

CLARICE PIRES ABRANTES LEMOS

Pesquisa do anticorpo antitransglutaminase tissular avaliando as interações da transglutaminase com a fibronectina e comparação com os resultados de dois ensaios comerciais

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título Mestre em Ciências

Área de concentração: Gastroenterologia Clínica

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Caçado

São Paulo

2005

*“Não viverei em vão, se puder
Salvar de partir-se um coração,
Se eu puder aliviar uma vida
Sofrida, ou abrandar uma dor,
Ou ajudar exangue passarinho
A subir de novo ao ninho-
Não viverei em vão”
Emily Dickinson (1830-1886)*

*“Se orgulha da bondade o ser que não precisa de uma lágrima
para praticar o bem. Encontra em cada sorriso mais um motivo de
lutar por uma vida mais justa.”
Eduardo A Lemos*

*À minha família,
base da formação dos valores morais e éticos.*

*Ào meu marido Carlos,
companheiro de tantos anos. Obrigada pelo amor, carinho
compreensão, por partilhar da busca dos meus sonhos. Obrigada
por fazer parte da minha vida.*

“O amor nada pede, apenas partilha o quanto pode”

*Aos meus filhos, Eduardo e Gustavo,
"É preciso reviver o sonho e a certeza de que tudo vai mudar. É
necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro
de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos
de razão. O importante é aproveitar o momento e aprender sua
duração, pois a vida está nos olhos de quem sabe ver".*

Gabriel Garcia Márquez

*Obrigada pela compreensão, pelo apoio e pelo amor que vocês me
dedicam.*

*Aos meus pais, Amélia e Manuel,
Na sua simplicidade, me ensinaram o caminho da honestidade,
responsabilidade e respeito. Meu amor eterno.*

À minha irmã Fátima, pelo apoio, estímulo e carinho.

Ao meu irmão Carlos.

AGRADECIMENTOS

Com certeza os aprendizados desta dissertação foram muitos e vão além dos dados aqui registrados, letras, números e folhas. Muito foi dito, compartilhado e aprendido. Talvez os maiores aprendizados sejam aqueles que transcendem a vida profissional e seguirão sempre comigo, não serão suplantados por técnicas mais sensíveis ou específicas, serão sempre experiências marcantes, vividas e assimiladas.

Muitas pessoas participaram de alguma forma deste trabalho, gostaria de expressar minha eterna gratidão a todos que colaboraram para a execução e finalização desta dissertação. Meu eterno carinho a todos. Em especial gostaria de agradecer:

Ao Prof. Dr. Eduardo Luiz Rachid Cançado, meu orientador, obrigada pela oportunidade da realização deste trabalho. Eduardo, como acredito que nada é por acaso, agradeço por você ter aceitado minha ajuda quando fui procurá-lo na época em que estava terminando sua tese de mestrado. Com você comecei a aprender e viver com os auto-anticorpos. Obrigada pela confiança em mim depositada nesses anos todos em que estamos trabalhando juntos. Com certeza muito aprendi com você neste período.

À amiga Maria Cristina Nakhle, agradeço muito a você por toda a ajuda na parte prática e na finalização desta dissertação. Com certeza sem sua ajuda seria muito difícil chegar até aqui. Cris, obrigada por tudo que

compartilhamos neste período, por todos os nossos risos e lágrimas, pela esperança, pelo companheirismo.

Ao Dr. Alberto Queiroz Farias, obrigada pelos ensinamentos destes anos todos de convívio. Foi graças a você e sua tese de mestrado, que me familiarizei com a técnica de ELISA, hoje assunto do meu mestrado. Obrigada pela ajuda e sugestões sempre bem vindas durante neste trabalho, Obrigada pelo convívio, pela constante boa vontade em ajudar, pelos ensinamentos diários, que com certeza vão muito além da Medicina.

À Dra. Luciana Lofêgo Gonçalves, mesmo distante geograficamente, sempre presente com apoio e carinho. Obrigada pela sua atenção e preocupação. Obrigada pela ajuda na análise estatística deste trabalho, obrigada pela amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Caetano da Silva por ter me aceitado como estagiária do laboratório no último ano de faculdade, tanto tempo atrás. Obrigada pelo estímulo e apoio constantes.

Ao Prof. Dr. Flair José Carrilho pelo apoio durante a realização desta pesquisa e pelo empenho em reorganizar a pós-graduação.

À amiga Kátia Maria de Oliveira obrigada pelo apoio constante, mesmo nas horas de desânimo. Obrigada pela ajuda na finalização deste trabalho, seu capricho, senso de apresentação, formatação e estética são exemplares.

Aos componentes da banca de qualificação, Prof. Dr. Luiz Caetano da Silva, Dra Claudia Pinto Marques Souza de Oliveira e Dra Vera Aparecida dos

Santos pelas pertinentes sugestões apresentadas quando da aula de qualificação.

À amiga Francisca de Fátima Valentim pelo companheirismo de tantos anos e por muitas vezes ouvir meus desabafos.

À amiga Dirce Mary Correia Lima Meisel por todos estes anos de convívio diário, pela preocupação constante comigo, pela amizade sincera, pelo carinho. Dirce, você é uma pessoa muito especial, mais do que uma amiga, uma irmã de alma.

Ao amigo Dr. Juliano Machado de Oliveira pelo ombro amigo, pelo carinho e apoio.

À Dra. Maria Carmem Arroyo Sanchez pelas sugestões durante a padronização do ELISA.

Às equipes do laboratório de soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical pela colaboração permitindo a utilização do leitor das placas de ELISA.

Aos colegas do laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose, D. Joana, D. Adyles, Maria Cristina Conceição Mello, Susana, Ana Maria, Joyce, Márcia, pelo convívio diário.

Aos colegas do Laboratório de Provas Funcionais da Gastroenterologia, Dra. Rejane Mattar, Maysa Leite de Queiroz, Carlos, Maria e Aníbal pela ajuda na

rotina dos auto-anticorpos e pela ajuda no recebimento e separação dos materiais.

Ao Prof. Thales de Brito pelos sábios ensinamentos diários.

Ao Prof. Pedro Paulo Chieffi pelo carinho e apoio constantes.

Ao Dr. Ronaldo César Gryscek, responsável do LIM 06 pela oportunidade de desenvolver este trabalho no laboratório de sua responsabilidade.

À Sra. Fabricia Izoton pela análise estatística dos dados.

À Fabiana Renata Soares Bispo, secretária da pós-graduação da disciplina de Gastroenterologia, pelo profissionalismo e responsabilidade com os alunos da pós-graduação, lembrando-nos sempre de datas e prazos.

Às funcionárias da Gastroenterologia clínica Claudia Arruda, Fátima Gomes e Sonia Tozetti pela boa vontade e ajuda.

À Rita de Cássia Camargo, um “anjo” que apareceu em minha vida, companheira de descobertas e caminhada.

Aos amigos, Márcia, Renato, Claudia, Antonio e Soraya, por tantas histórias vividas e re-vividas. Por todos os momentos de alegria e boas risadas que vivemos juntos.

Projeto de Hepatologia - Hepatites/Câncer, sob os auspícios da Alves de Queiroz Family Fundy for Research, pelo auxílio à realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da doença celíaca	1
1.2. Auto-anticorpos na doença celíaca	5

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos principais.....	14
2.2. Objetivos secundários.....	15

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

3.2. Material.....	18
3.2.1. Materiais e reagentes.....	18
3.2.2. Antígenos	20
3.2.3. Anticorpos controles.....	21
3.2.4. Conjugados (fluorocromos	21
3.2.5. ELISA comercial.....	21
3.2.6. Aparelhos	22
3.2.7. Softwares	22
3.3. Métodos	22
3.3.1. Anticorpo antiendomísio.....	22

3.3.2. Padronização da concentração da Transglutaminase e da fibronectina para a pesquisa do anticorpo antitransglutaminase e do antifibronectina pela técnica de ELISA indireto	24
3.3.3. Padronização do ELISA indireto utilizando o complexo transglutaminase/fibronectina como substrato	25
3.3.4. ELISA comercial.....	27
3.3.5. Estudos comparativos realizados.....	28
3.4. Aspectos éticos	29
3.5. Análise estatística.....	29
4. RESULTADOS	
4.1. Pesquisa do anti-tTg, do antifibronectina e do anti-tTg/fibronectina por ELISA <i>in house</i>	30
4.2. Pesquisa dos anticorpos anti-tTg, antifibronectina e anti-tTg/ fibronectina pela técnica de ELISA <i>in house</i> no grupo “DCNT” e nos grupos controles.....	31
4.3. Positividade do anti-tTg pela técnica de ELISA <i>in house</i>	35
4.4. Positividade do ELISA <i>in house</i> anti-tTg, antifibronectina e anti-tTg/fibronectina nos pacientes com DCNT e nos grupos controles (resumo).....	39
4.5. Comparação entre os resultados do anti-tTg ao ELISA <i>in house</i> e os títulos do AAE à Imunofluorescência Indireta	41
4.6. Positividade do anti-tTg, do anti-tTg/fibronectina pelo ELISA <i>in house</i> no grupo “DCNT” por faixa etária	43
4.7. Positividade do anti-tTg, antifibronectina e anti-tTg/fibronectina pelo ELISA <i>in house</i> no grupo “DII” de acordo com a doença de base específica	44
4.8. Resultados do ELISA para detecção do anticorpo anti-tTg utilizando <i>Kits</i> comerciais	47

4.9.	Concordância entre os resultados do anti-tTg ao ELISA <i>in house</i> e os resultados do ELISA comercial anti-htTg nos pacientes com “DCNT” e nos grupos controles.....	49
4.10.	Concordância entre os resultados do anti-tTg ao ELISA anti-tTg de cobaia <i>in house</i> e os resultados do ELISA comercial anti-tTg de cobaia comercial nos pacientes com DCNT e nos grupos controles.....	51
4.11.	Concordância entre os resultados dos ELISAs comerciais anti-tTg de cobaia e anti-htTg	54
5.	DISCUSSÃO	58
6.	CONCLUSÕES	68
ANEXOS		
	Anexo A	70
	Anexo B	77
	Anexo C	84
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reação cruzada da tTg. A tTg catalisa uma transferência de glutamil lisina dependente de cálcio que resulta numa reação cruzada proteica irreversível. através da ligação ϵ (γ -glutamil) lisina. Embora aceptores glutamil sejam numerosos, o número de doadores de glutamil é limitado..... 4
- Figura 2.** AAE em corte de cordão umbilical humano. Detalhe em corte de arteríola, mostrando o reforço do endomísio da fibra muscular, aumento de 200x(A) e 400x(B)..... 23
- Figura 3.** Padronização da concentração da transglutaminase (5 e 10 $\mu\text{g/ml}$) para a realização do ELISA *in house*. (DCNT- doença celíaca não tratada, DCT - doença celíaca tratada, DII- doença inflamatória intestinal, HAI- hepatite auto-imune Tipo I, DiaCro- diarreia crônica AAE negativo; S- saudáveis)..... 30
- Figura 4.** Antitransglutaminase ao ELISA nos diversos grupos segundo os valores de corte de 2 e 3 desvios-padrão. (DCA- doença celíaca não tratada, DCT - doença celíaca tratada, DII- doença inflamatória intestinal, HAI- hepatite auto imune Tipo I, DiaCro- diarreia crônica AAE negativo; S-saudáveis)..... 36
- Figura 5.** "Antifibronectina" ao ELISA nos diversos grupos segundo os valores de corte de 2 e 3 desvios-padrão. (DCNT- doença celíaca não tratada, DCT - doença celíaca tratada, DII- doença inflamatória intestinal, HAI- hepatite auto imune tipo I; DiaCro- diarreia crônica AAE negativo; S- saudáveis)..... 37
- Figura 6.** Antitransglutaminase/fibronectina ao ELISA nos diversos grupos segundo os valores de corte de 2 e 3 desvios-padrão. (DCNT- doença celíaca não tratada, DCT - doença celíaca tratada, DII- doença inflamatória intestinal, HAI- hepatite auto imune tipo 1; DiaCro- diarreia crônica AAE negativo; S- saudáveis)..... 38

Figura 7. Média das DO do antitransglutaminase ao ELISA por faixa etária.....	43
Figura 8. Média das DO do antitransglutaminase/fibronectina ao ELISA, por faixa etária.....	44
Figura 9. Média das DO do antitransglutaminase, do antifibronectina e do antitransglutaminase/fibronectina ao ELISA, nos subgrupos RCUI e Doença de Crohn.....	45
Figura 10. Anti-htTg (•) e anti-tTg (□) ao ELISA comercial nos diversos grupos (DCNT- doença celíaca não tratada, DCT - doença celíaca tratada, DII- doença inflamatória intestinal,; DiaCro- diarreia crônica AAE negativo; HAI- hepatite auto imune tipo 1; S- saudáveis).....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sensibilidade e especificidade para a pesquisa do AAE.....	08
Tabela 2. Sensibilidade e especificidade para a pesquisa do anti-tTg IgA....	11
Tabela 3. Estudos comparando-se a pesquisa do AAE IgA com a pesquisa do anti-tTg IgA.....	13
Tabela 4. Média, desvios-padrão e medianas das DO do ELISA para a detecção do anti-tTg nos diversos grupos do estudo.....	31
Tabela 5. Média, desvios-padrão e medianas das DO do ELISA para a detecção do antifibronectina nos diversos grupos do estudo.....	32
Tabela 6. Média, desvios-padrão e medianas das DO do ELISA para a detecção do anti-tTg/fibronectina nos diversos grupos do estudo.....	32
Tabela 7. Comparação das DO do ELISA para a detecção do anti-tTg, do antifibronectina e do anti-tTg/fibronectina entre o grupo “DCNT” e os demais grupos controles.....	34
Tabela 8. Positividade do anti-tTg ao ELISA segundo diferentes valores de corte (dois e três desvios-padrão) nos grupos estudados.....	36
Tabela 9. Positividade do antifibronectina ao ELISA segundo diferentes valores de corte (dois e três desvios-padrão) nos grupos estudados.....	37
Tabela 10. Positividade do anti-tTg/fibronectina ao ELISA segundo diferentes valores de corte (dois e três desvios-padrão) nos grupos estudados.....	38
Tabela 11. Positividade do anti-tTg, antifibronectina e anti-tTg/fibronectina nos diversos grupos baseada na média das DO acrescida de três desvios-padrão.....	39

Tabela 12. Relação entre os títulos do AAE à IFI e a positividade do anti-tTg ao ELISA no grupo “DCNT”	41
Tabela 13. Relação entre os títulos do AAE à IFI e a positividade do antifibrinectina ao ELISA no grupo “DCNT”	42
Tabela 14. Relação entre os títulos do AAE à IFI e a positividade do anti-tTg/fibrinectina ao ELISA no grupo “DCNT”	42
Tabela 15. Média, desvio-padrão e mediana das DO do ELISA para a detecção de anti-tTg nos subgrupos “doença de Crohn” e “RCUI” do grupo “DII”	45
Tabela 16: Positividade do anti-tTg, antifibrinectina e anti-tTg/fibrinectina nos subgrupos “RCUI” e “doença de Crohn” baseando-se na média das DO acrescida de três desvios-padrão.....	46
Tabela 17: Comparação da positividade do anti-tTg, do antifibrinectina e do anti-tTg/fibrinectina entre o subgrupo “doença de Crohn e “RCUI”	46
Tabela 18. Positividade do anti-tTg de cobaia para o ELISA <i>in house</i> e dos kits comerciais anti-htTg e anti-tTg de cobaia nos diversos grupos.....	48
Tabela 19. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia <i>in house</i> e do anti-htTg comercial no grupo “DCNT”	49
Tabela 20. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia <i>in house</i> e do anti-htTg comercial no grupo “DCT”	49
Tabela 21. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia <i>in house</i> e anti-htTg comercial no grupo “DiaCro”	50
Tabela 22. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia <i>in house</i> e do anti-htTg comercial no grupo “DII”	50
Tabela 23. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia <i>in house</i> e o anti-htTg comercial no grupo “HAI”	50

Tabela 24. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia <i>in house</i> e o anti h-tTg comercial no grupo “saudáveis”	51
Tabela 25. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia <i>in house</i> e o anti-tTg de cobaia comercial no grupo “DCNT”	52
Tabela 26. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia <i>in house</i> e o anti- tTg de cobaia comercial no grupo “DCT”	52
Tabela 27. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia <i>in house</i> e o anti-tTg de cobaia comercial no grupo “DiaCro”	52
Tabela 28. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia <i>in house</i> e do anti-tTg de cobaia comercial no grupo “DII”	53
Tabela 29. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia <i>in house</i> e do anti-tTg de cobaia comercial no grupo “HAI”	53
Tabela 30. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia <i>in house</i> e do anti- tTg de cobaia comercial no grupo “saudáveis”	54
Tabela 31. Concordância entre os resultados dos ELISAs comerciais anti-htTg e o anti-tTg de cobaia no grupo “DCNT”	55
Tabela 32. Concordância entre os resultados dos ELISAs comerciais anti-htTg e o anti-tTg de cobaia no grupo “DCT”	55
Tabela 33. Concordância entre os resultados dos ELISAs comerciais anti-htTg e o anti- tTg de cobaia no grupo “DiaCro”	56
Tabela 34. Concordância entre os resultados dos ELISAs comerciais anti-htTg e o anti-tTg de cobaia no grupo “DII”	56
Tabela 35. Concordância entre os resultados dos ELISAs comerciais anti-htTg e o anti-tTg de cobaia no grupo “HAI”	57
Tabela 36. Concordância entre os resultados dos ELISAs comerciais anti-htTg e o anti-tTg de cobaia no grupo “saudáveis”	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AAE: Anticorpo antiendomísio

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

tTg: transglutaminase tissular extraída de fígado de cobaia

htTg: transglutaminase tissular recombinante humana

anti-tTg: anticorpo antitransglutaminase tissular

anti-htTg: anticorpo antitransglutaminase tissular recombinante humana

AGA: anticorpo anti gliadina

ARA: Anticorpo anti reticulina

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay

DCNT: Doença celíaca não tratada

DCT: doença celíaca tratada

DII: Doença inflamatória intestinal

RCUI: Retocolite clcerativa Idiopática

DiaCro: Diarréia crônica

HAI 1: Hepatite auto-imune tipo I

PBS: solução salina tamponada com fosfatos

IFI: Imunofluorescência Indireta

IgA: Imunoglobulina da classe A

Tris: trishidroximetil aminometano

TBS: tampão tris 0,05mMol/l com Cloreto de Cálcio 0,85%

TTBS: TBS com Cloreto de Cálcio 5mMol/l

OPD: O-Fenilenodiamina

TMB: tetrametilbenzidina

ABRANTES-LEMOS, C. P. – **Pesquisa do anticorpo antitransglutaminase tissular avaliando as interações da transglutaminase com a fibronectina e comparação com os resultados de dois ensaios comerciais.** São Paulo, 2005. Dissertação. Mestrado – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

INTRODUÇÃO: Os principais marcadores sorológicos da doença celíaca são os autoanticorpos anti-endomísio (AAE) e anti-transglutaminase tissular (anti-tTg). A transglutaminase (tTg) é o antígeno-alvo reconhecido pelo AAE e, por esse motivo, vem sendo utilizada em ensaios diagnósticos específicos. Entretanto, os dados publicados têm sido contraditórios quanto à sua superioridade em relação à pesquisa do AAE. Apesar da tTg ser uma enzima citoplasmática, as reações de imunofluorescência indireta indicam que o AAE reage com componentes da matriz extra-celular, especialmente a fibronectina. Os testes imunoenzimáticos padronizados até o momento utilizam apenas a tTg, não tendo sido estudada se a adição de fibronectina ao substrato tTg melhoraria a acurácia diagnóstica. **OBJETIVOS:** 1) Padronizar a pesquisa do anti-tTg pela técnica de ELISA indireto; 2) Padronizar a pesquisa do anticorpo contra o complexo tTg/fibronectina; 3) Comparar os resultados do ELISA indireto com os substratos tTg, fibronectina ou complexo tTg/fibronectina na doença celíaca não tratada e em grupos controles; 4) Comparar os resultados do ELISA indireto desenvolvido *in house* com os resultados obtidos utilizando-se os *kits* comerciais (com tTg e htTg como substrato). **MATERIAIS E MÉTODOS:** A casuística foi composta por 173 pacientes, sendo 49 com doença celíaca não tratada e 124 controles (pacientes com diarreia crônica, n=30; doença inflamatória intestinal, n=23; hepatite auto-imune tipo 1, n=30; doença celíaca após tratamento, n=23; indivíduos saudáveis, n=18). O AAE foi pesquisado por IFI em cortes de cordão umbilical humano. O ELISA indireto foi utilizado para pesquisar a reatividade contra a tTg (obtida de fígado de cobaia), a fibronectina (recombinante de fibroblastos humanos) e o complexo tTg/fibronectina. Esses ensaios foram comparados com os *kits* comerciais

para detecção de reatividade contra tTg de cobaia e tTg humana (Inova Diagnostics, Inc, EUA). A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes t de student, Exato de Fisher, McNemar e de concordância Kappa, quando apropriados. **RESULTADOS:** A positividade para o anti-tTg, anti-fibronectina e anti-tTg/fibronectina foi observada em, respectivamente: 46,9, 51 e 42,9% no grupo doença celíaca não tratada; 0%, 13% e 0% no grupo doença celíaca tratada; 39,1%, 65,2% e 56,5% no grupo doença inflamatória intestinal; 20%, 50% e 20% no grupo hepatite auto-imune; 6,7%, 60% e 26,7% no grupo diarreia crônica. Entre os controles saudáveis, não houve positividade para nenhum desses autoanticorpos. Comparando a positividade do anti-tTg e do complexo tTg/fibronectina no grupo doença celíaca não tratada, observou-se que a adição de fibronectina não melhorou a acurácia da IFI ($p= 0,68$; risco relativo 1,15; intervalo de confiança de 95%= 0,7334-1,803). Comparando-se os títulos do AAE com os resultados do ELISA, observou-se que a maior positividade para o anti-tTg, o anti-fibronectina e para o anti-tTg/fibronectina ocorreu quando os títulos do AAE foram iguais ou maiores a 1/1280. Não houve correlação entre a faixa etária dos pacientes e os resultados dos autoanticorpos celíacos. Pacientes com retocolite ulcerativa apresentaram maiores taxas de positividade do anti-tTg ($p= 0,029$, RR=6,1 e IC95%= 0,9-41,5) e do anti-fibronectina ($p=0,0097$, RR=6,9 e IC95% 1,0-46,0) quando comparados aos pacientes com doença de Crohn. A concordância entre o ELISA *in house* e o anti-htTg (kit comercial) foi de: 46,9% (coeficiente kappa 0) no grupo doença celíaca não tratada; 45,5% (kappa 0) no grupo doença celíaca tratada; 90% (kappa 0,047, $p=0,786$; McNemar, $p=1,0$) no grupo diarreia crônica; 56,5% (kappa 0,085, $p=0,412$; McNemar, $p=0,021$) no grupo doença inflamatória intestinal; 83,3% (kappa 0,359, $p=0,033$; McNemar, $p=0,375$) no grupo hepatite auto-imune e 100% no grupo indivíduos saudáveis. A concordância entre o ELISA *in house* e o anti-tTg de cobaia (kit comercial) foi de: 46,9% (coeficiente kappa 0) no grupo doença celíaca não tratada; 54,5% (kappa 0) no grupo doença celíaca tratada; 90% (kappa 0,047, $p=0,786$; McNemar, $p=1,0$) no grupo diarreia crônica; 52,2% (kappa 0,166, $p=0,235$ McNemar, $p=0,065$ no

grupo doença inflamatória intestinal; 86,7% (kappa 0,524 p=0,033; McNemar, p=0,625) no grupo hepatite auto-imune e 94% (kappa 0) no grupo indivíduos saudáveis. A concordância de resultados entre os dois kits comerciais variou de 72,7% a 100% nos diferentes grupos. **CONCLUSÕES:** 1).O ELISA *in house* não foi boa técnica para a pesquisa do anti-tTg, em razão da baixa positividade no grupo doença celíaca não tratada e alta positividade nos grupos controles com AAE negativo; 2) A utilização do complexo tTg/ fibronectina não melhorou os resultados de positividade no grupo doença celíaca não tratada; 3) Não houve diferença na positividade para o anti-tTg entre crianças e adultos no grupo doença celíaca não tratada; 4) Houve relação de positividade entre os títulos do AAE e a positividade do anti-tTg para o ELISA *in house*; 5) A positividade dos anticorpos contra os três substratos testados foi maior no subgrupo retocolite ulcerativa inespecífica do que a observada no subgrupo doença de Crohn; 6) Os *kits* comerciais foram bons testes para discriminar a positividade no grupo doença celíaca não tratada em relação aos grupos controles utilizados; 7) A ausência de reatividade do anticorpo anti-tTg pelos *kits* comerciais não acompanhou sistematicamente a negatificação do AAE no grupo doença celíaca tratada, sugerindo ser o ELISA o melhor método para acompanhamento terapêutico; 8) Qualquer padronização do ELISA para diagnóstico da doença celíaca deverá ser feita comparando-se os resultados obtidos com *kits* comerciais e com o AAE; 9) Diante dos resultados obtidos, a pesquisa do anti-tTg tissular de cobaia *in house* não pôde ser incorporada na triagem diagnóstica para doença celíaca em nosso serviço.

