e baixa sensibilidade dos anticorpos antitransglutaminase e anticorpos antiendomísio nessa faixa etária. Grodzinsky *et al.*³⁶ sugeriram o uso de AGAA e AGAG para crianças abaixo de dois anos de idade e antitransglutaminase ou antiendomísio para os pacientes com idade superior a essa faixa etária.^{30,37,38}

Outro ponto a ser considerado é que nos países subdesenvolvidos a população vive em condições sa-

Tabela 2 - Correlação entre resultado dos exames de anticorpos IgG e IgA anti gliadina e a histologia das biópsias intestinais

	Laboratório Comercial		Laboratório do Hospital das Clínicas UFMG		Resultados da histologia das biópsias intestinais
	AGAA	AGAG	AGAA	AGAG	
3 pacientes	+	+	+	+	Os três pacientes tiveram diagnóstico de doença celíaca.
9 pacientes	-	+	-	+	Um paciente com doença celíaca e deficiência de IgA. Dois pacientes com biópsias normais. Seis pacientes não foram submetidos à biópsia.
1 paciente	+	-	+	-	Primeira biópsia com aumento de linfócitos intraepiteliais. A segunda biópsia, dois anos após, compatível com doença celíaca.
1 paciente	-	+	+	-	Biópsia com aumento de linfócitos intraepiteliais.
3 pacientes	+	+	+	-	Dois pacientes com biópsias normais. Um paciente sem biópsia.
3 pacientes	+	+	-	+	Um paciente com biópsia normal. Dois pacientes sem biópsia.
1 paciente	+	-	+	+	Biópsia normal.
1 paciente	-	+	+	+	Biópsia padrão celíaco.
2 pacientes	Marcador positivo não especificado		+	-	Um paciente com biópsia padrão celíaco. Um paciente sem biópsia.
2 pacientes	Marcador positivo não especificado		-	+	Um paciente com biópsia normal. Um paciente sem biópsia.
1 paciente	Marcador positivo não especificado		+	+	Biópsia normal.
73 pacientes	Alguns marcadores positivos		-	-	Cinco pacientes foram submetidos à biópsia, todas foram normais.

nitárias inadequadas, propiciando mais contato com toda sorte de antígenos, como parasitários e bacterianos, quadros diarreicos de repetição e desnutrição, que aumentam a permeabilidade intestinal, levando a mais produção de anticorpos e, conseqüentemente, a resultados sorológicos falso-positivos.

Essa preocupação foi manifestada em consenso sobre diagnóstico de doença celíaca.³⁹ Nesse consenso, os autores recomendam realizar desencadeamento com glúten para confirmação do diagnóstico da doença nas crianças que habitam esses países.

Em trabalho realizado no Laboratório de Gastroenterologia do HC-UFMG, os valores de sensibilidade e especificidade dos anticorpos anti gliadina 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. Desde essa época o laboratório do HC utilizou o ponto de corte estabelecido neste trabalho para liberação dos resultados dos anticorpos anti gliadina.²⁹

Neste estudo, tanto o laboratório do HC quanto os comerciais apresentaram resultados falso-positivos e falso-negativos. Entretanto, quando o resultado dos marcadores era quatro vezes superior ao ponto de corte no laboratório do HC e 10 vezes o ponto de corte do laboratório comercial, havia melhor correlação com o diagnóstico da doença. A criança que teve diagnóstico de doença celíaca e deficiência de IgA, apresentava tanto no laboratório

comercial como no HC resultado fortemente positivo para IgG, sendo que a leitura de densidade óptica no exame do HC foi de 0,445 nm, mais de três vezes o ponto de corte. Os pacientes que foram AGAA e AGAG positivos em ambos os laboratórios e tiveram diagnóstico confirmado de doença celíaca mostraram leituras que variaram para AGAA de 0,274 nm a 0,595 nm e de AGAG de 0,180 nm a 0,471 nm. Esses resultados corroboram a necessidade de se estabelecer um ponto de corte próprio para nossa população e para cada *kit* laboratorial.

Dos exames dos laboratórios privados, 72% apresentaram resultados fracamente positivos, muito próximos do ponto de corte. Esses pacientes, por apresentarem resultado negativo no HC, não foram submetidos à biópsia jejunal e são atualmente acompanhados no Serviço de Gastroenterologia Pediátrica para seguimento de curva de crescimento e detecção de qualquer sinal, sintoma ou viragem sorológica que justifiquem a realização de biópsia jejunal.