ABRANTES-LEMOS, C. P. – **Standardization of anti-tissue transglutaminase antibody detection and assessment of transglutaminase interactions with fibronectin. Comparison of the results with two commercially available essays.** São Paulo, 2005. Dissertação. Mestrado – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

INTRODUCTION: anti-endomysial (EMA) and anti-tissue transglutaminase (anti-tTg) are the main circulating autoantibodies in patients with celiac disease. Inasmuch as tissue transglutaminase (tTg) is the target antigen of EMA, specific assays have been developed to establish the serological diagnosis of celiac disease. However, published data are contradictory regarding their superiority over EMA. tTg is a cytoplasm enzyme, but indirect immunofluorescence reaction (IIF) indicates that EMA reacts with components of extracellular matrix, particularly with fibronectin. To date, serological tests have been standardized only with tTg. It is unknown if the addition of fibronectin to tTg substrate will improve the diagnostic accuracy.

AIMS: 1) to standardize the indirect ELISA for detection of anti-tTg; 2) to standardize the indirect ELISA for detection of antibodies against the complex tTg/fibronectin; 3) to compare the results of anti-tTg, anti-fibronectin and anti-tTg/fibronectin antibody ELISAS of patients with not treated and treated celiac disease; 4) to compare the results of the in house indirect ELISA with available commercial kits (with tTg and htTg). **MATERIALS AND**

METHODS: the casuistic was formed by the sera of 173 patients, including 49 with celiac disease without treatment and 124 controls (chronic diarrhea=30; inflammatory bowel disease, n=23; autoimmune hepatitis type 1 n=30; treated celiac disease, n=23; e healthy individuals, n=18). EMA was detected by IIF, using sections of human umbilical cord as substrate. Indirect ELISA was carried out for detection of reactivity against tTg (from guinea pig liver), fibronectin (recombinant from human fibroblast) and the complex tTg-fibronectin. The performance of those essays was compared with that of anti-tTg and anti-htTg kits, purchased from Inova Diagnostics, Inc, EUA.

Statistical analysis was performed using student t test, Fisher exact test, McNemar test and kappa correlation test when appropriate. **RESULTS:** Seropositivity to anti-tTg, antifibronectin and anti-tTg/fibronectin was observed in, respectively: 46.9%, 51% e 42.9% in the celiac disease without treatment group; 0%, 13% and 0% in the treated celiac disease group; 39.1%, 65.2% e 56.5% in the inflammatory bowel disease group; 20%, 50% and 20% in the autoimmune hepatitis group; 6.7%, 60% e 26.7% in the chronic diarrhea group. No patient among healthy controls had seropositivity to those aforementioned antibodies. Comparing the anti-tTg and tTg/fibronectin complex seropositivity in the celiac disease without treatment group, it was found that the addition of fibronectin to the tTg substrate did not improve the accuracy of the assay ($p= 0.68$; relative risk 1.15; 95% confidence interval= 0.7334-1.803). Comparing EMA titers with ELISA positivity, it was found that higher seropositivity to anti-tTg, antifibronectin and anti-tTg/fibronectin complex occurred in sera with EMA titers equal or higher than 1/1280. There was no relation between age and the seropositivity of celiac antibodies. Patients with inflammatory bowel disease had higher rates of seropositivity to anti-tTg ($p= 0.029$, RR=6.1 e IC95%= 0.9-41.5) and antifibronectin ($p=0.0097$, RR=6.9 e IC95% 1.0-46.0) when compared with patients with Crohn disease. The concordance coefficients between the in house ELISA and the anti-htTg (commercial kit) was: 46.9% (kappa coefficient kappa 0) in the celiac disease without treatment group; 45.5% (kappa 0) in the treated celiac disease group; 90% (kappa 0.047, $p=0.786$; McNemar, $p=1.0$) in the chronic diarrhea group; 56.5% (kappa 0.085, $p=0.412$; McNemar, $p=0.021$) in the inflammatory bowel disease group; 83.3% (kappa 0.359, $p=0.033$; McNemar, $p=0.375$) in the autoimmune hepatitis group and 100% in the healthy individuals group. The concordance coefficients between the in house ELISA and the anti-tTg (guinea pig, commercial kit) was: 46.9% (kappa coefficient 0) in the celiac disease without treatment group; 54.5% (kappa 0) in the treated celiac disease group; 90% (kappa 0.047, $p=0.786$; McNemar, $p=1.0$) in the chronic diarrhea group; 52.2% (kappa 0.166, $p=0.235$; McNemar, $p=0.033$) in the inflammatory bowel

disease group; 86.7% (kappa 0.524, $p=0.033$; McNemar, $p=0.635$) in the autoimmune hepatitis group and 94% (kappa 0) in the healthy individuals group. The concordance coefficients between the two commercial kits varied from 72.7% to 100% in the different groups. **CONCLUSIONS:** 1) The in house ELISA was not a good technique for detecting anti-tTg reactivity due to its low rate of positivity in patients with celiac disease without treatment and high rate of positivity in EMA negative control groups; 2) The addition of fibronectin to the substrate tTg did not improve the diagnostic accuracy of the essay in patients with celiac disease without treatment; 3) There was no difference in anti-tTg seropositivity rates between children and adults with celiac disease without treatment; 4) There was a correlation between the EMA titers and seropositivity to anti-tTg, detected by the in house ELISA; 5) The seropositivity of all autoantibodies by ELISA was higher in patients with ulcerative colitis when compared with Crohn disease; 6) Commercial kits were adequate for the identification of positive cases (with celiac disease without treatment) and negative cases among controls; 7) The seronegativity to anti-tTg antibodies by commercial kit was not systematically followed by the negativation of EMA in patients with celiac disease; Those findings suggest that anti-tTg ELISA are suitable for therapeutic monitoring of celiac disease; 8) The standardization of any ELISA for detection of celiac antibodies should include the comparison with both available commercial kits and AAE; 9) According to the results of the current study, the detection of anti-tTg antibodies, using an in house ELISA with guinea pig liver tTg as substrate, could not be incorporated in the routine work-up for the serodiagnosis of celiac disease in our hospital.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da doença celíaca

A doença celíaca é doença decorrente da intolerância às proteínas do glúten, particularmente à gliadina. Caracteriza-se por atrofia da mucosa do intestino delgado proximal, representada por atrofia dos vilos, hiperplasia de criptas e infiltrado linfoplasmocitário, e conseqüente síndrome de má-absorção, em indivíduos geneticamente predispostos.¹

A lesão da mucosa ocorre em pessoas cuja dieta contém glúten e caracteristicamente costuma melhorar após sua retirada da alimentação. Se houver reintrodução do glúten, ocorrerá novamente lesão da mucosa. Essa definição de doença, formulada em 1969 pela Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição, conhecida como critérios de *Interlaken*, foi posteriormente modificada em 1990. Atualmente, não se exige mais a reexposição ao glúten, que está até mesmo contra-indicada, para o diagnóstico da doença celíaca.

A doença celíaca é atualmente considerada doença de etiologia multifatorial e possivelmente poligênica. Embora se saiba que fatores como a composição da dieta, refletindo o teor de gliadina, a susceptibilidade imunogenética, ligada principalmente às moléculas de HLA e a resposta humoral altamente específica representada pelo anticorpo antiendomísio (AAE) sejam fundamentais na patogenia da doença, outros fatores adicionais como infecções bacterianas e virais e a idade do início da exposição ao glúten parecem modular o surgimento da doença.²

Outros cereais como o centeio e a cevada, e em menor grau a aveia, que guardam entre si uma relação taxonômica muito próxima, também são importantes na patogenia da doença. Esses cereais têm em comum o fato de serem ricos em prolaminas com alto teor de glutamina e prolina, em contraste com as prolaminas não tóxicas do arroz e do milho. As prolaminas da aveia (aveninas) têm composição intermediária desses aminoácidos e, portanto, como seria lógico esperar, são tóxicas se ingeridas em grande quantidade. As prolaminas do trigo podem ser fracionadas em eletroforese em gel em alfa, beta, gama e ômega gliadinas. Estudos de seqüenciamento de aminoácidos mostraram que as gliadinas alfa e beta são semelhantes. Quando se utilizam técnicas como HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), mais de 100 componentes podem ser isolados. O termo gliadina A refere-se ao conjunto de alfagliadinas que são tóxicas por instilação direta na mucosa e essas gliadinas têm sido o substrato empregado nos diversos estudos que procuraram avaliar as seqüências de aminoácidos (*motifs*) que produzem toxicidade. Esses estudos foram realizados construindo-se peptídeos sintéticos com fragmentos trípticos da molécula da gliadina, de diferentes pesos moleculares, que foram então instilados na mucosa intestinal para avaliar sua capacidade de desencadear resposta inflamatória e imunológica. Dois *motifs* têm sido relacionados à lesão da mucosa em estudos experimentais, porém ainda há controvérsias, porque parece que isoladamente não são suficientes para lesar a mucosa.^{2,3}

Fatores genéticos estão implicados na patogenia da doença celíaca, como demonstra a alta associação de familiares de primeiro grau

acometidos, a alta concordância entre gêmeos monozigóticos e a associação freqüente com outras doenças de natureza auto-imune. Entre os fatores genéticos, a susceptibilidade conferida pelas moléculas de HLA tem sido extensamente avaliada na literatura. As primeiras associações bem documentadas foram com as moléculas DR de classe II, particularmente com as DR3, DR7 e DR5, e com os alelos DQ. De fato, os alelos DQA1*0501 e DQB1*0201, do DQ2, estão presentes em mais de 92% dos celíacos enquanto o HLA DQ8, alelos DQA1*0301 e DQB1*0302 são encontrados em menor parte dos casos. Entretanto, esses alelos marcam a susceptibilidade genética a várias doenças auto-imunes e estão presentes em cerca de 20% dos controles sadios.^{3,4}

A identificação da transglutaminase tissular (tTg) como o auto-antígeno alvo do AAE, que é a principal característica sorológica dos pacientes celíacos, proporcionou melhor entendimento da inter-relação entre a gliadina e o AAE.^{5,6,7,8} A tTg é uma enzima intracelular, dependente de íons cálcio, que catalisa a ligação covalente entre proteínas e a desaminação da gliadina e de outras proteínas semelhantes.⁸ Além disso, está envolvida na apoptose, ao inativar, pela formação dessa ponte covalente, diversas proteínas intracelulares, que seriam liberadas para o meio extracelular com a morte celular, e seriam tóxicas. Em cultura de fibroblastos, a tTg pode ser encontrada na forma solúvel, na fração citosólica de fibroblastos, ou ainda na matriz extra-celular possivelmente ligada à fibronectina.⁹ A fibronectina é uma glicoproteína dimérica de alto peso molecular, sintetizada pelos fibroblastos e secretada na matriz extracelular de cultura de dessas células.

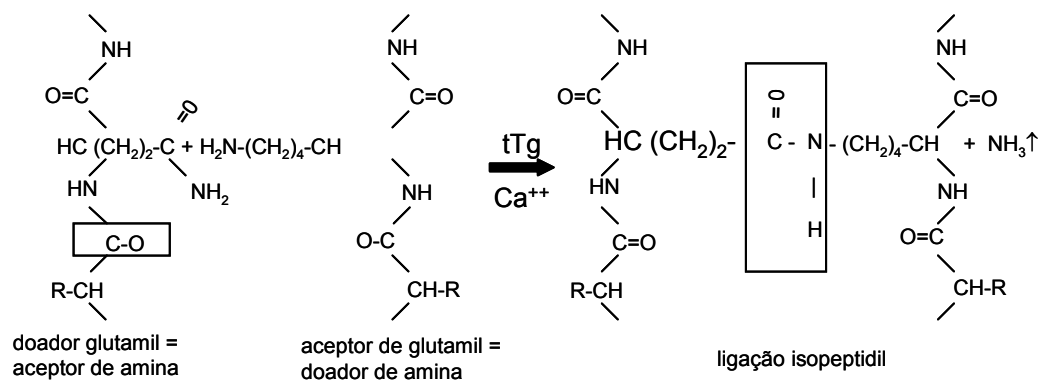


Figura 1. Reação cruzada da transglutaminase. A transglutaminase catalisa uma transferência de glutamil lisina dependente de Cálcio que resulta numa reação cruzada protéica irreversível através da ligação ϵ lisina-(γ glutamyl). Embora aceptores glutamyl sejam numerosos, o número de doadores de glutamyl é limitado.¹⁰

A tTg desamina a gliadina, gerando resíduos ácidos com cargas negativas de ácido glutâmico, a partir de glutaminas neutras (figura 1).¹⁰ Todavia, a tTg não age exclusivamente sobre a gliadina e desamina vários outros substratos, que, teoricamente, poderiam estar envolvidos na patogenia da doença celíaca.²

De fato, estudos recentes mostraram que a adsorção de soros de celíacos com tTg nem sempre abole o padrão característico do AAE à imunofluorescência indireta, sugerindo que o AAE deve reconhecer outros componentes protéicos.¹¹ Tanto a gliadina, quanto a gliadina desaminada ou o complexo gliadina-tTg são internalizados, processados intracelularmente e apresentados aos linfócitos.¹²

Morfologicamente na doença celíaca ocorre atrofia da mucosa que pode ser comprovada pela biópsia. Na prática clínica é utilizada a classificação proposta por Marsh, modificada por Oberhuber,¹³ com quatro graus de lesão:

Marsh I – arquitetura normal da mucosa cujo epitélio viloso está marcadamente infiltrado por linfócitos (contagem de linfócitos maior que 30 por 100 enterócitos).

Marsh II – hiperplasia das criptas - células epiteliais imaturas são geradas em grande proporção e presença de células inflamatórias (linfócitos e plasmócitos).

Marsh III – na classificação original, consiste de uma lesão destrutiva, com mucosa plana típica. Este estágio foi reclassificado em:

Marsh IIIa – atrofia parcial de vilosidades, associada a leve infiltração de linfócitos nas células epiteliais e hiperplasia das criptas;

Marsh IIIb – atrofia subtotal dos vilos, ainda reconhecíveis, hiperplasia de criptas em que células epiteliais imaturas são geradas em maior proporção e influxo de células inflamatórias;

Marsh IIIc – atrofia total dos vilos, criptas hiperplásicas e lesão infiltrativa.

Contudo, nas formas sem atrofia da mucosa deve-se realizar o diagnóstico diferencial com outras causas de duodenite e enterite, e nesse sentido o emprego dos auto-anticorpos tem-se mostrado útil.

1.2. Auto-anticorpos na doença celíaca

O diagnóstico laboratorial da doença celíaca é sugerido pela demonstração da positividade dos auto-anticorpos: antigliadina (AGA), anti-endomíso (AAE), anti-reticulina (ARA) e antitransglutaminase tissular (anti-tTg).^{9,14} São esses os testes padronizados para o diagnóstico da doença celíaca. Os anticorpos presentes na doença celíaca prestam-se para o

diagnóstico, para investigação de familiares e de indivíduos de risco, e também são marcadores da transgressão dietética pois estão associados à persistência de atividade da doença.^{14,15,16,17}

Após a introdução do AGA, por volta de 1980, o mesmo foi amplamente utilizado na prática clínica.^{9,11,14,17} É pesquisado por ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), técnica de fácil execução, em que pode ser realizada a pesquisa desse marcador em inúmeros soros simultaneamente, cujos resultados independem de observador. Apresenta baixa variação de resultados entre os laboratórios. Existem diferentes kits comerciais para a pesquisa do AGA, facilmente adquiridos. Foi considerado o marcador mais importante até ser suplantado pela pesquisa do AAE, que apresenta maior sensibilidade e especificidade.^{16,17,18,19} A sensibilidade do AGA está em torno de 65% e especificidade de 70-72%.

O AAE foi descrito em 1983,^{18,20,21,22} utilizando como substrato esôfago de macaco, mediante imunofluorescência indireta. Reage contra antígenos localizados na periferia da célula muscular (endomísio) identificando padrão reticular em “favo de mel”, em substratos como cortes de esôfago de macaco e cordão umbilical humano^{14,18} AAE tem sido o marcador mais utilizado, sendo encontrado em quase 95% dos pacientes celíacos. Em 32 estudos (tabela 1)²³, para pesquisa do AAE IgA, em pacientes celíacos adultos e crianças, observou-se variação de sensibilidade de 86%-100% e especificidade de 90%-100%. Entre as crianças os valores foram de 88%-100% para sensibilidade e de 90%-100% de especificidade. Para o grupo de adultos os valores foram de 86%-100% e 98%-100% para

sensibilidade e especificidade, respectivamente. Em razão do alto custo e dos problemas éticos, a utilização de cortes de esôfago de macaco foi substituída por cortes de cordão umbilical humano, substrato que tem mostrado resultados semelhantes aos obtidos com cortes de esôfago de macaco.^{14,20,22,23,24} A sensibilidade e especificidade desse marcador variam de 80-100%.^{14,24,25} Uma das falhas dessa técnica é a subjetividade da leitura, uma vez que os bons resultados dependem diretamente da experiência e dos critérios do leitor da reação de imunofluorescência.

Tabela 1. Sensibilidade e especificidade para a pesquisa do AAE IgA

Autor	ano	celíacos	controles	faixa etária	sensibilidade	especificidade
Burgin-Wolkff <i>et al</i> ²⁶	1991	441	211	criança	90	98
McMillan <i>et al</i> ²⁷	1991	28	68	adulto	89	100
Carroccio <i>et al</i> ²⁸	1993	45	60	criança	100	97
Lerner <i>et al</i> ¹⁷	1994	34	41	criança	97	98
Ladinsler <i>et al</i> ²⁹	1994	30	35	mista	95	100
Vitoria <i>et al</i> ³⁰	1994	18	626	mista	94	100
Mascart-Lemone <i>et al</i> ³¹	1995	88	196	criança	94	100
Ulbo <i>et al</i> ³²	1995	56	103	criança	100	100
Mascart-Lemore <i>et al</i> ³¹	1995	(88)	(196)	adulto	88	100
Sategna-Guidetti <i>et al</i> ³³	1995	100	109	adulto	100	100
Vogelsang <i>et al</i> ⁹	1995	49	52	adulto	100	100
Carroccio <i>et al</i> ¹⁶	1996	36	72	criança	97	100
De Lacea <i>et al</i> ³⁴	1996	22	43	criança	88	90
Sachetti <i>et al</i> ³⁵	1996	32	42	criança	97/93 (m/h)	100
Ascher <i>et al</i> ³⁶	1996	55	65	mista	98	100
Kolho <i>et al</i> ²⁰	1997	53	114	criança	95	100
Bagnasco <i>et al</i> ³⁷	1997	86	255	mista	100	100
Yiannakou <i>et al</i> ²³	1997	46	105	mista	91/93 (m/h)	100
Sategna-Guidetti <i>et al</i> ³⁸	1997	104	94	mista	95	100
Feighry <i>et al</i> ³⁹	1998	97	344	adulto	87	99
Sulkanen <i>et al</i> ⁶	1998	136	136	ND	93	99
Di Leo <i>et al</i> ⁴⁰	1999	45	67	criança	100	97
Vitoria <i>et al</i> ⁴¹	1999	27	34	criança	100	100
Baldas <i>et al</i> ⁴²	2000	70	196	adulto	93	100
Stem ⁴³	2000	103	149	mista	90	99
Chirido <i>et al</i> ⁴⁴	2000	105	73	mista	92	100
Sblattero <i>et al</i> ⁴⁵	2000	65	170	mista	93	100
Bonamico <i>et al</i> ⁴⁶	2001	62	56	criança	95	98
Picarelli <i>et al</i> ⁴⁷	2001	166	1399	adulto	100	100
Salmaso <i>et al</i> ⁴⁸	2001	82	106	mista	100	100
West <i>et al</i> ⁴⁹	2002	130	100	adulto	94	100
Tesei <i>et al</i> ⁵⁰	2003	250	176	adulto	86	100
Total		2661	5297			

reproduzido de Hill *et al.*²⁵

m= esôfago de macaco; h= cordão umbilical humano; ND= não definido

Por outro lado, o diagnóstico pode falhar em alguns casos quando se realiza somente a pesquisa do anticorpo AAE. O anticorpo é da classe IgA e, por isso, pode apresentar resultados negativos em pacientes com deficiência seletiva de IgA ou imunodeficiências⁵¹. Nesse sentido, torna-se importante a positividade de outros marcadores sorológicos. A utilidade do AAE de classe IgG foi avaliada em dois estudos. No estudo de Picarelli⁵², esse marcador foi positivo em 100% dos 18 casos, dos quais nove apresentavam deficiência de IgA. Em outro estudo²⁷, a sensibilidade do AAE IgG foi de 39% e a especificidade de 98%. Portanto, atualmente se considera que os anticorpos de classe IgG seriam úteis somente nos casos em que há deficiência de IgA associada.