O diagnóstico laboratorial da doença celíaca está sujeito a muitas falhas, pois nenhum marcador sorológico é 100% sensível ou específico. Por esse motivo, é necessário entender as propriedades de um teste diagnóstico e as informações que ele fornece, aplicados às várias situações clínicas. No caso de doença celíaca, tem-se observado que a variabilidade do quadro clínico por ela apresentado tem dificultado ainda mais o

diagnóstico. Atualmente, entre os estudiosos da doença, há autores que sugerem que o diagnóstico da doença pode ser estabelecido quando há clínica sugestiva, sorologia positiva, linfócitos intraepiteliais na biópsia intestinal e resposta clínica à retirada do glúten da dieta.⁴⁰ Outros autores consideram que o diagnóstico só pode ser definido após biópsia do intestino delgado com as alterações histológicas típicas da doença.⁴¹

Considerando a grande limitação na alimentação e na vida social das pessoas, é necessário rigor para se estabelecer o diagnóstico de doença celíaca. No nosso serviço, estabelece-se o diagnóstico quando o paciente apresenta sorologia positiva, histologia grau IIIb e IIIc de Marsh Oberhuber e melhora clínica com a retirada do glúten da dieta. Nos pacientes com idade inferior a dois anos, ainda se adota a realização de três biópsias intestinais, sendo a última após reintrodução do glúten na dieta por três meses, para definição diagnóstica.

CONCLUSÃO

No Brasil, ainda não foi realizada padronização para a determinação dos marcadores sorológicos para diagnóstico da doença celíaca, mesmo sabendo-se que em países subdesenvolvidos resultados falso-positivos para esses marcadores são mais frequentes. A alta 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 viés de interpretação, pois o ponto de corte é baseado em controles cuja quantidade de anticorpos é menor, levando à realização de biópsias intestinais muitas vezes desnecessárias, com questionável benefício para o paciente e com ônus dispensável para o sistema de saúde.

REFERÊNCIAS

- Schmitz U, Ko Y, Seewald S, Dusing R, Vetter H. Iron-deficiency anemia as the sole manifestation of celiac disease. *Clin Investig.* 1994; 72:519-21.
- Sigurs N, Johansson C, Elfstrand PO, Viander M, Lanner A. Prevalence of coeliac disease in diabetic children and adolescents in Sweden. *Acta Paediatr.* 1993 Oct; 82(10):748-51.
- Tanure MG, Silva IN, Bahia M, Penna, FJ. Prevalence of coeliac disease in brazilian children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006 Feb; 42(2):155-9.
- 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.* 2001; 160(5):288-92.
- Carlsson A, Axelsson I, Borulf S, *et al.* Prevalence of IgA and gliadin antibodies and IgA antiendomysium antibodies related to celiac disease in children with down syndrome. *Eur Pediatr.* 1998 Feb; 101(2):272-5.
- Gabrielli M, Cremonini F, Fiore G, *et al.* Association between migraine and celiac disease: results from a preliminary case control and therapeutic study. *Am J Gastroenterology.* 2003; 96(3):625-9.
- Rosenbach Y, Dinari G, Zahavi I, Nitzan M. Short stature as the major manifestation of celiac disease in older children. *Clin Pediatr.* 1986 Jan; 25(1):13-6.
- Stenhammar L, Fallstrom SP, Jansson G, Jansson U, Lindberg T. Celiac disease in children of short stature without gastrointestinal symptoms. *Eur J Pediatr.* 1986; 145(3):185-6.
- Oliveira MCLA, Reis FJC, Chagas AJ, *et al.* Estudo de doenças de má absorção intestinal como causa de baixa estatura monossintomática. *J Pediatr.* 1998; 74(3):213-6.
- Maggiore G, De Giacomo C, Scotta MS, Sessa F. Celiac disease presenting as chronic hepatitis in a girl. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1986 May; 5(3):501-3.
- Leonardi S, Bottaro G, Panaté R, Musumeci S. Hipertransaminasemia as the first symptom in infant celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1990; 11: 404-6.
- Morillas MJ, Gaspar E, Moles JR, Siles S, Garcia E, Nos P, *et al.* Enfermedad celiac del adulto y hepatopatía. *Rev Esp Enferm Dig.* 1991; 79(3): 197-200.
- Varkel Y, Braster A, Suprun H, Nusem D, Horn Y. Simultaneous occurrence of systemic lupus erythematosus and coeliac disease-like features. *Postgrad Med J.* 1989; 65(766):600-2.
- Lindgren S, Sjoberg K, Eriksson S. Unsuspected coeliac disease in chronic cryptogenic liver disease. *Scand J Gastroenterol.* 1994; 29(7):661-4.
- Collin P, Maki M, Keyrilainen O, Hallstrom O, Reunala T, Pasternack A. Selective IgA deficiency and coeliac disease. *Scand J Gastroenterol.* 1992; 27(5):367-71.
- Gandolfi L, Pratesi R, Cordoba JCM, Tauil PL, Gasparin M, Catassi C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95(3):689-92.
- Melo SBC, Fernandes MIM, Peres LC, Troncon LEA, Galvão, LC. Prevalence and demographic characteristics of celiac disease among blood donors in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. *Dig Dis Sci.* 2006; 51(5):1020-5.
- Modelli IC, Gandolfi L, Almeida RC, Araújo GMAC, Picanço MA, Pratesi R. Serological screening for celiac disease in symptomatic 12 to 36 month-old children. *Arq Gastroenterol.* 2010; 47(1):61-5.
- Brant KG, Silva GAP. Soroprevalência da doença celíaca em ambulatório pediátrico, no nordeste do Brasil. *Arq. Gastroenterol.* 2008; 45(3):239-42.