O ARA normalmente é realizado por imunofluorescência indireta utilizando como substrato cortes de tecidos de roedores (rim, estômago, fígado e coração), recebe esse nome porque apresenta reação nas fibras do tecido conectivo reticular entre as estruturas daqueles tecidos.^{14,15,16,17,53} É teste com baixa sensibilidade e alta especificidade, não sendo útil em estudos populacionais¹⁶. Como o AAE, depende da experiência do observador.

Todas essas técnicas mencionadas anteriormente são inadequadas para a pesquisa de doença celíaca em indivíduos com deficiência de IgA, associação a ser considerada em portadores dessa anormalidade e manifestações que se sobrepõem às da doença celíaca.⁵¹

Como já foi mencionado anteriormente, a tTg é enzima citoplasmática,^{7,12} mas as reações clássicas de imunofluorescência sempre

sugeriram que os anticorpos mais prevalentes da doença celíaca reagem com componente da matriz extracelular. Isso se explica pela interação da tTg com elementos da matriz extracelular, notadamente a fibronectina da matriz.^{12,54,55} Portanto, o que se identifica na pesquisa do ARA e do AAE é a tTg ligada à fibronectina. Essa característica foi demonstrada claramente em recente estudo em nosso laboratório, quando, ao utilizarmos cultura de fibroblastos, evidenciou-se reação na matriz extra-celular após incubação de soros de celíacos.⁵⁶ Essa reação apresentou as mesmas características daquelas apresentadas pelo anti-tTg monoclonal, e também se sobrepôs às reações do antifibronectina, em reação de dupla coloração.^{56,57} Os testes de ELISA padronizados até o momento, utilizam apenas a tTg, não tendo sido estudada a interação da tTg com a fibronectina da matriz extracelular.

Inicialmente o antígeno aplicado na placa de poliestireno, para realização do ELISA, foi a tTg extraída de fígado de cobaia. A transglutaminase extraída desse animal apresenta uma seqüência protéica muito próxima à da transglutaminase humana, maior que 80%, havendo maior probabilidade de conservação de epitopos antigênicos. Esse fato torna possível a sua utilização em ensaios diagnósticos. Porém gradativamente foi observada falha na especificidade decorrente da presença de antígenos não relacionados. Quando submetida a uma corrida em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), observou-se que somente 30% da transglutaminase extraída de fígado de cobaia correspondia à transglutaminase (banda de 83kDa) e várias outras bandas de proteínas inespecíficas estavam presentes.⁵⁸ A clonagem da transglutaminase humana permitiu o desenvolvimento de nova

geração de *kits* comerciais de ELISA baseados no antígeno recombinante ou na transglutaminase tissular purificada de eritrócitos humanos⁴⁹, que teriam sensibilidade e especificidade superiores⁴⁵ às do kit utilizando a transglutaminase de fígado de cobaia.

A maioria dos trabalhos descritos na literatura (tabela 2),²⁵ em que foi realizada a técnica de ELISA para pesquisa do anti-tTg, apresenta sensibilidade e especificidade acima de 90%.

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade para a pesquisa do anti-tTg IgA

Autor	ano	celíacos	controles	faixa etária	sensibilidade	especificade
Bardella <i>et al.</i> ⁵⁹	1991	26	34	ND	65	97
Vitoria <i>et al.</i> ²⁹	1994	18	624	Mista	61	91
Vogelsang <i>et al.</i> ⁹	1995	49	52	Adultos	82	83
Ascher <i>et al.</i> ³⁵	1996	55	65	Mista	91	98
Berger <i>et al.</i> ⁶⁰	1996	67	54	ND	61	94
Corazza <i>et al.</i> ⁶¹	1997	35	43	ND	54	79
Sulkanen <i>et al.</i> ⁶	1998	136	136	ND	95	91
Dieterich <i>et al.</i> ⁶²	1998	106	114	ND	98	95
Vitória <i>et al.</i> ⁴⁰	1999	27	34	Crianças	100	94
Seissier <i>et al.</i> ⁶³	1999	45	574	Mista	96	100
Troncone <i>et al.</i> ⁶⁴	1999	48	63	ND	92	98
Baldas <i>et al.</i> ⁴¹	2000	70	58	Mista	100	98
Stem ⁴²	2000	103	149	Mista	93	95
Chirido <i>et al.</i> ⁴³	2000	105	73	Mista	90	92
Sblattero <i>et al.</i> ⁴⁵	2000	65	170	Mista	98 htTg; 89 tTg	99 htTg, 98 tTg
Picarelli <i>et al.</i> ⁴⁷	2001	166	1399	Adultos	100	100
Dickey <i>et al.</i> ⁶⁵	2001	73	58	Adultos	77	98
Dahele <i>et al.</i> ⁶⁶	2001	114	65	Adultos	81	97
Salmaso <i>et al.</i> ⁴⁶	2001	82	106	Mista	87	95
Fabiani <i>et al.</i> ⁶⁷	2001	399	432	Mista	90	96

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade para a pesquisa do anti-tTg IgA

Autor	ano	celíacos	controles	faixa etária	sensibilidade	especificade
Chan <i>et al.</i> ⁶⁸	2001	9	66	ND	89	97
Leon <i>et al.</i> ⁶⁹	2001	86	72	ND	99	99
Bonamico <i>et al.</i> ⁴⁴	2001	62	56	Crianças	100 RIA ^a 90 ELISA	100 100
West <i>et al.</i> ⁴⁷	2002	130	100	Adultos	86	91
Tesei <i>et al.</i> ⁴⁸	2002	250	176	Adultos	91	96
Wolters <i>et al.</i> ⁷⁰	2002	52	49	ND	83	86
Wolters <i>et al.</i> ⁷⁰	2002	52	49	ND	96 htTG	100 htTG
Wolters <i>et al.</i> ⁷⁰			53		96 tTg	92 tTg
Total		2023	3877			

reproduzido de Hill *et al.*²⁵

ND= não definido; htTg=antígeno recombinante humano

tTg=antígeno de fígado de cobaia; RIA=radio imuno-ensaio

Nos dias atuais, as técnicas que vêm sendo propostas utilizam o antígeno humano. Todavia, de forma semelhante ao que ocorreu com as técnicas que utilizavam o antígeno de cobaia, esses ensaios também têm apresentados resultados discordantes.⁷¹ Ao comparar quatro kits comerciais, pesquisadores italianos concluíram que o AAE, continua sendo a melhor técnica inicial para investigação da doença celíaca.⁷² O problema de resultados falso-positivos definitivamente não foi resolvido, haja vista a alta positividade de anti-tTg com antígenos de cobaia e recombinante humano em pacientes com insuficiência cardíaca, e que não apresentavam reatividade para o AAE.⁷³

Apesar das controvérsias em estudo de revisão bibliográfica, recentemente publicado, Hill *et al.*²⁵, mostraram que a pesquisa do anti-htTg por ELISA e a pesquisa do AAE ainda são testes sorológicos mais sensíveis

e específicos para selecionar os indivíduos que necessitam de biópsia intestinal para confirmação de doença celíaca (tabela.3).²⁵

Tabela 3. Estudos comparando a pesquisa do AAE IgA com a do anti-tTg IgA

Autor	ano	celiacos	controles	EMA IgA		TTG IgA	
				S	E	S	E
Sulkanen <i>et al.</i> ⁶	1998	136	136	93	99	95	91 t
Stem ⁴²	2000	103	149	90	99	93	95 r
Baldas <i>et al.</i> ⁴¹	2000	70	58	93	100	100	98 h
Sblaterro <i>et al.</i> ⁴⁵	2000	65	170	93	100	98 89	99 98 t
Bonamico <i>et al.</i> ⁴⁶	2001	62	56	95	98	90 ELISA 100 RIA	100 100 h
Picarelli <i>et al.</i> ⁴⁷	2001	166	1233	100	100	100 h	
Salmaso <i>et al.</i> ⁴⁸	2001	82	106	100	100	87 adultos 95 crianças	95 t 100
Total		684	1908				

reproduzido de Hill *et al.*²⁵

S=Sensibilidade; E=Especificidade

anti-tTg IgA-antitranglutaminase tissular IgA (h=humana, t cobaia)

AAE IgA anticorpo anti endomísio IgA; RIA=radio imuno-ensaio

Em que pese a introdução da pesquisa do anti-tTg na prática clínica há oito anos, em nosso hospital ela não é feita na rotina. A evolução de sua pesquisa na literatura tem mostrado resultados contraditórios quanto à superioridade em relação à pesquisa do AAE.^{72,74}

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS PRINCIPAIS

2.1.1. Padronizar a pesquisa do anticorpo antitransglutaminase tissular pela técnica de ELISA indireto;

2.1.2. Padronizar a pesquisa do anticorpo contra a fibronectina e o complexo transglutaminase/fibronectina;

2.1.3. Comparar os resultados do ELISA indireto ao se utilizar a transglutaminase, fibronectina ou complexo transglutaminase/fibronectina na doença celíaca não tratada e em grupos controles (doença inflamatória intestinal, diarreia crônica com antiendomísio negativo, hepatite auto-imune tipo 1, doença celíaca tratada antiendomísio negativo e indivíduos saudáveis);

2.1.4. Comparar os resultados do ELISA indireto antitransglutaminase tissular de cobaia desenvolvido *in house* com os dos ELISAs comerciais antitransglutaminase tissular de cobaia e antitransglutaminase recombinante humana.

2.2. OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

2.2.1. Avaliar se a positividade do antitransgluraminase *in house* foi diferente de acordo com a faixa etária;

2.2.2. Analisar se a positividade do antitransglutaminase *in house* tem relação com a titulação do anticorpo antiendomísio.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

A casuística foi composta por 173 pacientes (49 pacientes com doença celíaca não tratada e 124 controles).

As amostras de soros, armazenadas a -20°C , foram provenientes da rotina da pesquisa de auto-anticorpos do laboratório de provas funcionais do aparelho digestivo da disciplina de Gastroenterologia Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os grupos controles foram constituídos por soros de pacientes com diarreia crônica, doença inflamatória intestinal, hepatite auto-imune tipo 1, doença celíaca após tratamento (AAE negativo) e indivíduos saudáveis.

O grupo "doença celíaca não tratada" (DCNT) foi constituído por 49 pacientes com positividade para o AAE e biópsia intestinal com padrão histológico compatível com doença celíaca, utilizando os critérios de Marsh descritos anteriormente.

O grupo "diarreia crônica" (DiaCro) foi constituído por 30 pacientes que apresentavam anticorpo AAE negativo e sem deficiência de IgA. Nesse grupo em quatro pacientes a biópsia duodenal foi normal, em 24 pacientes mostrou duodenite crônica inespecífica não compatível com doença celíaca e em dois pacientes a biópsia revelou duodenite atrófica com contagem de linfócitos intra-epiteliais maior que 20% e hiperplasia de cripta. Esses pacientes foram incluídos em razão da possibilidade do diagnóstico de doença celíaca a despeito da negatividade do AAE.

O grupo "doença inflamatória intestinal" (DII) foi constituído por 23 pacientes, 13 com retocolite ulcerativa idiopática (RCUI) e 10 pacientes com doença de Crohn, todos com AAE negativo. Nenhum paciente do grupo apresentava deficiência de IgA. Em 21 dos 23 casos, biópsias intestinais haviam sido realizadas durante a propedêutica diagnóstica e não por motivos do presente estudo, e não mostraram lesões sugestivas de doença celíaca. Desconhecia-se se os pacientes encontravam-se em uso de corticosteróide ou drogas imunossupressoras. Foi incluído esse grupo, em razão da sobreposição de sintomas entre doença celíaca e doença inflamatória intestinal e também pela possibilidade de concomitância de doenças.

O grupo "hepatite auto-imune" (HAI) foi constituído por 30 pacientes com diagnóstico de hepatite auto-imune tipo 1 com positividade do anticorpo antimúsculo liso por imunofluorescência indireta em cortes de rim (vasos, glomérulos, túbulos) e estômago de roedores e positividade para o anticorpo antimicrofilamentos (actina) por imunofluorescência indireta em fibroblastos humanos e AAE negativo. Foi decidido pela inclusão desse grupo controle em razão dos níveis elevados de gamaglobulinas na HAI, particularmente nos pacientes com reatividade para o antimúsculo liso. Ademais, há descrição de maior frequência de resultados falso-positivos para o anti-tTg no grupo de pacientes com hepatites crônicas.⁷⁵ Ainda nesse contexto a elevada frequência de anticorpo antiactina na doença celíaca,^{11,76} fato classicamente descrito na hepatite auto-imune,⁷⁷ também contribuiu para a existência desse grupo controle. As amostras de soros desses pacientes

foram coletadas antes do início do tratamento imunossupressor e em fases de atividade da doença.

O grupo "doença celíaca tratada" AAE negativo (DCT), independentemente do estudo histológico da mucosa intestinal foi constituído por 23 pacientes com diagnóstico de doença celíaca e que apresentavam positividade para o AAE e biópsia compatível com doença celíaca no início do acompanhamento (todos participaram do grupo "DCNT") e que evoluíram com negatividade daquele anticorpo após instituição do tratamento sem glúten. A razão da presença desse grupo foi avaliar se a negatização do AAE coincidiria com a negatização do anti-tTg.

O grupo controle "saudáveis" (S) foi constituído por 18 pessoas sem sintomas clínicos de qualquer enfermidade aparente. Também apresentavam AAE negativo.

No anexo A estão apresentados os dados referentes à idade e sexo dos pacientes nos diferentes grupos.

3.2. Material

3.2.1. Materiais e reagentes

Ácido cítrico ($H_3C_6H_5O_7$) Reagen, Quimibras Inds Químicas S.A, Rio de Janeiro;

Ácido clorídrico fumegante (HCl) 37%, código 21603, Merck S.A. Inds Químicas, Rio de Janeiro;

Ácido sulfúrico (H_2SO_4), Merck S.A Inds Químicas, Rio de Janeiro;

Bicarbonato de sódio (NaHCO_3), peso molecular de 84,01, código 1.06329.1000, Merck SA Inds Químicas, Rio de Janeiro;

Carbonato de sódio (Na_2CO_3), peso molecular de 105,99, grupo Química, Rio de Janeiro;

Cloreto de sódio, peso molecular de 58,44, código 1.06404.1000, Merck SA Inds Químicas, Rio de Janeiro;

Cloreto de cálcio ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), peso molecular de 147,02, código 2381, Merck SA Inds Químicas, Rio de Janeiro;

Cryo-embedding compound for medium and higher temperatures, Microm, Walldorf, Cat. No 358100;

Éter sulfúrico, B. Herzog Comércio e Indústria SA, São Paulo;

Fosfato de sódio bibásico anidro (Na_2HPO_4), peso molecular de 142,0, código S7907, Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos da América;

Fosfato de sódio Monobásico anidro (NaH_2PO_4), peso molecular de 120,0, código S8282, Sigma Chemical Co., St.Louis, Estados Unidos da América;

Gelatina, código G2625, Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos da América;

Glicerina tamponada em tampão carbonato de sódio 0,45 mM e bicarbonato de sódio 5mM pH 8,6;

Glicerina ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$), peso molecular de 92,09 código G7757, Sigma Chemical Co., St. Louis, Estados Unidos da América;

Lâminas nº 4 (26 x 76mm) para cortes de tecidos, Perfecta, São Paulo;

Lamínulas (24 x 60) M.W., Glastécnica, São Paulo;

O-phenylenediamine (OPD) tabletes, código P8806, Sigma Chemicals Co,
St. Louis, Estados Unidos da América;

PBS 0,01M, pH 7,2 (solução salina tamponada com fosfato);

PBS-TWEEN 80 0,2% (para diluição dos soros na pesquisa do AAE) pH 7,2;
Atlas, São Paulo;

Perhidrol 30%, código 7210, Merck S.A Inds Químicas, Rio de Janeiro;

Placas de poliestireno com 96 orifícios, Nunc, Dinamarca;

Tampão de revelação citrato-fosfato pH 4,9-5,2;

TBS CaCl_2 5mM/litro, gel 0,5% e Tween 20 0,1%;

Tris (tris hydroximetilaminometano), peso molecular de 21,14, cat. nº 15504-
020, Gibco BRL, Nova Iorque, Estados Unidos da América;

Tris-HCl 0,05mM/l pH7,5 (TBS);

3.2.2. Antígenos

Cordão umbilical humano fornecido pelo Centro Obstétrico do Hospital das
Clinicas da FMUSP;

Transglutaminase de fígado de cobaia, código T-5398, Sigma Chemical
Company, St. Louis, Estados Unidos da América;

Fibronectina de cultura fibroblastos humanos, código F-2518, Sigma
Chemical Company, St. Louis, Estados Unidos da América;

3.2.3. Anticorpos controles

Anticorpo monoclonal antitransglutaminase de cobaia, IgG, produzido em camundongo, TGase II Ab-1, CUB 7402, Neomarks, INC.;

Anticorpo monoclonal antifibronectina, IgM, produzido em camundongo, código F 6140, Sigma Chemical Company, St. Louis, Estados Unidos da América;

3.2.4. Conjugados (fluorocromos)

Conjugado anti-IgA humana marcada com fluoresceína, código F5259, Sigma Chemicals Co, St. Louis, Estados Unidos da América;

Conjugado anti-IgA humana marcada com peroxidase, código A0295, Sigma Chemicals Co, St. Louis, Estados Unidos da América;

Conjugado anti-IgG de camundongo marcada com peroxidase, código A 4700- Sigma Chemicals Co, St. Louis, Estados Unidos da América;

Conjugado anti-IgM de camundongo marcada com peroxidase, código A 8786, Sigma Chemicals Co, St. Louis, Estados Unidos da América;

3.2.5. ELISA comercial

Kit comercial QUANTA Lite™ tTG ELISA (tissue transglutaminase), código 708730, INOVA *Diagnostics*, Inc ,San Diego-CA, Estados Unidos da América;

Kit comercial QUANTA Lite™ htTG ELISA (human tissue transglutaminase), código 708760, INOVA *Diagnostics*, Inc ,San Diego-CA, Estados Unidos da América.

3.2.6. Aparelhos

Criostato, *Microtome Cryostat* HM 500 OM, *Micron*, Heidelberg, Alemanha;
Espectrofotômetro Multiskan MCC/340P, versão 2.20, Labsystems, Finlândia;
Estufa FANEM, Brasil;
Microscópio de imunofluorescência com epiiluminação Olympus, Japão;
Microscópio de imunofluorescência com epiiluminação Zeiss, modelo
Axiophot, Alemanha.

3.2.7. Softwares

Software GraphPad Prism versão 3.0;
Software GraphPad InStat Software Incorporation 5755 Oberlin Drive # 110
San Diego, CA 92121, Estados Unidos da América.

3.3. Métodos

3.3.1. Anticorpo antiendomísio

O AAE IgA foi detectado por imunofluorescência indireta em cortes não fixados de 2 μ m de cordão umbilical cedido pelo Serviço de Obstetrícia do Hospital das Clínicas. Cerca de 100 μ L da diluição 1/5 de soro com PBS/Tween 80 (0,2%) foram colocados sobre os cortes de cordão umbilical e incubados por 30 minutos. Os cortes foram lavados duas vezes em PBS, cinco minutos cada lavagem. Posteriormente as lâminas foram incubadas com conjugado anti-IgA humana marcada com fluoresceína, em diluição feita com PBS, em títulos definidos em testes prévios para cada lote do conjugado. Foi considerado positivo o soro com reatividade a partir de 1/10,

com o padrão de fluorescência específico nas fibras musculares das arteríolas, com reforço na membrana externa. Soros positivos foram titulados até a diluição 1/1280. A leitura para definir a positividade e a titulação do AAE foi feita em microscópio de imunofluorescência da marca Olympus, com o aumento de 400x (Figura 2).

Anticorpo antiendomísio – cordão umbilical

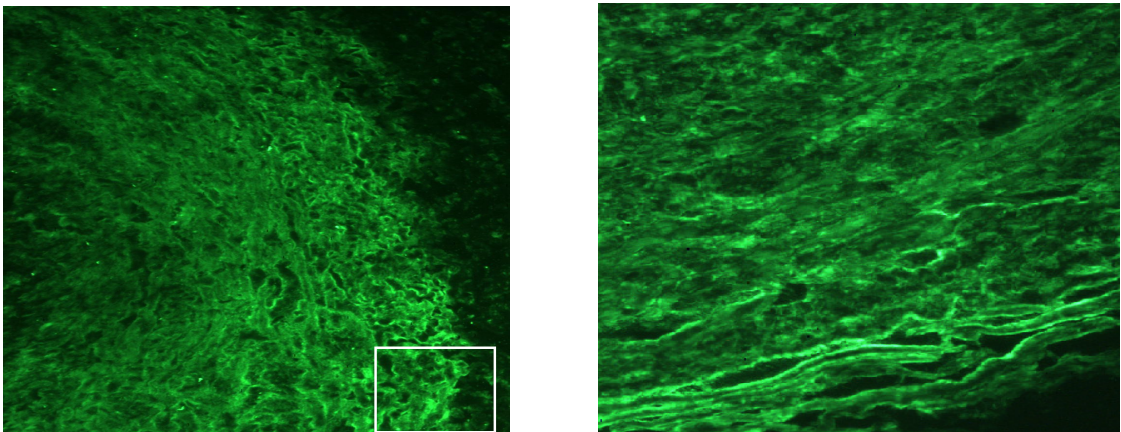


Figura 2. AAE em corte de cordão umbilical humano. Detalhe em corte de arteríola, mostrando o reforço do endomísio da fibra muscular, aumento de 200x(A) e 400x(B).