20. Pereira MAG, Ortiz-Agostinho CL, Nishitokukado I, *et al.* Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. *World J Gastroenterol.* 2006; 12(40):6546-50.
21. Rostami K, Mulder CJJ, van Overbeek FM, *et al.* Should relatives of coeliacs with mild clinical complaints undergo a small-bowel biopsy despite negative serology? *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2000; 12(1):51-5.
22. Almeida P, Gandolfi L, Modelli IC, Martins RC, Almeida R, Pratesi R. Prevalence of Celiac Disease among first degree relatives of Brazilian celiac patients. *Arq Gastroenterol.* 2008; 45(1):69-72.
23. Utiyama SRR, Nass FR, Kotze LMS, Nishihara RM, Ambrosio AR, Messias-Reason, IT. Triagem sorológica de familiares de pacientes com doença celíaca: anticorpos anti-endomísio, antitransglutaminase ou ambos? *Arq Gastroenterol.* 2007; 44(2):156-61.
24. Nass FR, Kotze LMS, Nishihara, RM, Messias-Reason JJ, Utiyama SRR. Serological and clinical follow-up of relatives of celiac disease patients from Southern Brazil. *Digestion.* 2011; 83: 89-95.
25. Collin P, Hallstrom O, Maki M, Viander M, Keyrilainen O. Atypical coeliac disease found with serologic screening. *Scand J Gastroenterol.* 1990 Mar; 25(3):245-50.
26. Holmes GK, Prior P, Lane MR, Pope D, Allan RN. Malignancy in coeliac disease – effect of a gluten free diet. *Gut.* 1989; 30(3):333-8.
27. March, MN. Is celiac disease (gluten sensitivity) a premalignant disorder? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1997; 24(1):25-7.
28. Logan, RFA. Screening for celiac disease – has the time come for mass screening? *Acta Paediatr.* 1996 May; 412:15-9.
29. Bahia M, Penna FJ, Sampaio IBM, Silva GMF, Andrade EMG. Determining IgA and IgG Antigliadin, IgA Antitransglutaminase, and Antiendomysial Antibodies in Monkey Esophagus and in Umbilical Cord for Diagnosis of Celiac Disease in Developing Countries. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007 Nov; 45(5):551-8.
30. Bahia M, Rabello A, Brasileiro Filho G, Penna FJ. Serum antigliadin antibody levels as a screening criterion for celiac disease in a developing country. *Br J Med Biol Res.* 2001; 34:415-20.
31. O'Farrelly C, Kelly J, Feighery C. Gliadin antibodies level in screening test for coeliac disease. *Br Med J.* 1984; 1:70-1.
32. 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.* 1986; 1:26-9.
33. Volta U, Lazzari R, Cafaro C, Collina A, Baldoni A, Balli F. Validità degli anticorpi antigliadina nella diagnosi di malattia celíaca. *Pediatr Med Chir.* 1986; 8:605-610.
34. Calabuig M, Torregosa R, Polo P, Tuset L, Tomás C, Alvarez V, *et al.* Serological markers and celiac disease: a new diagnostic approach? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1990 May; 10(4):435-42.
35. Mcmillan SA, Haughton DJ, Biggart JD, Edgar JD, Porter KG, Mcneil TA. Predictive value for celiac disease of antibodies to gliadin, endomysium and jejunum in patients attending for jejunal biopsy. *Br Med J.* 1991; 303(6811):1163-5.
36. Grodzinsky E, Jansson G, Skogh T, Stenhammar L, Falth-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.* 1995 Mar; 84(3):294-8.
37. Maglio M, Tosco A, Paparo F, *et al.* Serum and Intestinal Celiac Disease-associated Antibodies in Children With Celiac Disease Younger Than 2 Years of Age. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010 Jan; 50(1):43-8.
38. Lagerqvist C, Dahlbom I, Hansson T, *et al.* Antigliadin Immunoglobulin A Best in Finding Celiac Disease in Children Younger Than 18 Months of Age. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Oct; 47(4):428-35.
39. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Shmerling DH, Visakorpi JK. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. *Arch Dis Child.* 1990; 65(8):909-11.
40. Catassi C, Fasano A. Celiac Disease Diagnosis: Simple Rules Are Better Than Complicated Algorithms. *Am J Med.* 2010 Aug; 123(8):691-3.
41. Tack GJ, Verbeek WHM, Schreurs MWJ, Mulder CJJ. The spectrum of celiac disease: epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2010 Apr; 7:204-13.