3.3.2. Padronização da concentração da transglutaminase e da fibronectina para a pesquisa do anticorpo antitransglutaminase e do antifibronectina pela técnica de ELISA indireto

A tTg liofilizada extraída de fígado de cobaia (comercial) foi diluída em água destilada na concentração de 1mg/ml (solução mãe). Para a padronização da melhor concentração de tTg a ser utilizada, a solução mãe de tTg foi diluída a 5 µg/ml e a 10 µg/ml em tampão TBS (Tris 0,05 mol/l pH 7,5 contendo NaCl 0,85%) contendo CaCl₂ 5 mM/l (TTBS). Utilizamos nessa padronização soros denominados de fracamente, medianamente e fortemente positivos, conforme resultados obtidos na pesquisa do AAE.

A fibronectina liofilizada obtida de cultura de fibroblastos humanos (comercial) foi diluída em água destilada na concentração de 0,5 µg/ µl (solução mãe). Para a padronização da melhor concentração de fibronectina a ser utilizada, a solução mãe de fibronectina foi diluída a 5 µg/ml e a 10 µg/ml em tampão TBS (Tris 0,05 mol/l pH 7,5 contendo NaCl 0,85%) contendo CaCl₂ 5 mM/l (TTBS).

Para a realização do ELISA indireto,⁷⁸ placas de poliestireno com 96 orifícios foram sensibilizadas com tTg ou fibronectina diluídas em TTBS nas concentrações de 5 µg/ml ou 10 µg/ml. As placas foram incubadas por duas horas a 37°C e, a seguir, por 16 horas a 4°C. Após esse período, foi efetuada uma lavagem da placa com TTBS contendo gelatina 0,5% e tween 20 a 0,1% (solução de bloqueio, lavagem e diluição). Todo o experimento foi realizado com volume de 50 µl de reagentes por orifício e com 200 µl de solução para bloqueio e lavagem. O bloqueio dos sítios ativos

remanescentes da placa foi feito com a solução de gelatina, por uma hora a 37°C. A seguir, os soros diluídos a 1/100 foram aplicados em duplicata e incubados a 37°C por duas horas. Após três lavagens, com a mesma solução, foi adicionado o conjugado anti-IgA humana marcada com peroxidase, diluído a 1/5000. Após incubação por uma hora a 37°C e três lavagens, a reação foi revelada com OPD 4mg/10ml, em tampão de revelação citrato-fosfato pH 4,9-5,2, contendo 0,04% de peróxido de hidrogênio, por 30 minutos a 37°C, sendo interrompida com ácido sulfúrico 4N. Os valores das densidades ópticas foram determinados pela leitura espectrofotométrica com o comprimento de onda de 492 nm.

A leitura de corte (*cut-off*) foi determinada de tal forma que nenhum soro do grupo “saudáveis” fosse positivo.

3.3.3 Padronização do ELISA indireto utilizando o complexo transglutaminase-fibronectina como substrato

Para avaliar a interação da tTg tissular com a fibronectina, e sua interferência na sensibilidade do ELISA, diferentes esquemas de ensaios foram realizados:

a) a placa foi sensibilizada com fibronectina ou tTg, diluídas em TTBS, por duas horas a 37°C e, a seguir, 16 horas a 4°C. Após esse período, foi realizada uma lavagem com TTBS, e então foram adicionadas tTg ou fibronectina, respectivamente. Diferentes concentrações de fibronectina e tTg (2:1 e 1:1)⁷⁹ foram utilizadas. A placa foi incubada por uma hora a

4°C e, após esse período, foi lavada por três vezes e, então, prosseguiu-se com a incubação do soro;

- b) a fibronectina e a tTg foram diluídas em solução de TTBS, nas proporções de 2:1 e 1:1 e incubadas 4°C por duas horas. Após esse período, a placa foi sensibilizada por duas horas a 37°C e, a seguir, por 16 horas a 4°C, e prosseguiu-se a reação.
- c) a fibronectina e a tTg foram misturadas nas proporções de 2:1 e 1:1, sem utilizarmos um tampão de diluição, e incubadas 4°C por duas horas. Após esse período, a placa foi sensibilizada por duas horas a 37°C e, a seguir, por 16 horas a 4°C, e prosseguiu-se a reação.

Para a realização do teste ELISA indireto,⁷⁸ com o complexo tTg/fibronectina, os substratos foram diluídos previamente na proporção de 1:2 em TTBS e incubados a 4°C por duas horas. Placas de poliestireno com 96 orifícios foram sensibilizadas com a solução de tTg/fibronectina, 50µl por orifício. As placas foram incubadas por duas horas a 37°C e, a seguir, por 16 horas a 4°C. Após esse período, foi realizada uma lavagem da placa com TTBS-gelatina 0,5%-tween 20 0,1% (solução de bloqueio, lavagem e diluição). Todo o experimento foi realizado com volume de 50 µl de reagentes por orifício e com 200 µl de solução para bloqueio e lavagem. O bloqueio dos sítios ativos remanescentes da placa foi realizado com a solução de gelatina, por uma hora a 37°C. A seguir, os soros diluídos a 1/100 (solução de diluição) foram aplicados em duplicata e incubados por duas horas a 37°C. Após três lavagens, com a mesma solução, foi

adicionado o conjugado anti-IgA humana marcada com peroxidase, diluído a 1/5000. Após incubação por uma hora a 37°C e três lavagens, a reação foi revelada com OPD 4mg/10ml, em tampão de revelação citrato-fosfato pH 4,9-5,2, contendo 0,04% de peróxido de hidrogênio, por 30 minutos a 37°C, sendo interrompida com ácido sulfúrico 4N. Os valores das densidades ópticas foram determinados pela leitura espectrofotométrica com o comprimento de onda de 492 nm. No anexo B estão apresentadas as leituras das DO dos soros nos diferentes grupos.

3.3.4. ELISA comercial

Todos os soros foram testados utilizando-se os *kits* comerciais QUANTA Lite™ tTg (transglutaminase tissular extraída de fígado de cobaia) e htTG (transglutaminase humana recombinante), da INOVA *Diagnostics Inc.*, para a detecção semi-quantitativa de anticorpos IgA anti-tTg.

Placas de poliestireno sensibilizadas com tTg foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, com 100 µl de soro diluído por orifício. Os soros, diluídos a 1/100 na solução diluente fornecida no *kit*, foram testados em duplicata. Após retirado o excesso de soro, as placas foram lavadas três vezes com 200 µl de solução de lavagem por orifício, e, a seguir, incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, com a anti-IgA marcada enzimaticamente (100µl por orifício). Após mais três lavagens, foram acrescentados 100µl por orifício de tetrametilbenzidina (TMB) e as placas foram incubadas, ao abrigo da luz, por 30 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de solução contendo

ácido sulfúrico 0,034 M e lida imediatamente em espectrofotômetro, utilizando filtro de 450nm.

Um soro fortemente positivo, um soro fracamente positivo e um soro negativo, pré-diluídos e fornecidos pelo fabricante, foram utilizados em duplicata em todas as placas como controle da reação.

A média aritmética das absorvâncias de cada duplicata foi inicialmente determinada. A seguir, a reatividade de cada amostra foi calculada, de acordo com as instruções do fabricante, dividindo-se a média da DO da amostra pela média da DO do soro controle fracamente positivo. O resultado obtido foi multiplicado por 25, que corresponde ao valor da DO, expressa em unidades, do soro controle fracamente positivo. Foram considerados positivos os soros com DO maior ou igual a 20 unidades, segundo a recomendação do fabricante.

3.3.5. Estudos comparativos realizados

Para avaliarmos se os resultados dos anticorpos anti-tTg, antifibronectina e anti-tTG/fibronectina presentes no grupo "DCNT" foram diferentes dos resultados dos grupos controles, foram comparadas as DO do ELISA e a positividade dos três anticorpos.

Também foi estudada a relação de positividade do anti-tTg, do antifibronectina e do anti-tTG/fibronectina com os títulos do AAE ($\leq 1/160$, $1/320-1/640$ e $\geq 1/1280$), para analisarmos se os resultados obtidos pelo ELISA guardaram relação com os resultados da imunofluorescência indireta.

Outra comparação efetuada foi a de averiguar se houve relação de positividade do anti-tTg, do antifibronectina e do anti-tTg/fibronectina com a faixa etária dos pacientes com doença celíaca, arbitrariamente divididos em ≤ 18 anos (pediátrico) e maiores do que 18 anos (adulto).

Também foi analisado se a positividade dos três anticorpos testados foi diferente dentro do grupo “DII”, estudando comparativamente os subgrupos “RCUI” e “doença de Crohn”. Os pacientes com doença intestinal foram divididos nesses subgrupos de acordo com o diagnóstico definitivo da doença de base baseado em dados clínicos, radiológicos, endoscópicos e histológicos.

Uma última comparação foi feita entre os resultados do ELISA *in house* para a pesquisa do anti-tTg e os resultados obtidos com os *Kits* comerciais para verificarmos se havia ou não concordância estatística.

3.4. Aspectos éticos

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo comissão ético-científica do Departamento de Gastroenterologia e pela Comissão de Ética para Análise de projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HC-FMUSP, e foi desenvolvido de acordo com os princípios estabelecidos pela Declaração de Helsinki.

3.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se os testes *t* de *student*, exato de Fisher, McNemar e de concordância Kappa, quando apropriados.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Pesquisa do anti-tTg, do antifibronectina e do anti-tTg/fibronectina por ELISA *in house*

Os soros foram testados simultaneamente para a tTg, a fibronectina e o complexo tTg/fibronectina.

O melhor resultado da padronização foi obtido quando sensibilizamos as placas com concentrações de 5 µg/ml de tTg (Figura 3) e de 10 µg/ml de fibronectina, por orifício. Para a utilização do complexo, a tTg e a fibronectina foram incubadas por duas horas a 4°C, na proporção de 1:2⁷⁹ (5 µg/ml e 10 µg/ml) em tampão TTBS e após esse período foram aplicadas nos orifícios e prosseguiu-se a reação como descrita acima.

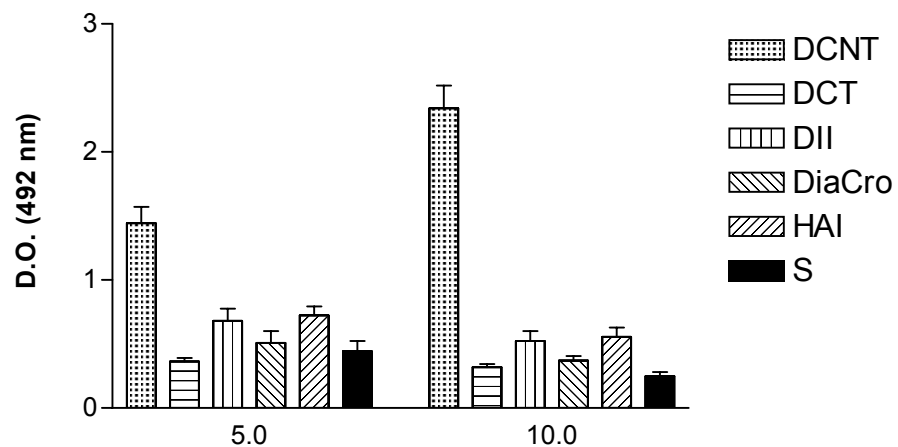


Figura 3: Padronização da concentração da transglutaminase (5 e 10 µg/ml) para a realização do ELISA *in house*. (DCNT- doença celíaca não tratada, DCT - doença celíaca tratada, DII- doença inflamatória intestinal, HAI- hepatite auto-imune Tipo I, DiaCro- diarréia crônica AAE negativo; S- saudáveis).

4.2. Pesquisa dos anticorpos anti-tTg, antifibronectina e anti-tTg/fibronectina pela técnica de ELISA *in house* no grupo “DCNT” e nos grupos controles

As médias, os desvios-padrão e as medianas das densidades ópticas (DO) dos soros dos pacientes com DCNT e dos demais grupos controles, frente aos diferentes substratos (tTg, fibronectina e do complexo tTg/fibronectina), estão apresentados nas tabelas 4,5 e 6. O anexo B, contem o valor da leitura das DO de cada soro nos diferentes grupos.

Tabela 4. Média, desvios-padrão e medianas das DO do ELISA *in house* para a detecção do anti-tTg nos diversos grupos do estudo

grupos estudados (n)	anti-tTg de cobaia	
	Média ± dp	Mediana
doença celíaca não tratada (49)	1,094 ± 0,604	0,808
doença celíaca tratada (23)	0,365 ± 0,167	0,340
doença inflamatória intestinal (23)	0,785 ± 0,461	0,852
hepatite auto-imune (30)	0,711 ± 0,409	0,734
diarréia crônica AAE negativo(30)	0,577 ± 0,293	0,550
saudáveis (18)	0,394 ± 0,182	0,349

Tabela 5. Média, desvios-padrão e medianas das DO do ELISA *in house* para a detecção do antifibronectina nos diversos grupos do estudo

grupos estudados (n)	antifibronectina	
	média ± dp	mediana
doença celíaca não tratada (49)	0,763± 0,616	0,576
doença celíaca tratada (23)	0,304 ± 0,152	0,273
doença inflamatória intestinal (23)	0,850 ± 0,521	0,885
hepatite auto-imune (30)	0,672 ± 0,460	0,540
diarréia crônica AAE negativo (30)	0,610 ± 0,304	0,559
saudáveis (18)	0,217 ± 0,108	0,187

Tabela 6. Média, desvios-padrão e medianas das DO do ELISA *in house* para a detecção do anti-tTg/fibronectina nos diversos grupos do estudo

grupos estudados (n)	Anti-tTg/fibronectina	
	média ± dp	mediana
doença celíaca não tratada (49)	0,892 ± 0,616	0,566
doença celíaca tratada (23)	0,271 ± 0,144	0,280
doença inflamatória Intestinal (23)	0,712 ± 0,481	0,828
hepatite auto-imune (30)	0,519± 0,389	0,483
diarréia crônica AAE negativo (30)	0,574 ± 0,320	0,618
saudáveis (18)	0,316 ± 0,136	0,274

No ELISA para a detecção do anti-tTg e do anti-tTg/fibronectina, as médias das DO dos soros dos pacientes com DCNT foram maiores do que as dos demais grupos e essa diferença foi estatisticamente significativa, exceto em relação às DO do grupo “DII”.

No ELISA para a detecção do antifibronectina, a média e a mediana das DO dos soros dos pacientes com DII foram maiores do que as dos demais grupos. Todos os valores de mediana encontrados foram maiores no grupo “DII”.

Na tabela 7 encontram-se os valores de p referentes à comparação dos resultados do DCNT com os dos grupos controles. Somente a comparação entre o grupo DCNT e o grupo DII não apresentou valores significantes com os diferentes substratos. A comparação, utilizando-se como substrato a fibronectina, também não foi significativa entre os grupos “DCNT” e “HAI”.

Tabela 7. Comparação das DO do ELISA *in house* para a detecção do anti-tTg, do antifibronectina e do anti-tTg/fibronectina entre o grupo “DCNT” e os demais grupos controles

grupos comparados	anti-tTg	antifibronectina	Anti-tTg/fibronectina
doença celíaca não tratada x doença celíaca tratada	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
doença celíaca não tratada x doença inflamatória intestinal	0,0898*	0,1999*	0,1045*
doença celíaca não tratada x hepatite auto-imune	0,0150	0,0483	0,0050
doença celíaca não tratada x diarréia crônica AAE negativo	< 0,0001	< 0,0001	0,0002
doença celíaca não tratada x saudáveis	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

*não significante para $p \geq 0,05$ (teste t de *student*)

4.3. Positividade do anti-tTg pela técnica de ELISA *in house*

Na tabela 8, está representada a positividade do ELISA na detecção do anti-tTg. No grupo controle "saudáveis", um soro foi positivo quando o valor de corte (*cut-off*) foi de 0,7575 o que correspondeu a média das DO dos controles saudáveis mais dois desvios-padrão. Com os valores de corte de 0,9391 (três desvios-padrão), nenhum soro do grupo "saudáveis" foi positivo. Na figura 4 estão apresentados os resultados do ELISA anti-tTg, segundo os valores de corte de dois e três desvios-padrão.

Quando utilizamos a fibronectina como substrato, os valores de corte (*cut-off*) foram de 0,4337 e 0,542 para dois e três desvios-padrão, respectivamente (tabela 9). Considerando a média das DO mais dois desvios-padrão, um soro foi positivo, no grupo "saudáveis" e nenhum soro quando utilizamos a média mais três desvios-padrão. Na figura 5 estão esquematizados os resultados do ELISA, com dois e três desvios-padrão, para o antifibronectina.

As linhas de corte foram de 0,5870 e 0,7227 para dois e três desvios-padrão, respectivamente, quando utilizamos o complexo tTg/fibronectina como substrato, tabela 10. Com linha de corte, tomando como base dois desvios-padrão foi observado um soro normal dentro da faixa de positividade e com três desvios-padrão, nenhum soro foi positivo. Na figura 6, estão representados os resultados do ELISA com dois e três desvios-padrão para o anti-tTg/fibronectina.

Tabela 8. Positividade do anti-tTg ao ELISA *in house* segundo diferentes valores de corte (dois e três desvios-padrão) nos grupos estudados

grupos estudados (n)	positividade do anti-tTg de cobaia	
	média ± 2 dp	média ± 3 dp
doença celíaca não tratada (49)	33 (67,3%)	23 (46,9%)
doença celíaca tratada (23)	0 (0)	0 (0)
doença inflamatória intestinal (23)	13 (56,5%)	9 (39,1%)
hepatite auto-imune (30)	14 (46,7%)	6 (20%)
diarréia crônica (30)	6 (20%)	2 (6,67%)
saudáveis (18)	1 (5,56%)	0 (0)

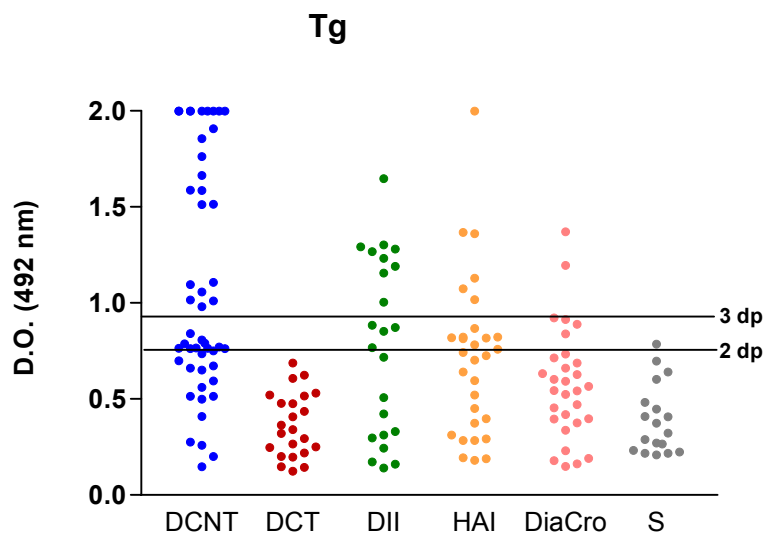


Figura 4. Anti-tTg ao ELISA *in house* nos diversos grupos segundo os valores de corte de dois e três desvios-padrão. (DCNT- doença celíaca não tratada, DCT - doença celíaca tratada, DII- doença inflamatória intestinal, HAI- hepatite auto-imune Tipo I, DiaCro- diarréia crônica AAE negativo; S- saudáveis).

Tabela 9. Positividade do antifibronectina ao ELISA *in house* segundo diferentes valores de corte (dois e três desvios-padrão) nos grupos estudados

grupos estudados (n)	positividade do antifibronectina	
	média ± 2 dp	média ± 3 dp
doença celíaca não tratada (49)	27 (55,1%)	25 (51%)
doença celíaca tratada (23)	5 (21,7%)	3 (13%)
doença inflamatória intestinal (23)	16 (69,5%)	15 (65,2%)
hepatite auto-imune (30)	20 (66,7%)	15 (50%)
diarréia crônica (30)	22 (73,3%)	18 (60%)
saudáveis (18)	1 (5,55)	0 (0)

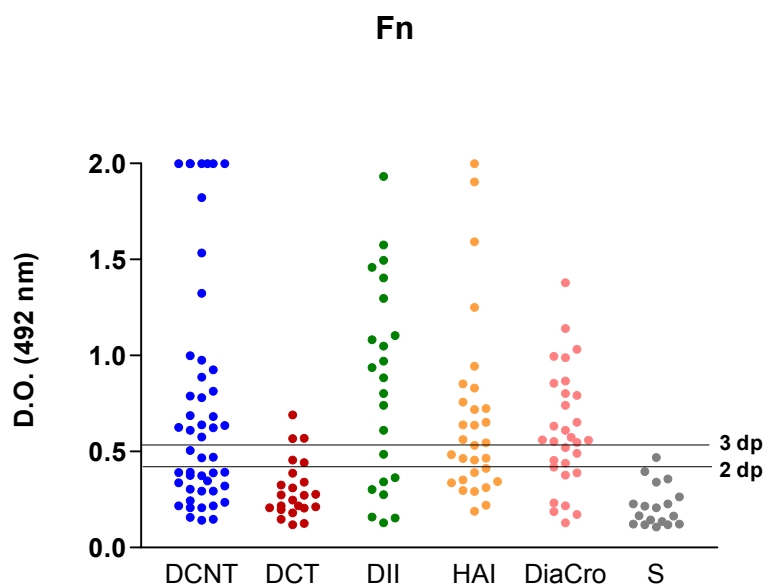


Figura 5. "Antifibronectina" ao ELISA nos diversos grupos segundo os valores de corte de dois e três desvios-padrão. (DCNT- doença celíaca não tratada, DCT - doença celíaca tratada, DII- doença inflamatória intestinal, HAI- hepatite auto-imune tipo I; DiaCro- diarréia crônica AAE negativo; S- saudáveis).

Tabela 10. Positividade do anti-tTg/fibronectina ao ELISA *in house* segundo diferentes valores de corte (dois e três desvios-padrão) nos grupos estudados

grupos estudados (n)	positividade do anti-tTg/fibronectina	
	média ± 2 dp	média ± 3 dp
doença celíaca não tratada (49)	24 (49%)	21 (42,9%)
doença celíaca tratada(23)	0 (0)	0 (0)
doença inflamatória intestinal (23)	14 (60,9%)	13 (56,5%)
hepatite autoimune (30)	10 (33,3%)	6 (20%)
diarréia crônica (30)	17 (56,6%)	8 (26,7%)
saudáveis (18)	1 (5,55)	0 (0)

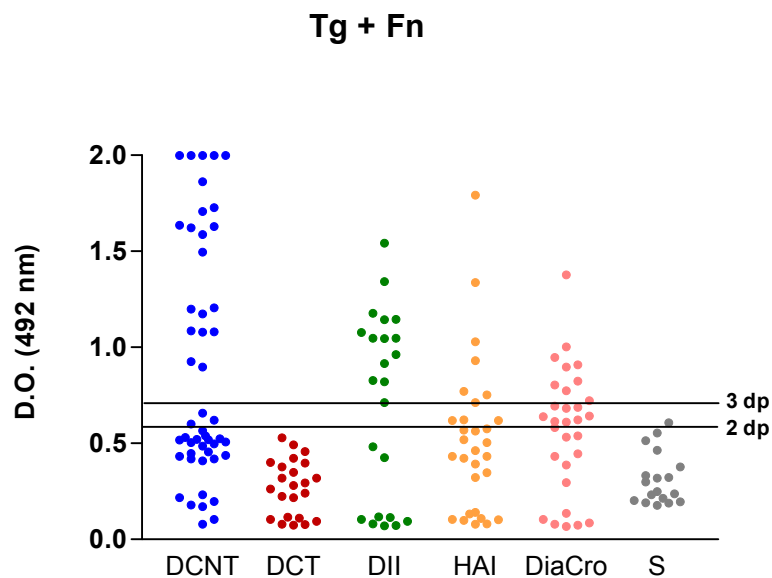


Figura 6. Anti-tTg/fibronectina ao ELISA *in house* nos diversos grupos segundo os valores de corte de dois e três desvios-padrão. (DCNT- doença celíaca não tratada, DCT - doença celíaca tratada, DII- doença inflamatória intestinal, HAI- hepatite auto imune tipo 1; DiaCro- diarréia crônica AAE negativo; S- saudáveis).

4.4. Positividade do ELISA *in house* anti-tTg, antifibronectina e anti-tTg/fibronectina nos pacientes com DCNT e nos grupos controles (resumo)

Analisando a positividade dos anticorpos pesquisados nos diversos grupos de acordo com os valores de corte, adotamos como positivo, valores maiores ou iguais à média das DO dos controles "saudáveis" acrescida de três desvios-padrão. Esse valor correspondeu à DO de 0,9391 com o substrato tTg; 0,542 com o substrato fibronectina e 0,7227 com substrato o complexo tTg/fibronectina. Com base nesse critério, todos os soros do grupo "saudáveis" foram negativos. No grupo "DCNT" foram positivos 46,9% para o anti-tTg, 51% para o antifibronectina e 42,9% para anti-tTg/fibronectina (tabela 11).

Tabela 11. Positividade do ELISA *in house* anti-tTg, antifibronectina e anti-tTg/fibronectina nos diversos grupos baseada na média das DO acrescida de três desvios-padrão

grupos estudados (n)	anti-tTg	Antifibronectina	anti-tTg/ fibronectina
doença celíaca não tratada (49)	23 (46,9%)	25 (51%)	21 (42,9%)
doença celíaca tratada (23)	0	3 (13%)	0 (0)
doença inflamatória intestinal (23)	9 (39,1%)	15 (65,2%)	13 (56,5%)
hepatite auto-imune (30)	6 (20%)	15 (50%)	6 (20%)
diarréia crônica AAE negativo (30)	2 (6,67%)	18 (60%)	8 (26,7%)
saudáveis (18)	0	0	0

Quando comparamos a positividade do grupo “DCNT” em relação ao grupo “DII” foram esses os resultados constatados para o anti-tTg ($p= 0,62$; risco relativo 1,2; intervalo de confiança de 95%= 0,6647-2,165), para o antifibronectina ($p= 0,22$; risco relativo= 0,7510, intervalo de confiança= 0,4968-1,135) e para o anti-tTg/fibronectina ($p= 0,13$; risco relativo= 0,6706; intervalo de confiança de 95%= 0,4190-1,073).

Comparando os resultados entre o grupo “DCNT e o grupo “HAI” obtivemos os seguintes resultados: para o anti-tTg ($p=0,0553$; risco relativo= 2,012; intervalo de confiança de 95%= 0,9852-1,08); para o antifibronectina ($p= 0,82$; risco relativo 0,9184; intervalo de confiança de 95%= 0,5913-1,426) e para o anti-tTg/fibronectina ($p=0,14$; risco relativo= 1,749; intervalo de confiança de 95%= 0,8420-3,634).

Entre os grupos “DCNT e “DiaCro”, os resultados obtidos foram os seguintes: para o anti-tTg ($p= 0,0001$; risco relativo= 7,041; intervalo de confiança de 95%= 1,786-27,762); para o antifibronectina ($p=0,3636$; risco relativo= 0,8163; intervalo de confiança de 95%= 0,5424-1,229) e para o anti-tTg/fibronectina ($p=0,23$; risco relativo= 1,531; intervalo de confiança de 95% (0,7734-3,029).

Para verificarmos se houve melhora em identificar os soros provenientes do grupo “DCNT” em relação ao soros dos grupos controles, comparamos a positividade do anti-tTg com a do anti-tTg/fibronectina. Para o grupo “DCNT” os resultados foram os seguintes: $p= 0,68$; risco relativo 1,15; intervalo de confiança de 95%= 0,7334-1,803; para o grupo “DII” ($p=0,24$; risco relativo= 0,6429; intervalo de confiança de 95%= 0,3507-1,179) e para

o grupo “DiaCro” ($p=0,08$; risco relativo= 0,25; intervalo de confiança de 95%= 0,05778-1,082).

4.5. Comparação entre os resultados do anti-tTg ao ELISA *in house* e os títulos do AAE à Imunofluorescência Indireta

Para analisarmos a relação entre os títulos do AAE à imunofluorescência indireta (IFI) e a positividade do anti-tTg, os soros dos pacientes do grupo “DCNT” foram divididos de acordo com a titulação do AAE em três grupos: títulos $\leq 1/160$, 1/320-1/640 e títulos $\geq 1/1280$. Esses resultados estão apresentados nas tabelas 12, 13 e 14 para os três substratos.

Tabela 12. Relação entre os títulos do AAE à IFI e a positividade do anti-tTg ao ELISA *in house* no grupo “doença celíaca não tratada”

titulação do AAE	anti-tTg positivo (%)	anti-tTg negativo (%)	Total
$\leq 1/160$	0	1 (100%)	1 (2%)
1/320-1/640	3 (17,65%)	14 (82,35%)	17 (34,7%)
$\geq 1/1280$	20 (64,5%)	11 (35,5%)	31 (63,3%)
Total	23 (46,9%)	26 (53,1%)	49

Tabela 13. Relação entre os títulos do AAE à IFI e a positividade do antifibronectina ao ELISA *in house* no grupo “doença celíaca não tratada”

titulação do AAE	antifibronectina	antifibronectina	Total
	positivo	negativo	
≤ 1/160	0 (0)	1(100%)	1 (2%)
1/320-1/640	6 (35,3%)	11 (64,7%)	17 (34,7%)
≥ 1/1280	19 (61,3%)	12 (38,7%)	31 (63,3%)
Total	25 (51%)	24 (49%)	49

Tabela 14. Relação entre os títulos do AAE à IFI e a positividade do anti-tTg/fibronectina ao ELISA *in house* no grupo “doença celíaca não tratada”.

titulação do AAE	anti-tTg/ fibronectina	anti-tTg/ fibronectina	Total
	positivo	negativo	
≤ 1/160	0 (0)	1 (100%)	1 (2%)
1/320-1/640	2 (11,8%)	15 (88,2%)	17 (34,7%)
≥ 1/1280	19 (61,3%)	12 (38,7%)	31 (63,3%)
Total	21 (42,9%)	28 (57,1%)	49

A maior positividade foi observada para o anti-tTg, o antifibronectina e para o anti-tTg/fibronectina na presença de AAE com títulos iguais ou maiores a 1/1280.

4.6 Positividade do anti-tTg, do anti-tTg/fibronectina pelo ELISA *in house* no grupo “DCNT” por faixa etária

O grupo “DCNT” foi dividido arbitrariamente em grupos “ ≤ 18 anos” e “maiores de 18 anos”. As figuras 7 e 8 ilustram os resultados. Não foram obtidos resultados estatisticamente significantes quando analisamos os grupos “ ≤ 18 anos” e “maiores de 18 anos”, comparando os resultados do anti-tTg ($p= 1,0$; risco relativo 0,9524; intervalo de confiança de 95%= 0,5322-1,7) e os do anti-tTg/fibronectina ($p= 0,57$; risco relativo= 1,231; intervalo de confiança= 0,7146-2,12).

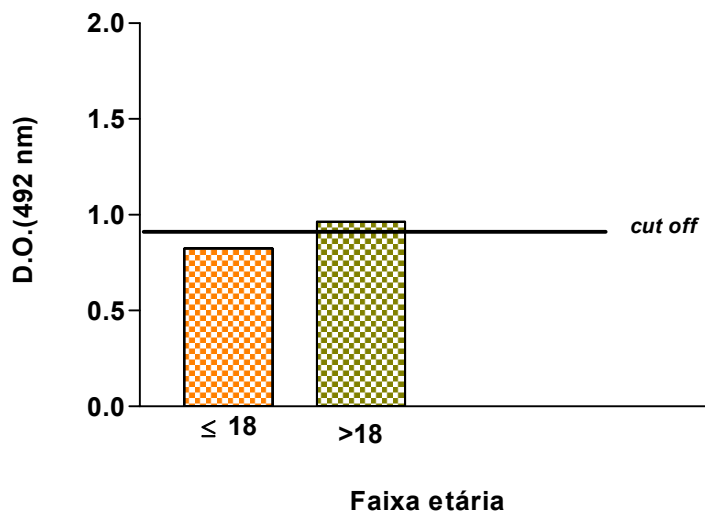


Figura 7: Média das DO do anti-tTg ao ELISA *in house* por faixa etária no grupo doença celíaca não tratada.

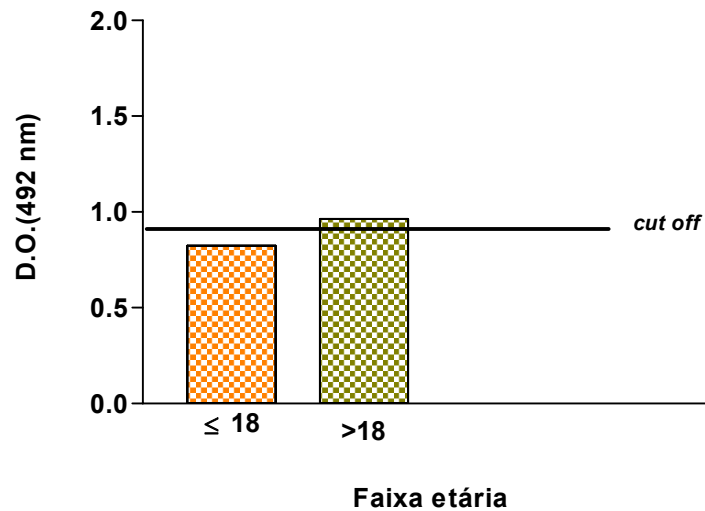


Figura 8: Média das DO do anti-tTg/fibronectina ao ELISA *in house*, por faixa etária no grupo doença celíaca não tratada.

4.7. Positividade do anti-tTg, antifibronectina e anti-tTg/fibronectina pelo ELISA *in house* no grupo “DII” de acordo com a doença de base específica

Do grupo “DII”, 13 pacientes apresentavam diagnóstico de RCUI e 10 pacientes de doença de Crohn. A tabela 15 apresenta os valores da média com o desvio-padrão e a mediana das DO do ELISA, com os diferentes substratos, nos subgrupos “RCUI” e “doença de Crohn”.

Na figura 9, estão apresentadas as leituras das DO e o desvio-padrão dos subgrupos “RCUI” e “doença de Crohn”.

Tabela 15. Média, desvio-padrão e mediana das DO do ELISA *in house* para a detecção de anti-tTg nos subgrupos “doença de Crohn” e “retocolite ulcerativa” do grupo “doença inflamatória intestinal”

DII (n)	anti-tTg		antifibronectina		anti-tTg/fibronectina	
	média ± dp	mediana	média ± dp	mediana	média ± dp	mediana
Crohn (10)	0,572 ± 0,353	0,464	0,609 ± 0,356	0,549	0,523 ± 0,446	0,454
RCUI (13)	0,949 ± 0,479	1,156	1,036 ± 0,564	1,083	0,857 ± 0,472	1,047

DII= doença inflamatória intestinal

RCUI= retocolite ulcerativa inespecífica

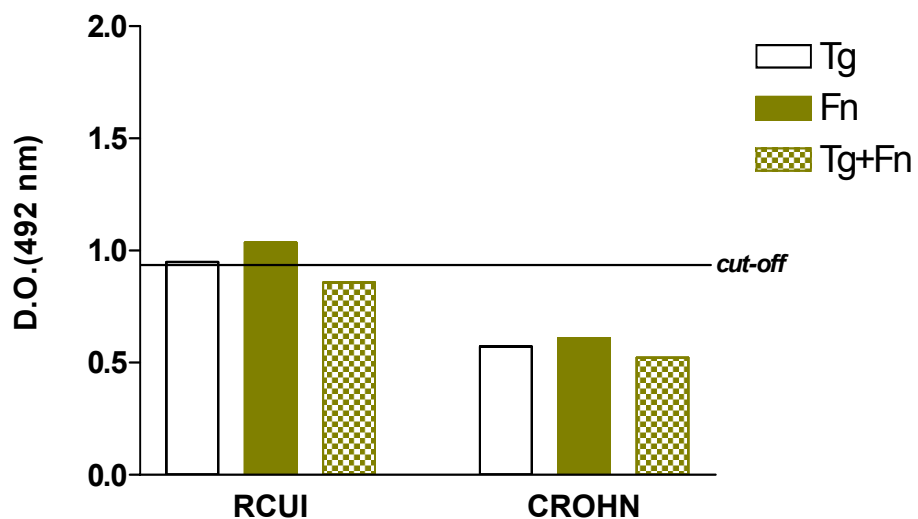


Figura 9. Média das DO do anti-tTg, do antifibronectina e do anti-tTg/fibronectina ao ELISA *in house*, nos subgrupos “RCUI” e “doença de Crohn”

A positividade dos anticorpos anti-tTg, antifibronectina e anti-tTg/fibronectina nos subgrupos “RCUI” e “doença de Crohn”, considerando-

se a média das DO do grupo "saudáveis" mais três desvios-padrão, está apresentada na tabela 16.

Tabela 16: Positividade do anti-tTg, antifibronectina e anti-tTg/fibronectina pelos ELISAs *in house* nos subgrupos retocolite ulcerativa e doença de Crohn baseando-se na média das DO acrescida de três desvios-padrão

doença inflamatória intestinal (n)	anti-tTg	antifibronectina	anti-tTg/fibronectina
doença de Crohn (10)	1 (10%)	1 (10%)	2 (20%)
RCUI (13)	8 (61,5%)	9 (69,2%)	8 (61,5%)

A positividade do anti-tTg, do antifibronectina e do anti-tTg/fibronectina foi maior no subgrupo "RCUI" do que o observado no subgrupo "doença de Crohn". A análise estatística mostrou significância para o anti-tTg e para o antifibronectina (tabela 17).

Tabela 17: Comparação da positividade do anti-tTg, do antifibronectina e do anti-tTg/fibronectina entre o subgrupo "doença de Crohn" e "retocolite ulcerativa inespecífica"

doença inflamatória intestinal (n)	anti-tTg	antifibronectina	anti-tTg/fibronectina
doença de Crohn (10)	p= 0,029	p= 0,0097	p= 0,09
x	RR= 6,154	RR= 6,923	RR= 3,077
RCUI (13)	IC 95%= 0,9123-41,511	IC 95%= 1,041-46,049	IC 95%= 0,8283-11,430

valores significantes $p \leq 0,05$; RR= risco relativo; IC 95%= intervalo de confiança de 95%

4.8. Resultados do ELISA para detecção do anticorpo anti-tTg utilizando *Kits* comerciais

Os resultados do ELISA comercial para detecção do anti-tTg e anti-htTg foram expressos em unidades conforme as instruções do fabricante dos *Kits*. As DO de cada soro e suas respectivas unidades estão apresentadas no anexo C.

Seguindo as recomendações do fabricante dos *kits*, os soros com DO maior ou igual a 20 unidades foram considerados positivos. De acordo com este critério todos os 49 pacientes do grupo “DCNT” foram positivos em ambos os *kits*. Nos grupos controles os resultados obtidos foram os seguintes, 12 dos 23 pacientes do grupo “DCT”, um de 30 pacientes do grupo “DiaCro”, um de 22 pacientes do grupo “DII”, três de 30 pacientes do grupo “HAI” e nenhum dos 18 no grupo “saudáveis” foram positivos, para o *kit* anti-htTg.

Utilizando-se o *kit* para pesquisa do anti-tTg de cobaia a positividade encontrada foi de 49 para o grupo “DCNT”, 10 para o grupo “DCT”, um no grupo “DiaCro”, dois para o grupo “DII”, quatro no grupo “HAI” e um positivo no grupo “saudáveis”.

A tabela 18 apresenta a positividade do anti-tTg para o ELISA anti-tTg de cobaia *in house* e para os *kits* comerciais anti-htTg e anti-tTg de cobaia nos diversos grupos (Figura 10).

Tabela 18. Positividade do anti-tTg de cobaia para o ELISA *in house* e dos kits comerciais anti-htTg e anti-tTg de cobaia nos diversos grupos

Grupo (n)	anti-tTg de cobaia <i>In house</i>	anti-htTg	anti-tTg de cobaia comercial
Doença celíaca não tratada (49)	23	49	49
Doença celíaca tratada (22)	0	12	10
Diarréia crônica (30)	2	1	1
Doença inflamatória intestinal (23)	9	1	2
Hepatite auto-imune (30)	6	3	4
Saudáveis (18)	0	0	1

anti-tTg - antitransglutaminase tissular de cobaia

anti-htTg - antitransglutaminase tissular recombinante humana

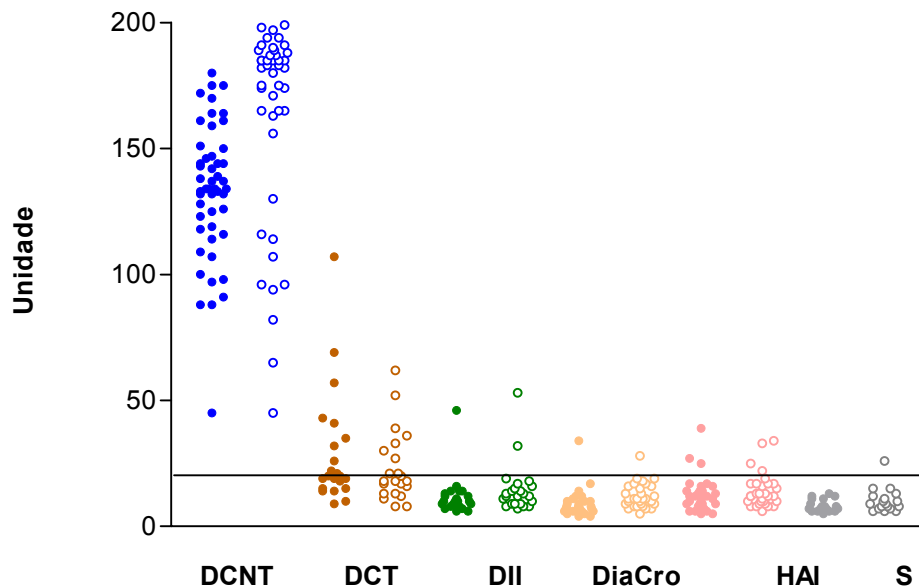


Figura 10. Anti-htTg (•) e anti-tTg (o) ao ELISA comercial nos diversos grupos (“DCNT”- doença celíaca não tratada, “DCT” - doença celíaca tratada, “DII”- “doença inflamatória intestinal”, “DiaCro - diarréia crônica AAE negativo; “HAI” - hepatite auto imune tipo 1; S – “saudáveis”)

4.9. Concordância entre os resultados do anti-tTg ao ELISA *in house* e os resultados do ELISA comercial anti-htTg nos pacientes com “DCNT” e nos grupos controles.

As tabelas 19 a 24 apresentam as concordâncias entre os resultados do ELISA para a pesquisa do anti-tTg, comparando o ELISA *in house* e o ELISA comercial anti-htTg nos diferentes grupos estudados.

Tabela 19. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia *in house* e do anti-htTg comercial no grupo “doença celíaca não tratada”

ELISA	anti-htTg negativo	anti-htTg positivo	Total
<i>in house</i> negativo	0	26	26
<i>in house</i> positivo	0	23	23
Total	0	49	49

anti-htTg - antitransglutaminase tissular recombinante humana
concordância: 23 (46,94%); Kappa= 0 (inexistência de associação)

Tabela 20. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia *in house* e do anti-htTg comercial no grupo “doença celíaca tratada”

ELISA	anti-htTg negativo	anti-htTg positivo	Total
<i>in house</i> negativo	10	12	22
<i>in house</i> positivo	0	0	0
Total	10	12	22

anti-htTg – antitransglutaminase tissular recombinante humana
concordância: 10 (45,45%); Kappa= 0 (inexistência de associação)

Tabela.21 Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia *in house* e anti-htTg comercial no grupo “diarréia crônica”

ELISA	anti-htTg negativo	anti-htTg positivo	Total
<i>in house</i> negativo	27	01	28
<i>in house</i> positivo	02	0	02
Total	29	01	30

anti-htTg – antitransglutaminase tissular recombinante humana
concordância: 27 (90%); Kappa= - 0,047; p= 0,786; McNemar: p=1,0

Tabela 22. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia *in house* e do anti-htTg comercial no grupo “doença inflamatória intestinal”

ELISA	anti-htTg negativo	anti-htTg positivo	Total
<i>in house</i> negativo	13	01	14
<i>in house</i> positivo	9	0	9
Total	22	01	23

anti-htTg – antitransglutaminase tissular recombinante humana
concordância: 13 (56,52%); Kappa= - 0,085; p= 0,412; McNemar: p=0,021

Tabela 23. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia *in house* e o anti-htTg comercial no grupo “hepatite auto-imune”

ELISA	anti-htTg negativo	anti-htTg positivo	Total
<i>in house</i> negativo	23	01	24
<i>in house</i> positivo	04	02	06
Total	27	03	30

anti-htTg – antitransglutaminase tissular recombinante humana
Concordância: 25 (83,33%); Kappa= 0,359; p= 0,033; McNemar: p=0,375

Tabela 24. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia *in house* e o anti h-tTg comercial no grupo “saudáveis”

ELISA	anti-htTg negativo	anti-htTg positivo	Total
<i>in house</i> negativo	18	0	18
<i>in house</i> positivo	0	0	0
Total	18	0	18

anti-htTg – antitransglutaminase tissular recombinante humana
concordância: 18 (100%); Dispensa análise

No grupo “saudáveis” todos os soros foram negativos tanto no ELISA *in house* quanto no ELISA comercial anti-htTg. Nos demais grupos, o teste Kappa evidenciou concordância significativa entre o ELISA desenvolvido *in house* e o ELISA comercial anti-htTg apenas no grupo “HAI”. O teste de McNemar mostrou diferença significativa no grupo “DII” (a proporção de soros positivos ao ELISA *in house* e negativos para ELISA comercial foi maior que a de soros positivos ao ELISA comercial e negativos ao ELISA *in house*).

4.10. Concordância entre os resultados do anti-tTg ao ELISA anti-tTg de cobaia *in house* e os resultados do ELISA comercial anti-tTg de cobaia comercial nos pacientes com DCNT e nos grupos controles

As tabelas 25 a 30 apresentam as concordâncias entre os resultados do ELISA para a pesquisa do anti-tTg, comparando o ELISA *in house* e o ELISA comercial anti-tTg.

Tabela 25. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia *in house* e o anti-tTg de cobaia comercial no grupo “doença celíaca não tratada”

ELISA	anti-tTg de cobaia comercial negativo	anti-tTg de cobaia comercial positivo	Total
<i>in house</i> negativo	0	26	26
<i>in house</i> positivo	0	23	23
Total	0	49	49

anti-tTg – antitransglutaminase tissular
concordância: 23 (46,93); Kappa= 0 (inexistência de associação)

Tabela 26. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia *in house* e o anti-tTg de cobaia comercial no grupo “doença celíaca tratada”

ELISA	anti-tTg de cobaia comercial negativo	anti-tTg de cobaia comercial positivo	Total
<i>in house</i> negativo	12	10	22
<i>in house</i> positivo	0	0	0
Total	12	10	22

anti-tTg – antitransglutaminase tissular
concordância: 12 (54,54%); Kappa= 0 (inexistência de associação)

Tabela 27. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia *in house* e o anti-tTg de cobaia comercial no grupo “diarréia crônica”

ELISA	anti-tTg de cobaia comercial negativo	anti-tTg de cobaia comercial positivo	Total
<i>in house</i> negativo	27	01	28
<i>in house</i> positivo	02	0	02
Total	29	01	30

anti-tTg – antitransglutaminase tissular
concordância: 27 (90%); Kappa= - 0,047; p=0,786; McNemar: p=1,0

Tabela 28. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia *in house* e do anti-tTg de cobaia comercial no grupo “doença inflamatória intestinal”

ELISA	anti-tTg de cobaia comercial negativo	anti-tTg de cobaia comercial positivo	Total
<i>in house</i> negativo	12	02	14
<i>in house</i> positivo	09	0	09
Total	21	02	23

anti-tTg – antitransglutaminase tissular
concordância: 12 (52,17%); Kappa= -0,166; p= 0,235; McNemar: p=0,065

Tabela 29. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia *in house* e do anti-tTg de cobaia comercial no grupo “hepatite auto-imune”

ELISA	anti-tTg de cobaia comercial negativo	anti-tTg de cobaia comercial positivo	Total
<i>in house</i> negativo	23	01	24
<i>in house</i> positivo	03	03	06
Total	26	04	30

anti-tTg – antitransglutaminase tissular
concordância: 26 (86,67%); Kappa= 0,524; p= 0,003; McNemar: p=0,625

Tabela 30. Concordância entre os resultados do ELISA anti-tTg de cobaia *in house* e do anti- tTg de cobaia comercial no grupo “saudáveis”

ELISA	anti-tTg de cobaia comercial negativo	anti-tTg de cobaia comercial positivo	Total
<i>in house</i> negativo	17	01	18
<i>in house</i> positivo	0	0	0
Total	17	01	18

anti-tTg – antitransglutaminase tissular
concordância: 17 (94,44%); Kappa= 0 (inexistência de associação)

No grupo “saudáveis” um soro foi positivo no ELISA comercial anti-tTg de cobaia. O teste Kappa evidenciou concordância significativa entre o ELISA *in house* anti-tTg de cobaia e o ELISA comercial anti-htTg apenas no grupo “HAI”. O teste de McNemar não mostrou diferença significativa em nenhum dos grupos estudados.

4.11. Concordância entre os resultados dos ELISAs comerciais anti-tTg de cobaia e anti-htTg

As tabelas 31 a 36 apresentam as concordâncias entre os resultados dos ELISAs comerciais para a pesquisa do anti-tTg e anti-htTg no grupo “DCNT” e nos grupos controles.

Tabela 31. Concordância entre os resultados dos ELISAs comerciais anti-htTg e o anti-tTg de cobaia no grupo “doença celíaca não tratada”

ELISA	anti-tTg de cobaia	anti-tTg de cobaia	Total
comercial	negativo	positivo	
anti-htTg negativo	0	0	0
anti-htTg positivo	0	49	49
Total	0	49	49

anti-tTg – antitransglutaminase tissular de cobaia
 anti-htTg – antitransglutaminase tissular recombinante humana
 concordância: 49 (100%); dispensa análise

Tabela 32. Concordância entre os resultados dos ELISAs comerciais anti-htTg e o anti-tTg de cobaia no grupo “doença celíaca tratada”

ELISA	anti-tTg de cobaia	anti-tTg de cobaia	Total
comercial	negativo	positivo	
anti-htTg negativo	08	02	10
anti-hTtg positivo	04	08	12
Total	12	10	22

anti-tTg – antitransglutaminase tissular de cobaia
 anti-htTg – antitransglutaminase tissular recombinante humana
 concordância: 16 (72,73%); Kappa= 0,459; p=0,029; McNemar p=0,687

Tabela 33. Concordância entre os resultados dos ELISAs comerciais anti-htTg e o anti- tTg de cobaia no grupo “diarréia crônica”

ELISA	anti-tTg de cobaia	anti-tTg de cobaia	Total
comercial	negativo	positivo	
anti-htTg negativo	29	0	29
anti-hTtg positivo	0	01	01
Total	29	01	30

anti-tTg – antitransglutaminase tissular de cobaia

anti-htTg – antitransglutaminase tissular recombinante humana

concordância: 30 (100%); Kappa= 1; p= 0,000; McNemar: p=1,00

Tabela 34. Concordância entre os resultados dos ELISAs comerciais anti-htTg e o anti-tTg de cobaia no grupo “doença inflamatória intestinal”

ELISA	anti-tTg de cobaia	anti-tTg de cobaia	Total
comercial	negativo	positivo	
anti-htTg negativo	21	01	22
anti-htTg positivo	0	01	01
Total	21	02	23

anti-tTg – antitransglutaminase tissular de cobaia

anti-htTg – antitransglutaminase tissular recombinante humana

Concordância: 22 (95,65%); Kappa= 0,646; p= 0,001; McNemar: p=1,00

Tabela 35. Concordância entre os resultados dos ELISAs comerciais anti-htTg e o anti-tTg de cobaia no grupo “hepatite auto-imune”

ELISA	anti-tTg de cobaia	anti-tTg de cobaia	Total
comercial	negativo	positivo	
anti-htTg negativo	26	01	27
anti-htTg positivo	0	03	03
Total	26	04	30

anti-tTg – antitransglutaminase tissular de cobaia

anti-htTg – antitransglutaminase tissular recombinante humana

concordância: 29 (96,67%); Kappa= 0,839; p= 0,000; McNemar: p=1,0

Tabela 36. Concordância entre os resultados dos ELISAs comerciais anti-htTg e o anti-tTg de cobaia no grupo “saudáveis”

ELISA	anti-tTg de cobaia	anti-tTg de cobaia	Total
comercial	negativo	positivo	
anti-htTg negativo	17	01	18
anti-htTg positivo	0	0	0
Total	17	01	18

anti-tTg – antitransglutaminase tissular de cobaia

anti-htTg – antitransglutaminase tissular recombinante humana

concordância: 17 (94,44%); Kappa= 0 (inexistência de associação)

O teste Kappa evidenciou concordância significativa entre o ELISA comercial anti-htTg e o ELISA comercial anti-tTg de cobaia em todos os grupos, exceto no grupo “saudáveis” onde um soro foi positivo ao ELISA comercial anti-tTg de cobaia. O teste de McNemar não mostrou diferença significativa.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A presença de auto-anticorpos circulantes representa uma das principais características sorológicas da doença celíaca. Na prática clínica, a pesquisa desses marcadores é utilizada para triagem sorológica, identificando os candidatos à biópsia intestinal. Inversamente, são empregados para confirmar o diagnóstico de pacientes que apresentam alterações histológicas compatíveis. Prestam-se ainda para a monitorização da resposta à dieta com restrição de glúten e para a investigação de manifestações extra-intestinais atípicas. Do ponto de vista epidemiológico, os auto-anticorpos são amplamente utilizados para estudos populacionais, orientando a indicação da biópsia intestinal. Em 1997, Dietrich *et al.* identificaram a transglutaminase tissular como antígeno-alvo reconhecido pelo AAE na doença celíaca.^{5,6,62} Essa descoberta tornou possível o desenvolvimento de ensaios do tipo ELISA, utilizando a transglutaminase tissular como substrato da reação em que se pesquisam anticorpos contra antígenos específicos.^{5,6,80,81}

Seguindo a mesma metodologia descrita na literatura^{5,6,62} e utilizando soros de pacientes com diagnóstico bem estabelecido, assim como utilizando sempre a mesma alíquota de soro para todos os testes e realizando os diferentes ensaios com os diferentes grupos simultaneamente, nossos resultados com o ELISA *in house*, foram desapontadores. No grupo “DCNT”, o número de positivos foi muito baixo (falso-negativos). Nos grupos controles, principalmente no grupo “DII”, o número de positivos foi elevado.

Podemos afirmar que se trata de falso-positivos porque o AAE foi negativo e a biópsia intestinal realizada em muitos desses pacientes não evidenciou alterações sugestivas de doença celíaca.

Vários detalhes técnicos descritos na metodologia como tempo de padronização, solução de bloqueio (concentração de gelatina), utilização de cloreto de cálcio, preparo prévio das soluções ou no mesmo dia, pH das soluções, manuseio da transglutaminase, foram repetidamente testados e as melhores condições foram seguidas com critério durante todos os ensaios.^{5,62,78}

Padronizamos o método utilizando a transglutaminase na concentração de 5 µg/ml, diferentemente da concentração padronizada por outros grupos (10 µg/ml), uma vez que a utilização da menor concentração não nos pareceu prejudicar a positividade do teste.^{5,6,62} Como somente 30% do extrato bruto da transglutaminase comercial⁵⁸ representam realmente a proteína, podemos ter reduzido a quantidade de transglutaminase ligada à placa. Isso explicaria a baixa positividade dos soros no grupo “DCNT”, mas definitivamente não explicaria a alta reatividade dos grupos controles. De acordo com a figura 3, pode-se observar que os resultados foram mais positivos com a concentração da tTg de 10 µg/ml para o grupo “DCNT” e não foram tão diferentes para os outros grupos controles na concentração de 5 µg/ml. Pode ser que tivéssemos resultados melhores com essa concentração, mas certamente outros fatores relacionados à manipulação do antígeno ou à ligação do antígeno com o anticorpo estão envolvidos para justificar os resultados falso-negativos do ELISA *in house*.

Preferimos não discutir valores referentes à sensibilidade e especificidade com os nossos resultados por termos grupos selecionados dentro de uma amostragem pré-definida, não refletindo a pesquisa da positividade de determinado auto-anticorpo na rotina de pesquisa da doença celíaca. No critério de inclusão para o grupo “DCNT”, foi definido que todos os pacientes teriam previamente AAE positivo e biópsia compatível para doença celíaca. Nos grupos controles nem todos os pacientes foram submetidos à biópsia de delgado para que pudéssemos falar de falso-positivos em indivíduos que apresentaram anti-tTg positivo.

A utilização de grupos controles com outras doenças intestinais pode ter sido um dos fatores que aumentou o número de falso-positivos do ELISA *in house*, uma vez que vários soros desses grupos foram positivos. Como já descrito na literatura,^{58,62,71,82,83} pacientes com RCUI e doença de Crohn podem representar falso-positivos na pesquisa do anti-tTg pelo ELISA. Em ensaio de grupo italiano⁸³ pesquisando anti-tTg em 49 pacientes com DII e grupos controles com outras doenças intestinais e auto-imunes, encontrou correlação significativa entre o anti-tTg e o índice de atividade da doença de Crohn. Anti-tTg circulante e indução de apoptose foi observada em outras patologias que levam a lesão intestinal como Crohn e RCUI. A presença de anticorpos anti-tTg não é evento específico que ocorre somente em pacientes com doença celíaca, mas sim fenômeno geral relacionado a lesão da mucosa mais do que a natureza auto-imune da doença celíaca.⁸⁴

No grupo “DiaCro” os dois pacientes que apresentavam biópsia de delgado compatível com doença celíaca, sem deficiência de IgA e negativos

para a pesquisa do AAE, foram negativos para a pesquisa do anti-tTg pelos três ELISAs. Dessa forma não chegamos ao diagnóstico de doença celíaca baseando-nos no perfil de auto-anticorpos, o que definitivamente não exclui esse diagnóstico. O médico que acompanha esses pacientes deverá se orientar pela clínica de acordo com a resposta terapêutica à retirada do glúten. Ressalta-se ainda, que biópsia sugestiva de doença celíaca pode ser encontrada em outras doenças intestinais. Ao contrário, outra paciente desse grupo que não apresentava biópsia de delgado compatível com doença celíaca e que foi positiva para os dois *kits* comerciais, pode ser considerada como falso-positivo para os *kits* comerciais.

Possível explicação para a existência de testes anti-tTg falso-positivos no grupo "HAI" seria a utilização da transglutaminase extraída de fígado de cobaia. De fato, foi verificado que a transglutaminase Sigma (extrato bruto de fígado de cobaia) é composta de pelo menos 14 diferentes componentes protéicos.⁷⁵ Soros de pacientes com doença hepática crônica podem apresentar anticorpos para antígenos protéicos da matriz hepática, provavelmente comuns a seres humanos e a outros mamíferos, gerando resultados falso-positivos para o anti-tTg. Em trabalho de 2001, Carroccio *et al.*,⁷⁵ demonstraram que os resultados falso-positivos, em pacientes com doença hepática, eram na verdade decorrentes da natureza do antígeno utilizado no ELISA e que desapareciam quando o ELISA com a transglutaminase recombinante humana era utilizado. Outra explicação seria reação inespecífica devido à presença de hipergamaglobulinemia em pacientes com doença hepática crônica.^{75,85} No presente estudo, a

positividade para o anti-tTg foi de seis casos para o ELISA *in house*, quatro para o *kit* anti-tTg de cobaia e três para o *kit* anti-htTg. Um desses pacientes apresentava AAE positivo, biópsia de delgado não compatível com doença celíaca e foi positivo para os três ELISAs. O diagnóstico dessa paciente poderia ser considerado como de doença celíaca latente,¹⁷ pois fica difícil considerar como falso-positivo soro com reatividade de 1/640 de AAE e positivo para o anti-tTg por três ELISAs diferentes. Os outros pacientes eram negativos para a pesquisa do AAE e não foram submetidos à biópsia intestinal.

Os resultados dos dois ELISAs comerciais foram superponíveis. Houve concordância de 100% entre eles para o grupo “DCNT” e para o grupo “DiaCro”; de 96,67%, 95,65%, 94,44% e 72,73% para os grupos “HAI”, “DII”, “saudáveis” e “DCT”. Um paciente do grupo “saudáveis” e com AAE negativo foi positivo para o anti-tTg de cobaia comercial.

Com a utilização do complexo transglutaminase/fibronectina esperávamos que houvesse aumento no número de indivíduos positivos no grupo “DCNT” e diminuição de resultados falsos-positivo nos grupos controles, o que na realidade não ocorreu. Houve aumento do número de indivíduos positivos nos grupos “DII” e “DiaCro” tanto para a fibronectina como para o complexo transglutaminase/fibronectina. Isso poderia ser explicado pelo fato da fibronectina ser proteína da matriz extracelular e nessas doenças haver lesão da parede intestinal, ocorrendo maior liberação dessa proteína e conseqüente formação de anticorpos, principalmente os da classe IgA.⁷⁵

Resultado a ser discutido foi a baixa reatividade dos soros dos pacientes com doença de Crohn para os anti-tTg de cobaia *in house*, antifibronectina e anti-tTg/antifibronectina, quando comparados com os soros dos pacientes com RCUI, com resultados estatisticamente significantes para os dois primeiros. A maior reatividade do anti-tTg em doentes com RCUI já havia sido descrita na literatura,^{82,83,84} mas para o antifibronectina ainda não havia sido. Como não se tem a informação de uso de corticóides e drogas imunossupressoras pelos doentes na época da coleta do sangue, pode ser que essas características têm relação com esse fato, uma vez que os pacientes com doença de Crohn tendem a utilizar com mais frequência esses medicamentos por tempo mais prolongado.

Em cultura de fibroblastos, Cançado⁵⁶ observou a presença do padrão de fluorescência na matriz extracelular, correspondente à distribuição da fibronectina semelhante ao encontrado em pacientes com doença celíaca, em soro de um paciente com diagnóstico de doença de Crohn e que era negativo para a pesquisa do AAE. Esse mesmo paciente foi testado para detecção do anti-tTg, utilizando o ELISA *in house* e os *kits* comerciais e apresentou positividade para o anti-tTg nos dois *kits* comerciais, porém foi negativo para o anti-tTg do ensaio *in house*. A biópsia duodenal desse paciente na época da coleta da amostra não mostrava quadro histológico compatível com doença celíaca. Reação para componentes de fibroblastos cultivados em placas de poliestireno havia sido referida em ensaio de ELISA com esse substrato.⁸⁶ Esses dados em conjunto sugerem que pacientes com doença inflamatória intestinal apresentam reatividade para antígenos

localizados na matriz extracelular que reagem cruzadamente com a tTg ou com a fibronectina.

A especificidade da antigenicidade da transglutaminase e da fibronectina utilizadas no estudo foi demonstrada em ELISA direto,⁷⁸ utilizando anticorpos monoclonais anti-tTg e antifibronectina contra os respectivos substratos. Colocamos na placa de ELISA transglutaminase, fibronectina e o complexo transglutaminase/ fibronectina. Após as etapas normais de um ELISA (sensibilização e bloqueio) colocamos os respectivos monoclonais nos orifícios da placa, isto é, para a transglutaminase colocamos o anti-tTg, para a fibronectina o antifibronectina e para o complexo colocamos em orifícios diferentes a anti-tTg e antifibronectina. A reação foi positiva para o antígeno e seu respectivo monoclonal, com o complexo Tg/Fn foi positiva frente aos dois anticorpos monoclonais. Foi feita também a reação cruzada transglutaminase e antifibronectina, fibronectina e anti-tTg e não houve reação quando aplicamos cruzadamente os anticorpos contra os antígenos. Portanto, a transglutaminase, apesar dos contaminantes, reconheceu o monoclonal específico (anti-tTg) e a fibronectina também reconheceu o monoclonal específico (antifibronectina), com isso pudemos comprovar a especificidade dos antígenos e também, a integridade dos antígenos no complexo.

Não encontramos resultados estatisticamente significantes para a pesquisa do anti-tTg ao ELISA *in house*, quando analisamos o grupo “DCNT” dividido por faixa etária. Diferentemente dos nossos resultados, Salmaso, et al.⁸⁷ observaram maior positividade nos resultados para a pesquisa do anti-

tTg por ELISA *in house* em crianças. Não fizemos esta comparação com os kits comerciais uma vez que todos os soros desse grupo foram positivos frente aos dois *kits* comerciais.

Trabalhos publicados têm demonstrado que soros com títulos baixos, menores que $1/80^{80}$, para o AAE têm anti-tTg negativo, porém não pudemos confirmar essas observações devido ao número reduzido de indivíduos com títulos baixos de AAE nesse estudo (um paciente com título $1/160$). Entretanto, observamos relação estatisticamente significativa entre títulos elevados ($\geq 1/1280$) do AAE e maior percentual de positividade do anti-tTg no ensaio *in house* (63,3%). Para os ensaios comerciais, como todos os soros foram positivos para os ELISAs, a análise estatística foi dispensável (concordância de 100%). Contudo, podemos inferir pelos resultados do grupo “DCT” que os ensaios comerciais são altamente sensíveis, porque soros positivos nos dois ensaios tinham sido negativos para o AAE.

Todos os soros do grupo “DCNT” eram positivos para o AAE (critério para inclusão neste grupo) e todos foram positivos para a pesquisa do anti-tTg, utilizando os *kits* comerciais, porém com o ELISA *in house* obtivemos positividade somente em 23 (46,9%) dos 49 pacientes desse grupo. Tesei *et al.*⁵⁰ observaram 100% de especificidade e 86% de sensibilidade para a pesquisa do anticorpo AAE em cortes de esôfago de macaco. Para a pesquisa do anti-tTg utilizando o *kit* comercial obtiveram 96% de especificidade e 91% de sensibilidade para o htTg. Os autores obtiveram excelente concordância entre os dois testes. Levando em

consideração os resultados com os *kits* comerciais, em comparação aos resultados do AAE, obtivemos resultados semelhantes aos observados pelos autores. A comparação entre o *kit* utilizando a transglutaminase extraída de fígado de cobaia e a recombinante humana mostrou resultados concordantes em 96% dos casos.

Em trabalho de diagnóstico e acompanhamento de adesão à dieta com restrição de glúten, Di Domenico *et al.*, em 2002,⁸⁸ já tinham demonstrado alta concordância (98,7%) entre a pesquisa do anti-tTg por ELISA e o AAE no início do diagnóstico da doença, porém no acompanhamento do tratamento, após 12 meses o número de pacientes positivos foi maior para a pesquisa do anti-tTg do que para o AAE, sugerindo maior sensibilidade do ELISA. No presente estudo, no grupo “DCT” foram obtidos resultados semelhantes, uma vez que todos os soros apresentavam negatividade para o AAE e com os *kits* comerciais a positividade foi de 10 casos para o anti-tTg e 12 casos para o anti h-tTg e com ELISA *in house* todos os soros foram negativos, demonstrando, mais uma vez, a superioridade dos *kits* comerciais sobre o AAE e o ELISA *in house*. No entanto, foi o grupo de pior concordância entre os dois ELISAs comerciais, de 72,73%.

Tanto a pesquisa do AAE em cortes de cordão umbilical quanto a utilização dos *kits* comerciais, utilizando a transglutaminase extraída de fígado de cobaia ou a transglutaminase humana recombinante foram excelentes métodos para confirmação de pacientes com suspeita de doença celíaca como verificado por diferentes autores.^{70,87,88} Por outro lado, o ELISA

in house utilizando a transglutaminase de cobaia e padronizado nas condições de nosso laboratório, não mostrou ser bom método de triagem para o diagnóstico da doença celíaca, sendo bem inferior à pesquisa do AAE em cortes de cordão umbilical. De acordo com os resultados aqui apresentados, o Elisa *in house* não pode substituir a pesquisa do AAE que apresenta resultados excelentes como triagem.

Por outro lado, para o acompanhamento terapêutico, se tomarmos por base a alta positividade do anti-tTg em ambos os ELISAs comerciais, estando o AAE negativo, um bom ELISA parece ser superior ao exame de imunofluorescência. No entanto, não houve controle por biópsia duodenal para certificarmos da normalização ou não das alterações histológicas com a negatificação do anti-tTg.

O alto custo dos *kits* comerciais inviabiliza a sua implantação em hospitais da rede pública. A padronização do ELISA *in house* seria uma forma de baratearmos o custo da pesquisa do anti-tTg e deveria ser objetivo a ser atingido em ensaios futuros.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. O ELISA *in house* não foi boa técnica para a pesquisa do antitransglutaminase tissular, em razão da baixa positividade no grupo “doença celíaca não tratada” e alta positividade nos grupos controles com antiendomísio negativo.
2. A utilização do complexo transglutaminase/fibronectina não aumentou a positividade no grupo “doença celíaca não tratada” nem reduziu a positividade dos grupos controles.
3. Não houve diferença na positividade para o antitransglutaminase tissular de cobaia *in house* entre crianças e adultos no grupo “doença celíaca não tratada”.
4. Houve relação de positividade entre os títulos do antiendomísio e a positividade do antitransglutaminase tissular para o ELISA *in house*.
5. A positividade dos anticorpos contra os substratos transglutaminase tissular, fibronectina e complexo transglutaminase tissular/fibronectina foi maior no subgrupo “retocolite ulcerativa inespecífica” do que a observada no subgrupo “doença de Crohn”.

6. Os *kits* comerciais foram bons testes para discriminar a positividade no grupo “doença celíaca não tratada” em relação aos grupos controles utilizados.
7. A ausência de reatividade do antitransglutaminase tissular pelos *kits* comerciais não acompanhou sistematicamente a negatificação do antiendomísio no grupo “doença celíaca tratada”, sugerindo ser o ELISA o melhor método para acompanhamento terapêutico.
8. Qualquer padronização de ELISA para a doença celíaca, deverá ser feita comparando-se os resultados obtidos com *kits* comerciais e com o antiendomísio.
9. Diante dos resultados obtidos, a pesquisa do antitransglutaminase tissular de cobaia *in house* não pode ser incorporada na triagem diagnóstica para doença celíaca em nosso serviço.

ANEXOS

ANEXO A: IDADE E SEXO DOS PACIENTES NOS DIFERENTES GRUPOS**A-1. Grupo “doença celíaca não tratada”**

Nº SORO	IDADE	SEXO
1	37	M
2	15	M
3	44	F
4	34	F
5	27	M
6	1	F
7	4	F
8	7	F
9	10 m	M
10	38	F
11	16	F
12	3	M
13	18	F
14	38	F
15	17	M
16	24	F
17	37	F
18	20	F
19	60	F
20	13	F
21	67	M
22	4	F
23	41	F
24	58	F
25	3	F
26	8	M
27	25	F
28	12	F
29	1	M
30	38	F
31	19	F
32	12	M
33	24	F
34	4	M
35	15	F
36	13	F
37	36	F

A-1. continuação

Nº SORO	IDADE	SEXO
38	2	F
39	51	F
40	64	F
41	37	F
42	1	F
43	57	F
44	35	M
45	22	F
46	52	F
47	26	M
48	44	F
49	51	F

A-2. Grupo “doença celíaca tratada”

Nº SORO	IDADE	SEXO
1	48	F
2	7	F
3	36	M
4	1	F
5	61	F
6	41	F
7	54	F
8	7	F
9	39	F
10	28	F
11	66	F
12	15	M
13	6	F
14	17	F
15	7	F
16	6	M
17	15	F
18	3	F
19	41	F
20	39	F
21	40	F
22	17	M
23	28	M

A-3. Grupo “doença inflamatória intestinal”

Nº SORO	IDADE	SEXO
1	23	M
2	32	F
3	35	M
4	52	M
5	71	F
6	31	M
7	34	F
8	41	M
9	22	M
10	29	F
11	12	F
12	13	F
13	36	F
14	31	M
15	25	M
16	41	F
17	29	M
18	27	M
19	28	M
20	29	M
21	40	M
22	60	F
23	44	M

A-4. Grupo "hepatite auto imune"

Nº SORO	IDADE	SEXO
1		F
2	18	F
3	40	F
4	23	F
5	21	F
6	19	F
7	31	F
8	20	F
9	35	F
10	DN9/3/63	F
11	24	M
12		F
13	14	M
14	43	F
15	21	F
16	66	F
17	14	F
18	24	F
19	12	F
20	13	F
21	16	F
22	15	F
23	15	M
24	52	F
25	33	F
26	63	F
27	55	F
28		F
29	15	F
30	43	F

A-5. Grupo “diarria crônica AAE negativo”

Nº SORO	IDADE	SEXO
1	<18	M
2	31	M
3	27	F
4	27	M
5	22	F
6	23	F
7	37	F
8	58	F
9	53	F
10	31	M
11	26	F
12	23	M
13	17	M
14	40	F
15	33	M
16	56	F
17	37	M
18	1	F
19	26	F
20	37	F
21	24	F
22	31	F
23	10	M
24	44	F
25	48	F
26	10	F
27	18	F
28	33	F
29	5	M
30	42	F

A-6. Grupo “saudáveis”

Nº SORO	IDADE	SEXO
1	41	F
2	27	F
3	49	F
4	30	F
5	30	F
6	29	F
7	29	F
8	26	M
9	41	F
10	43	F
11	28	F
12	23	F
13	48	F
14	29	F
15	28	F
16	29	F
17	27	M
18	60	F

ANEXO B: RESULTADOS DA REAÇÃO DE IFI E DENSIDADES ÓPTICAS DO ELISA NOS DIFERENTES GRUPOS

B-1. Grupo “doença celíaca não tratada”

Nº SORO	TÍTULO DO AAE	ELISA tTg	ELISA Fn	ELISA tTg/Fn
1	>1/1280	0,771	0,789	0,198
2	>1/1280	1,588	0,506	0,566
3	1/640	0,41	0,389	0,171
4	1/1280	1,096	1,384	1,63
5	1/1280	1,515	0,975	1,174
6	>1/1280	1,763	0,926	1,727
7	1/1280	1,016	0,294	0,925
8	>1/1280	0,515	0,208	0,518
9	1/1280	0,651	0,393	0,432
10	1/320	0,766	0,471	0,521
11	>1/1280	1,586	0,999	1,085
12	1/640	1,107	0,391	1,081
13	1/640	0,764	0,337	0,657
14	1/640	0,762	0,392	0,507
15	1/640	0,808	0,295	0,621
16	1/1280	0,787	0,611	0,486
17	>1/1280	0,765	0,374	0,437
18	1/640	0,673	0,376	0,52
19	1/320	0,98	0,683	0,505
20	1/640	0,763	0,624	0,419
21	>1/1280	2	1,823	1,708
22	1/640	0,594	0,576	0,455
23	1/640	0,751	0,688	0,41
24	>1/1280	2	2	1,588
25	1/160	0,275	0,217	0,232
26	1/320	0,259	0,236	0,179
27	>1/1280	2	2	2
28	>1/1280	1,856	0,626	1,636
29	>1/1280	1,057	0,321	0,898
30	>1/1280	2	2	1,863
31	1/1280	0,561	0,304	0,419
32	1/1280	0,735	0,348	0,539
33	1/320	0,661	0,143	0,524
34	1/640	0,515	0,157	0,447
35	>1/1280	2	0,781	2
36	1/320	0,841	0,639	0,498
37	>1/1280	1,908	1,534	1,199

B-1. continuação

Nº SORO	TÍTULO DO AAE	ELISA tTg	ELISA Fn	ELISA tTg/Fn
38	>1/1280	0,699	0,244	0,600
39	1/1280	0,79	0,468	□,531
40	1/1280	2	2	1,623
41	1/1280	1,665	0,636	1,495
42	>1/1280	1,512	0,814	1,206
43	1/640	1,011	0,887	1,079
44	>1/1280	2	2	2
45	1/1280	2	2	2
46	>1/1280	2	2	2
47	>1/1280	0,5	0,218	0,218
48	>1/1280	0,148	0,147	0,08
49	1/320	0,201	0,208	0,104

B-2. Grupo “doença celíaca tratada”

Nº SORO	TÍTULO DO AAE	ELISA tTg	ELISA Fn	ELISA tTg/Fn
1	neg	0,219	0,212	0,115
2	neg	0,125	0,12	0,074
3	neg	0,247	0,278	0,111
4	neg	0,144	0,126	0,077
5	neg	0,197	0,198	0,094
6	neg	0,148	0,147	0,08
7	neg	0,201	0,208	0,104
8	neg	0,516	0,569	0,457
9	neg	0,251	0,248	0,262
10	neg	0,364	0,388	0,295
11	neg	0,476	0,568	0,422
12	neg	0,624	0,691	0,53
13	neg	0,407	0,273	0,319
14	neg	0,687	0,442	0,492
15	neg	0,321	0,217	0,28
16	neg	0,295	0,206	0,241
17	neg	0,266	0,18	0,224
18	neg	0,34	0,218	0,217
19	neg	0,521	0,31	0,397
20	neg	0,608	0,456	0,35
21	1/5	0,435	0,274	0,319
22	neg	0,478	0,326	0,377
23	neg	0,531	0,341	0,401

B-3. Grupo “doença inflamatória intestinal”

Nº SORO	TÍTULO DO AAE	DIAGNÓSTICO	ELISA tTg	ELISA Fn	ELISA tTg/Fn
1	neg	Crohn	0,422	0,486	0,426
2	neg	RCUI	1,156	1,104	1,178
3	neg	Crohn	1,281	1,297	1,343
4	neg	RCUI	0,872	0,97	1,046
5	neg	RCUI	0,768	0,802	0,828
6	neg	Crohn	0,717	0,74	0,712
7	neg	Crohn	0,172	0,154	0,073
8	neg	Crohn	0,313	0,343	0,104
9	neg	Crohn	0,852	0,885	0,963
10	neg	RCUI	0,14	0,129	0,07
11	neg	Crohn	0,244	0,275	0,094
12	neg	Crohn	0,507	0,611	0,483
13	neg	RCUI	0,161	0,159	0,081
14	neg	Crohn	0,331	0,364	0,118
15	neg	RCUI+CEP	0,297	0,302	0,114
16	neg	Crohn	0,884	0,937	0,916
17	neg	RCUI+CEP	1,648	1,932	1,542
18	neg	RCUI+CEP	1,19	1,05	1,048
19	neg	RCUI+CEP	1,005	1,083	0,821
20	neg	RCUI+CEP	1,303	1,459	1,047
21	neg	RCUI+CEP	1,293	1,405	1,145
22	neg	RCUI+CEP	1,233	1,495	1,077
23	neg	RCUI+CEP	1,267	1,575	1,146

B-4. Grupo "hepatite auto imune"

Nº SORO	TÍTULO DO AAE	ELISA tTg	ELISA Fn	ELISA tTg/Fn
1	neg	0,521	0,338	0,392
2	neg	0,702	0,464	0,505
3	neg	0,819	0,533	0,565
4	neg	1,361	1,593	1,338
5	neg	1,367	1,904	0,931
6	neg	0,782	0,944	0,753
7	neg	0,596	0,413	0,422
8	neg	1,017	0,639	0,713
9	neg	1,074	1,251	1,03
10	neg	0,725	0,852	0,576
11	neg	0,375	0,456	0,132
12	neg	1,13	0,758	0,771
13	neg	0,823	0,724	0,52
14	neg	0,818	0,719	0,433
15	neg	0,867	0,638	0,622
16	neg	0,181	0,189	0,103
17	neg	0,822	0,562	0,619
18	neg	0,19	0,344	0,081
19	neg	0,815	0,546	0,57
20	neg	0,451	0,293	0,322
21	1/640	0,641	0,391	0,462
22	neg	0,293	0,484	0,099
23	NR	0,195	0,221	0,08
24	neg	0,284	0,313	0,104
25	neg	0,313	0,352	0,11
26	neg	0,397	0,465	0,141
27	neg	2	2	1,793
28	neg	0,285	0,298	0,347
29	neg	0,759	0,653	0,433
30	neg	0,743	0,831	0,619

B-5. Grupo “diarréia crônica AAE negativo”

Nº SORO	DIAGNOSTICO	TÍTULO DO AAE	BIÓPSIA	ELISA tTg	ELISA Fn	ELISA tTg/Fn
1	Diarréia	neg		0,661	0,803	0,688
2	Diarréia crônica	neg	DCI	0,42	0,44	0,387
3	Diarréia crônica	neg	DCI	0,839	0,867	0,897
4	Diarréia crônica	neg	DCI	0,889	0,989	0,825
5	Diarréia crônica	neg	DCI	0,633	0,56	0,611
6	Diarréia a/e	neg	DCI	0,471	0,49	0,532
7	Diabetes	neg	DCI	0,734	0,855	0,804
8	Diarréia crônica	neg	Duodenite atrófica	0,543	0,632	0,64
9	Diarréia a/e	Neg	Normal	0,396	0,454	0,433
10	Diarréia a/e	Neg	DCI	0,688	0,74	0,722
11	Diarréia	Neg	DCI	0,914	0,996	0,909
12	Diarréia	Neg	DCI	0,524	0,559	0,583
13	Diarréia	neg	DCI	0,566	0,547	0,642
14	Diarréia/Crohn	neg	normal	0,603	0,553	0,614
15	Diabetes Mellitus	neg	DCI	0,714	0,793	0,775
16	Diarréia	neg	DCI	1,371	1,412	1,377
17	Diarréia	neg	DCI Duodenite	0,54	0,575	0,622
18	Diarréia/DC?	neg	atrófica	0,454	0,521	0,539
19	Diarréia	neg	DCI	0,397	0,42	0,446
20	Sem diagnóstico	neg	DCI	0,592	0,61	0,683
21	Diarréia	neg	DCI	0,628	0,653	0,695
22	Diarréia	neg	DCI	1,196	1,379	1,003
23	Diarréia	neg	normal	0,338	0,389	0,296
24	Diarréia crônica /anemia	neg	DCI	0,23	0,218	0,104
25	Diarréia	neg	DCI	0,923	1,033	0,948
26	Trombose veia porta	neg	DCI	0,376	0,377	0,135
27	Pancreatite	neg	DCI	0,179	0,187	0,079
28	Anemia	neg	DCI	0,191	0,232	0,085
29	Baixa estatura	neg	DCI	0,149	0,13	0,068
30	asma	neg	normal	0,163	0,173	0,074

B-6. Grupo “saudáveis”

Nº SORO	TÍTULO DO AAE	ELISA tTg	ELISA Fn	ELISA tTg/Fn
1	neg	0,209	0,122	0,202
2	neg	0,224	0,122	0,189
3	neg	0,218	0,12	0,191
4	neg	0,233	0,12	0,196
5	neg	0,266	0,145	0,233
6	neg	0,698	0,396	0,554
7	neg	0,603	0,341	0,464
8	neg	0,786	0,469	0,607
9	neg	0,271	0,136	0,214
10	neg	0,217	0,108	0,177
11	neg	0,447	0,227	0,333
12	neg	0,407	0,227	0,32
13	neg	0,641	0,358	0,514
14	neg	0,29	0,164	0,238
15	neg	0,482	0,264	0,377
16	neg	0,375	0,207	0,299
17	neg	0,409	0,215	0,323
18	neg	0,322	0,166	0,249

**ANEXO C: RESULTADOS DAS DO E UNIDADES DO ELISA COMERCIAL
(*kit* h-t-Tg e *kit* tTg) NOS DIFERENTES GRUPOS**

C-1. Grupo “doença celíaca não tratada”

Nº SORO	ELISA D.O.(h-t-Tg)	ELISA UNIDADES	ELISA D.O. (t-Tg)	ELISA UNIDADES
1	3,405	132	3,622	198
2	3,411	132	3,648	199
3	2,283	88	3,333	182
4	3,578	138	3,817	208
5	3,584	139	3,494	190
6	3,733	144	3,713	203
7	3,467	134	3,686	201
8	3,424	132	3,708	202
9	3,474	134	3,384	185
10	3,431	133	2,989	163
11	3,548	137	3,468	189
12	3,72	144	3,683	201
13	2,942	114	3,546	194
14	3,7	143	3,448	188
15	3,553	137	3,496	191
16	2,396	116	3,323	165
17	2,955	144	3,724	185
18	3,595	175	3,626	180
19	2,426	118	2,331	116
20	1,882	91	1,308	65
21	3,699	180	3,515	174
22	3,543	172	3,323	165
23	0,936	45	0,901	45
24	3,266	159	3,512	174
25	2,441	119	2,288	114
26	3,233	125	1,208	94
27	3,471	134	3,767	189
28	3,802	147	3,807	191
29	3,310	128	3,648	183
30	3,463	134	3,407	171
31	3,774	146	3,677	185
32	3,423	133	3,288	165
33	3,404	164	3,767	197
34	2,753	107	3,634	183
35	3,670	142	3,485	175
36	1,813	88	1,831	96
37	2,609	126	3,711	194

C-1. continuação

Nº SORO	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA
	D.O. (h-tTg)	UNIDADES	D.O. (h-tTg)	UNIDADES
38	3,330	161	3,573	187
39	2,547	123	3,543	185
40	2,079	100	2,497	130
41	3,508	170	3,575	187
42	3,627	175	3,529	185
43	2,034	98	2,053	107
44	3,325	161	3,336	175
45	2,008	97	1,825	96
46	3,106	150	2,979	156
47	3,133	151	3,539	185
48	3,387	164	3,467	182
49	2,257	109	1,557	82

C-2. Grupo “doença celíaca tratada”

Nº SORO	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA
	D.O. (h-tTg)	UNIDADES	D.O. (h-tTg)	UNIDADES
1	0,245	95	0,233	13
2	0,903	35	0,381	21
3	2,771	107	1,141	62
4	0,389	15	0,143	8
5	0,396	15	0,309	17
6	0,508	20	0,240	13
7	1,099	43	0,545	30
8	0,836	32	0,660	36
9	0,568	22	0,322	18
10	0,529	20	0,705	39
11	0,352	14	0,293	16
12	1,794	69	0,954	52
13	0,850	41	0,370	18
14	0,381	18	0,346	17
15	0,284	14	0,222	11
16	0,217	10	0,161	8
17	0,393	19	0,251	12
18	1,173	57	0,665	33
19	0,494	19	0,546	27
20	0,545	26	0,357	18
21	0,393	19	0,401	20
22	ACABOU	O SORO		
23	2,767	134	1,210	60

C-3. Grupo “doença inflamatória intestinal”

Nº SORO	ELISA		ELISA	
	D.O. (h-tTg)	UNIDADES	D.O. (t-Tg)	UNIDADES
1	1,186	46	0,963	53
2	0,169	6	0,218	12
3	0,375	14	0,300	16
4	0,314	12	0,634	32
5	0,196	8	0,280	15
6	0,162	6	0,179	10
7	0,164	8	0,164	8
8	0,225	11	0,183	9
9	0,153	7	0,136	7
10	0,144	7	0,162	8
11	0,205	10	0,235	12
12	0,186	9	0,175	9
13	0,177	9	0,173	9
14	0,282	14	0,277	14
15	0,281	14	0,255	13
16	0,276	13	0,222	11
17	0,251	10	0,240	12
18	0,247	9	0,163	8
19	0,260	10	0,374	19
20	0,261	10	0,257	13
21	0,412	16	0,362	18
22	0,307	12	0,288	14
23	0,267	10	0,331	17

C-4. Grupo "hepatite auto imune"

Nº SORO	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA
	D.O. (h-tTg)	UNIDADES	D.O. (t-Tg)	UNIDADES
1	0,169	6	0,194	10
2	0,282	11	0,240	12
3	0,303	12	0,267	13
4	0,522	27	0,484	25
5	0,326	13	0,259	13
6	0,191	9	0,205	11
7	0,170	6	0,172	9
8	0,439	17	0,440	22
9	0,154	6	0,155	8
10	0,173	8	0,155	8
11	0,283	14	0,313	16
12	0,360	17	0,339	17
13	0,332	16	0,322	17
14	0,143	5	0,239	12
15	0,256	12	0,235	12
16	0,184	9	0,162	8
17	0,255	12	0,360	19
18	0,157	7	0,161	8
19	0,195	9	0,195	10
20	0,297	14	0,213	12
21	0,814	39	0,643	34
22	0,270	13	0,320	17
23	0,252	12	0,198	10
24	0,217	10	0,293	15
25	0,291	14	0,244	13
26	0,333	16	0,322	17
27	0,525	25	0,630	33
28	0,201	10	0,187	10
29	0,139	5	0,127	6
30	0,180	9	0,166	9

C-5. Grupo "diarrea crónica AAE negativo"

Nº SORO	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA
	D.O. (h-tTg)	UNIDADES	D.O. (t-Tg)	UNIDADES
1	0,112	4	0,127	7
2	0,217	8	0,186	10
3	0,199	8	0,173	9
4	0,353	14	0,340	19
5	0,190	7	0,195	11
6	0,144	6	0,160	9
7	0,238	9	0,317	17
8	0,194	7	0,189	10
9	0,181	7	0,296	16
10	0,168	6	0,205	11
11	0,260	10	0,206	11
12	0,264	10	0,213	12
13	0,214	10	0,303	15
14	0,226	11	0,316	16
15	0,243	12	0,367	18
16	0,142	7	0,271	13
17	0,118	6	0,108	5
18	0,185	9	0,140	7
19	0,125	6	0,341	17
20	0,170	8	0,164	8
21	0,180	8	0,136	7
22	0,242	12	0,232	11
23	0,164	6	0,194	10
24	0,437	17	0,389	19
25	0,139	5	0,226	11
26	0,881	34	0,561	28
27	0,168	6	0,153	8
28	0,135	5	0,161	8
29	0,115	4	0,179	9
30	0,151	6	0,256	13

C-6. Grupo "saudáveis"

Nº SORO	ELISA	ELISA	ELISA	ELISA
	D.O. (h-tTg)	UNIDADES	D.O.(t-Tg)	UNIDADES
1	0,139	7	0,120	6
2	0,173	8	0,156	8
3	0,140	7	0,134	7
4	0,158	8	0,241	12
5	0,227	11	0,225	11
6	0,303	12	0,206	10
7	0,165	6	0,145	7
8	0,184	7	0,265	13
9	0,137	5	0,125	6
10	0,148	6	0,115	6
11	0,156	6	0,152	8
12	0,229	11	0,499	26
13	0,275	13	0,292	15
14	0,173	8	0,151	8
15	0,254	12	0,291	15
16	0,132	6	0,165	9
17	0,151	7	0,190	10
18	0,188	9	0,179	9

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Trier JS. Celiac Sprue. *N England J Med* 1991;325:1709-19.
2. Wieser H. Relation between gliadin structure and coeliac toxicity. *Acta Paediatr [Suppl]*1996:3-9.
3. Goggins M, Kelleher D. Celiac Disease and other nutrient related injuries to the Gastrointestinal Tract. *Am J Gastroenterol* 1994;89:S2-17.
4. Holm K, Mäki M, Savilahti E, Lipsanen V, Laippala P, Koskimies S. Intraepithelial $\gamma\delta$ T-cell receptor Lymphocytes and genetic susceptibility to celiac disease. *Lancet* 1992;339:1500-3.
5. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken E O, Schuppan D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997;3:797-801.
6. Sulkanen S, Halttunen T, Laurila K, Kolho, K-L, Korponay-Szabó IR, Sarnesto A, Savilahti E, Collin P, Mäki M. Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology* 1998;115:1322-8.

7. Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB J* 1991;5:3071-7.
8. Uhlig H, Osman AA, Tanev ID, Viehweg J, Mothes T. Role of tissue transglutaminase in gliadin binding to reticular extracellular matrix and relation to celiac disease autoantibodies. *Autoimmunity* 1998;28:185-95.
9. Vogelsang H, Genser D, Wyatt J, Lochs H, Ferenci P, Granditsch G, Penner E. Screening for celiac disease: a prospective study on the value of noninvasive tests. *Am J Gastroenterol* 1995;90:394-8.
10. Schuppan D. Current concepts of celiac disease pathogenesis. *Gastroenterology* 2000;119: 234-42.
11. Clemente MG, Musu MP, Frau F, Bruscu G, Sole G, Corazza GR, Virgiliis S. Immune reaction against the cytoskeleton in celiac disease. *Gut* 2000;47:520-6.
12. Upchurch HF, Conway E, Patterson Jr MK, Birckbichler P, Maxwell MD. Cellular transglutaminase has affinity for extracellular matrix. *In Vitro Cell Dev Biol* 1987;23:795-800.

13. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;11:1185-94.
14. Farrel, RJ; Kelly CP. Clinical reviews: Diagnosis of celiac sprue. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3237-46.
15. Jojnston SD; Watson RGP; McMillan M; McMaster D, Evans A. Preliminary results from follow-up of a large-scale population survey of antibodies to gliadin, reticulín and aendomysium. *Acta Paediatr Supl* 1996;412:61-4.
16. Lerner A, Kumar V, Iancu TC. Immunological diagnosis of childhood celiac disease: comparison between antigliadin, antireticulin and antiendomysial antibodies. *Clin Exp Immunol* 1994;95:78-82.
17. Parnell NDJ, Ciclitira PJ – Review article: celiac disease and its management. *Aliment Pharmacol Ther*, 1999;13:1-13.
18. Carroccio A, Cavataio F, Iacono G, Agate V, Ippolito S, Kazmierska I, Campagna P, Soresi M, Montalto G. IgA antiendomysial antibodies on the umbilical cord in diagnosing celiac disease. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:759-63.

19. Stern M, Teuscher M, Wechmann T. Serological screening for celiac disease: methodological standards and quality control. *Acta Pædiatr* 1996;(Suppl412):49-51.
20. Nehra V. New clinical issues in celiac disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1998;27:453-65.
21. Chorzelski TP, Sulej J, Tchorzewka H, Jablonska S, Beutner EH, Kumar V. IgA class endomysium antibodies in dermatitis herpetiformis and celiac disease. *Ann N Y Acad Sci* 1983;420:325-34.
22. Chorzelski TP, Beutner EH; Sulej J, Tchorzewska H, Jablonska S, Kumar V; Kapuscinska A. IgA anti-endomysium antibody. A new immunological marker of dermatitis herpetiformis and celiac disease. *British J Dermatol*, 1984;111:395-402.
23. Yiannakou JY, Dell'Olio D, Saaka M, Ellis HJ, Rosen-Bronson S, Dumonde DC, Ciclitira PJ. Detection and characterization of anti-endomysial antibody in celiac disease using human umbilical cord. *Int Arch Allergy Immunol* 1997;112:140-4.

24. Kolho K-L, Savilahti E. IgA endomysium antibodies on human umbilical cord: an excellent diagnostic tool for celiac disease in childhood. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;24:563-7.
25. Hill ID. What are the sensitivity and specificity of serologic tests for celiac disease? Do sensitivity and specificity vary in different populations? *Gastroenterology* 2005;128(4)(Suppl 1):S25-S32.
26. Burgin-Wolff A, Gaze H, Hadziselimovic F, Huber H, Lentze MJ, Nussle D, Reymond-Berthet C. Antigliadin and antiendomysium antibody determination for coeliac disease. *Arch Dis Child* 1991;66:941-7.
27. McMillan SA, Haughton DJ, Biggart JD, Edgar JD, Porter KG, McNeill TA. Predictive value for coeliac disease of antibodies to gliadin, endomysium, and jejunum in patients attending for jejunal biopsy. *BMJ* 1991;303:1163-5.
28. Carroccio A, Iacono G, Montalto G, Cavataio F, Soresi M, Kazmierska I, Notabartolo A. Immunologic and absorptive tests in celiac disease: can they replace intestinal biopsies? *Scand J Gastroenterol* 1993;28:673-6.
29. Ladinser B, Rossipal E, Pittschieler K. Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. *Gut* 1994;35:776-8.

30. Vitoria JC, Arrieta A, Astigarraga I, Garcia-Masdevall D, Rodriguez-Soriano J. Use of serological markers as a screening test in family members of patients with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994;19:304-9.
31. Mascart-Lemone F, Lambrechts A. Serology of coeliac disease: early diagnosis and therapeutic impact. *Acta Gastroenterol Belg* 1995;58:388-96.
32. Uibo O, Lambrechts A, Mascart-Lemone F. Human oesophagus: a convenient antigenic substrate for the determination of antiendomysium antibodies in the serological diagnosis of celiac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995;7:37-40.
33. Sategna-Guidetti C, Grosso S, Bruno M, Grosso SB. Comparison of serum anti-gliadin, anti-endomysium and anti-jejunum antibodies in adult celiac sprue. *J Clin Gastroenterol* 1995;20:17-21.
34. De Lecea A, Ribes-Koninckx C, Polanco I, Calvete JF. Serological screening (antigliadin and antiendomysium antibodies) for nonovert coeliac disease in children of short stature. *Acta Paediatr Suppl* 1996;412:54-5.

35. Sacchetti L, Ferrajolo A, Salerno G, Esposito P, Lofrano MM, Oriani G, Micillo M, Paparo F, Troncone R, Auricchio S, Salvatore F. Diagnostic value of various serum antibodies detected by diverse methods in childhood celiac disease. *Clin Chem* 1996; 42:1838-42.
36. Ascher H, Hahn-Zoric M, Hanson LA, Kilander AF, Nilsson LA, Tlaskalova H. Value of serologic markers for clinical diagnosis and population studies of coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1996;31:61-7.
37. Bagnasco M, Montagna P, De Alessandri A, Castellano E, Pesce GP, Gatti R. IgA antiendomysium antibodies in human umbilical cord sections as a screening test in relatives of patients with celiac disease. *Allergy* 1997;52:1017-21.
38. Sategna-Guidetti C, Grosso SB, Bruno M, Grosso S. Is human umbilical cord the most suitable substrate for the detection of endomysium antibodies in the screening and follow-up of celiac disease? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1997;9:655-6.
39. Feighery C, Weir DG, Whelan A, Wliloughby R, Youngprapakorn S, Lynch S, O'Morain C, McEneaney P, O'Farrelly C. Diagnosis of gluten-sensitive enteropathy: is exclusive reliance on histology appropriate? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1998;10:919-25.

40. DiLeo M, Weisz G, Ansaldi Balocco N. Serum and salivary antiendomysium antibodies in the screening of coeliac disease. *Panminerva Med* 1999;41:68-71.
41. Vitoria JC, AlTieta A, Arranz C, Ayesta A, Sojo A, Maruri N, Garcia-Masdevall MD. Antibodies to gliadin, endomysium, and tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999;29:571-4.
42. Baldas V, Tommasini A, Trevisiol C, Berti I, Fasano A, Sblaterro D, Bradbury A, Marzari R, Barillari G, Ventura A, Not T. Development of a rapid non-invasive test for coeliac disease. *Gut* 2000;47:628-31.
43. Stem M. Comparative evaluation of serologic tests for celiac disease: a European initiative toward standardization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31:513-9.
44. Chirido FG, Rumbo M, Carabajal P, Mavromatopolous E, Castagnino N, Anon MC, Fossati CA. Determination of anti-omegagliadin antibodies in serological tests for coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:508-16.

45. Sblattero D, Berti I, Trevisiol C, Marzari R, Tommasini A, Bradbury A, Fasano A, Ventura A, Not T. Human recombinant tissue transglutaminase ELISA: an innovative diagnostic assay for celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1253-7.
46. Bonamico M, Tiberti C, Picarelli A, Mariani P, Rossi D, Cipolletta E, Greco M, Tola MD, Sabbatella L, Carabba B, Magliocca FM, Strisciuglio P, Di Mario U. Radioimmunoassay to detect antitransglutaminase autoantibodies is the most sensitive and specific screening method for celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2001;96:1536-40.
47. Picarelli A, di Tola M, Sabbatella L, Mastracchio A, Trecca A, Gabrielli Cello T, Anania MC, Torsoli A. Identification of a new coeliac disease subgroup: antiendomysial and anti-transglutaminase antibodies of IgG class in absence of selective 19A deficiency. *J Intern Med* 2001;249:181-8.
48. Salmaso C, Acman A, Pesce G, Altrinetti V, Montagna P, Descalzi D, Martino S, Bagnasco M, Mascart F. Comparison of ELISA for tissue transglutaminase autoantibodies with anti endomysium antibodies in pediatric and adult patients with celiac disease. *Allergy* 2001;56:544-7.

49. West J, Lloyd C, Hill PG, Holmes GK. IgA tissue transglutaminase: validation of a commercial assay for diagnosing coeliac disease. *Clin Lab* 2002;48:241-6.
50. Tesei N, Sugai E, Vazquez H, Smecoul E, Niveloni S, Mazure R, Moreno ML, Gomez JC, Maurino E, Bai JC. Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase may detect coeliac disease patients undiagnosed by endomysial antibodies. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:1415-23.
51. Cataldo F, Marino V, Bottaro G, Ventura A. Celiac disease and selective immunoglobulin A deficiency. *J Pediatr* 1997;131:306-8.
52. Picarelli A, Sabbatella L, Di Tola M, Gabrielli F, Grecco R, Di Cello T, Mastracchio A, Anania MC. Celiac disease diagnosis in misdiagnosed children. *Pediatr Res* 2000;48:590-2.
53. Seah PP, Fry L, Hoffbrand AV, Holborow EJ. Tissue antibodies in dermatitis herpetiformis and adult celiac disease. *Lancet* 1971;i:834-6.
54. Upchurch HF, Conway E, Patterson Jr MK, Birckbichler PJ, Maxwell MD. Localization of cellular transglutaminase on the extracellular matrix after wounding: characteristics of the matrix bound enzyme. *J Cell Physiol* 1991;149:375-82.

55. Binder HJ. A significant step in the celiac puzzle. *Gastroenterology* 1998;114:1339-45.
56. Cançado ELR. Anticorpos de classes IgA e IgG contra componentes da matriz extracelular e dos microfilamentos na doença celíaca. Tese de Livre docência, apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2003;.82p.
57. LeMosy EK, Erickson HP, Beyer WF Jr., Radek JT, Jeong JM, Murthy SN, Lorand L. Visualization of purified fibronectin-transglutaminase complexes. *J Biol Chem* 1992;267:7880-5.
58. León F, Pena RR, Cameron C, Sanchez L, Eiras P, Del Amo A, Bootello A, Roy G. Limitations of anti-guinea pig liver transglutaminase IgA in screening of celiac disease. *Gastroenterology* 2001;120:586-7.
59. Bardella MT, Molteni N, Cesana B, Baldassarri AR, Binanchi PA. IgA anti gliadin antibodies, cellobiose/mannitol sugar test, and carotenemia in the diagnosis of and screening for celiac disease. *Am J Gastroenterol* 1991;86:309-11.
60. Berger R, Schmidt G. Evaluation of six antigliadin antibody assays. *J Immunol Methods* 1996;191:77-86.

61. Corazza GR, Biagi F, Andreani ML, Gasbarrini G. Screening test for coeliac disease. *Lancet* 1997;349:325-6.
62. Dieterich W, Laag E, Schopper H, Volta U, Ferguson A, Gillett H, Riecken EO, Schuppan D. Autoantibodies to tissue transglutaminase as predictors of celiac disease. *Gastroenterology* 1998;115:1317-21.
63. Seissler J, Borns S, Wohlrab U, Morgenthaler NG, Mothes T, Boehm BO, Scherbaum WA. Antibodies to human recombinant tissue transglutaminase measured by radio ligand assay: evidence for high diagnostic sensitivity for celiac disease. *Horm Metab Res* 1999;31:375-9.
64. Troncone R, Maurano F, Rossi M, Micillo M, Greco L, Auricchio R, Salerno G, Salvatore F, Sacchetti L. IgA antibodies to tissue transglutaminase: an effective diagnostic test for celiac disease. *J Pediatr* 1999;134:166-71.
65. Dickey W, McMillan SA, Hughes DF. Sensitivity of serum tissue transglutaminase antibodies for endomysial antibody positive and negative coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:511-4.
66. Dahele AV, Aldhous MC, Humphreys K, Ghosh S. Serum IgA tissue transglutaminase antibodies in coeliac disease and other gastrointestinal diseases. *Q J Med* 2001;94:195-205.

67. Fabiani E, Catassi C. The serum 19A class anti-tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis and follow up of celiac disease. Results of an international multi-centre study. International Working Group on Eu-tTG. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:659-65.
68. Chan A, Butzner RO, McKenna R, Fritzler MJ. Tissue transglutaminase enzyme-linked immunosorbent assay as a screening test for celiac disease in pediatric patients. *Pediatrics* 2001; 107(1):E8.
69. Leon F, Camerero C, R-Pena R, Eiras P, Sanchez L, Baragnao M, Lombardia M, Bootello A, Roy G. Anti-transglutaminase IgA ELISA: clinical potential and drawbacks in celiac disease diagnosis. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:849–53.
70. Wolters V, Vooijs-Moulaert AF, Burger H, Brooimans R, De Schryver J, Rijkers G, Houwen R. Human tissue transglutaminase enzyme linked immunosorbent assay outperforms both guinea pig based tissue transglutaminase and anti-endomysium antibodies when screening for coeliac disease. *Eur J Pediatr* 2002;161:284-7.
71. Carroccio A, Vitale G, Di Prima L, Chifari N, Napoli S, La Russa C, Gulotta G, Aversa MR, Montalto G, Mansueto S, Notarbartolo A. Comparison of anti-transglutaminase ELISAs and an anti-endomysial antibody assay in

- the diagnosis of celiac disease: A prospective Study. *Clin Chem* 2002;48:1546-50.
72. Martini S, Mengozzi G, Aimo G, Pagni R, Sategna-Guidetti C. Diagnostic accuracies for celiac disease of four tissue transglutaminase autoantibody tests using human antigen. *Clin Chem* 2001;47:1722-5.
73. Peracchi M, Trovato C, Longhi M, Gasparin M, Conte D, Tarantino C, Prati D, Bardella MT. Tissue transglutaminase antibodies in patients with end-stage heart failure. *Am J Gastroenterol* 2002;97:2850-4.
74. Rostom A, Dubé C, Cranney A, Saloojee N, Sy R, Garritty C, Sampson M, Zhang L, Yazdi F, Mamaladze V, Pan I, Macneil J, Mack D, Patel D. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology* 2005;128(4) (Suppl 1):S38-S46.
75. Carroccio A, Giannitrapani L, Soresi M, Not T, Iacono G, Di Rosa C, Panfili E, Notarbartolo A, Montalto G. Guinea pig transglutaminase immunolinked assay does not predict coeliac disease in patients with chronic liver disease. *Gut* 2001;49:506-11.

76. Granito A, Muratori P, Cassani F, Pappas G, Muratori L, Agostinelli L, Veronesi R, Bortolotti R, Petrolini N, Bianchi FB, Volta U. Anti-actin IgA antibodies in severe coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 2004;137:386-92.
77. Bottazzo GF, Florin-Christensen A, Fairfax A, Swana G, Doniach D, Groeschel-Stewart U. Classification of smooth muscle autoantibodies detected by immunofluorescence. *J Clin Pathol* 1976;29:403-410.
78. Crowther J R. *Methods in Molecular Biology*. Totowa NJ: Human Press Inc;1995.
79. Turner, P:M. and Lorand, L. Complexation of fibronectin with transglutaminase *Biochemistry* 1989 28:628-35.
80. Lock R J, Pitcher MCL, Unsworth DJ. IgA anti-tissue transglutaminase as a diagnostic marker of gluten sensitive enteropathy. *J Clin Pathol* 1999;52:274-7.
81. Biagi F, Ellis HJ, Yiannakou JY, Brusco G, Swift GL, Smith PM, Corazza GR, Ciclitina PJ. Tissue transglutaminase antibodies in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2187-92.

82. Bizzaro N, Villalta D, Tonutti E, Doria A, Tampoia M, Bassetti D, Tozzoli R. IgA and IgG tissue transglutaminase antibody prevalence and clinical significance in connective tissue diseases, inflammatory bowel disease, and primary biliary cirrhosis. *Dig. Dis and Sci* 2003;48:2360-5.
83. Di Tola M, Sabbatella L, Anania MC, Viscido A, Caprilli R, Pica R, Paoluzi P, Picarelli A. Anti-tissue transglutaminase antibodies in inflammatory bowel disease: new evidence. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:1092-7.
84. Farrace MG, Picarelli A, Di Tola M, Sabbatella L, Marchione OP, Ippolito G, Piacentini M. Presence of anti-tissue transglutaminase antibodies in inflammatory intestinal disease: an apoptosis-associated event? *Cell Death and Differ* 2001;8:767-70.
84. Weiss B, Bujanover Y, Avidan B, Fradkin A, Weintraub I, Shainberg B. Positive tissue transglutaminase antibodies with negative endomysial antibodies: low rate of celiac disease. *Isr Med Assoc J* 2004;6:9-12.
85. Villalta, D, Girolami D, Bidoli E, Bizzaro N, Tampoia M, Liguori M, Pradella M, Tonutti E, Tozzoli R. High prevalence of celiac disease in autoimmune hepatitis detected by anti-tissue transglutaminase autoantibodies. *J Clin Lab Anal* 2005;19:6-10.

86. Sulkanen S, Collin P, Laurila K, Mäki M. IgA- and IgG-class anti-human umbilical cord antibody tests in adult coeliac disease. *Scand J Gastroenterol* 1998;33:251-254.

87. Salmaso C, Ocmant A, Pesce G, Altrinetti V, Montagna P, Descalzi D, Martino S, Bagnasco M, Mascart F. Comparison of ELISA for tissue transglutaminase autoantibodies with antiendomysium in pediatric and adult patients with celiac disease. *Allergy* 2001;56:544-7.

88. Di Domenico MR, Annaluisa S, Pluvio R, Iovine C, Rea F. The role of anti-endomysium and anti-transglutaminase antibodies in the diagnosis and follow-up of celiac disease. *Ped Med Chir* 2002;24:208-12.