

PRIMEIRA DETERMINAÇÃO DE PREVALÊNCIA DE DOENÇA CELÍACA NUMA POPULAÇÃO PORTUGUESA

HENEDINA ANTUNES, ISABEL ABREU, ANA NOGUEIRAS, CARLA SÁ, CARLA GONÇALVES, PRAZERES CLETO, FERNANDO GARCIA, ADELAIDE ALVES, DULCE LEMOS

Consulta de Gastreterologia, Hepatologia e Nutrição. Serviços de Pediatria e de Patologia Clínica. Hospital de São Marcos. Braga. Faculdade de Ciências Médicas/Universidade Nova de Lisboa. Lisboa.

RESUMO

A prevalência de doença celíaca em Portugal é desconhecida. Em populações europeias é de 1:200 a 1:400. A incidência através de casos diagnosticados nas unidades de gastroenterologia pediátrica em Portugal foi de 1: 3648.

Com o objectivo de determinar qual o melhor método actual de rastreio de doença celíaca e a prevalência numa população portuguesa determinamos em 536 soros de adolescentes de ambos os sexos com 14 anos \pm 6 meses das escolas da cidade de Braga: a) a IgA total, b) os anticorpos anti-transglutaminase tecidual, c) os anticorpos anti-endomísio (AAE).

Uma adolescente, com AAE e anti-transglutaminase negativos, tinha doença celíaca conhecida e cumpria a dieta. Onze adolescentes tinham anticorpos anti-transglutaminase positivos e quatro destes adolescentes tinham também AAE positivos. Foi efectuada biopsia jejunal a estes quatro adolescentes. Três apresentaram alterações da mucosa, dois marcada atrofia e um atrofia moderada. Uma adolescente apresentou mucosa normal. A prevalência de doença celíaca foi de 1:134, [intervalo de confiança a 95%, 1:53-1:500]. Conclusão: Presentemente, a avaliação da IgA total conjuntamente com a determinação dos anticorpos anti-transglutaminase tecidual é aparentemente o melhor método de rastreio, porque é menos dispendioso e devido à utilização do método de ELISA, menos dependente do observador.

A prevalência de doença celíaca por nós encontrada, está de acordo com a prevalência recentemente referida em outras populações europeias, pelo que há razões para inferir que a doença celíaca é uma doença sub-diagnosticada em Portugal.

Palavras chave: doença celíaca, prevalência, adolescentes.

SUMMARY

FIRST PREVALENCE OF CELIAC DISEASE IN A PORTUGUESE POPULATION

The prevalence of celiac disease is unknown in Portugal. In European countries the prevalence is between 1: 200 and 1: 400. The incidence obtained through diagnosed cases in the paediatric gastroenterology units in Portugal was 1: 3648.

To determine the best current celiac disease screening method and its prevalence in a portuguese population, 536 sera of teenagers with 14 years \pm 6 months from Braga town schools were tested as follows: a) total IgA, b) anti-tissue transglutaminase antibodies c) anti-endomysium antibodies (AEA).

One female adolescent, with negative AEA and anti-transglutaminase antibodies had a diagnosed celiac disease; this patient was under appropriate diet. Eleven adolescents had positive anti-transglutaminase antibodies and 4 of these had also positive AEA. A jejunal biopsy was carried out on the latter adolescents. Three presented intestinal villous atrophy, 2 a flat mucosa and 1 a moderate atrophy. One female adolescent had a normal mucosa.

The prevalence was 1:134,] confidence interval at 95%, 1:53-1:500 [.

Conclusions: Presently, total IgA with determination of anti-tissue transglutaminase antibodies is apparently the best screening method; it is less expensive test and, given the use of ELISA, less dependent on the observer.

The celiac disease prevalence found in the present study falls within the range of prevalence recently found in other European populations, which implies that the celiac disease is under-diagnosed in Portugal.

Key-words: celiac disease, prevalence, adolescents

INTRODUÇÃO

A Doença Celiaca (DC), pode ser classificada como uma doença auto-imune que se traduz por uma enteropatia que ocorre após contacto com o glúten em indivíduos geneticamente susceptíveis^{1,2}.

A prevalência em populações da Europa varia entre 1:200 a 1:400³.

Estudo de Paulo Ramalho *et al*, publicado em 1990, os únicos dados conhecidos em Portugal, encontraram uma incidência de 1:3648⁴. Esta foi obtida através do número de casos diagnosticados por gastroenterologistas pediátricos portugueses.

O estudo acerca dos mecanismos imunológicos implicados na lesão intestinal nesta doença deu a possibilidade de encontrar marcadores serológicos com sensibilidade, especificidade e preço que permitiram estudos populacionais e assim obter, após biopsia dos indivíduos com serologia positiva, a prevalência desta doença.

Diversos anticorpos (Acs) séricos têm sido descritos associados à DC: Acs Anti-gliadina (AAG), Acs anti-reticulina (AAR), Acs anti-endomísio (AAE) e muito recentemente os Acs anti-transglutaminase tecidual (ATt)⁵.

A pesquisa destes Acs ajuda o diagnóstico e permite seleccionar quais os indivíduos que necessitam de biopsia.

Os AAG muito utilizados no rastreio da DC têm uma sensibilidade e sobretudo uma especificidade limitada para a DC. Estes Acs foram também observados noutras patologias (na artrite reumatóide, hepatites crónicas, na nefropatia por IgA e na doença inflamatória intestinal).

Os AAR foram os primeiros a serem demonstrados na DC, mas a sua sensibilidade é baixa e a sua especificidade é de 40 a 60%, pelo que não podem ser usados

como teste de rastreio⁶.

Os AAE detectados pelo método de Imunofluorescência Indirecta (IFI) são considerados o marcador mais sensível (85-100%) e mais específico (95-100%) para o rastreio da doença⁷.

Em 1997 Dieterich mostrou que os Acs ATt, de isótipo IgA, estão presentes no soro de doentes com DC⁸. A identificação da especificidade antigénica destes Acs tornou possível o desenvolvimento de testes que não estão sujeitos a leituras subjectivas como acontece no método de IFI.

Com o objectivo de tentar determinar o melhor método de rastreio actual para DC e obter a prevalência numa população portuguesa, utilizaram-se, por conveniência, soros de adolescentes, que tinham sido colhidos para estudo da prevalência da anemia por deficiência de ferro, após consentimento por escrito dos pais e concordância do adolescente, nos quais fomos determinar a presença dos ATt pelo método de ELISA e dos AAE pelo método de IFI.

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital de São Marcos e autorizado pela Direcção Regional de Educação de Braga e pelos Conselhos Directivos das Escolas envolvidas.

MATERIAL E MÉTODOS

Efectuamos um estudo nas Escolas de Braga em 1999, com colheita de sangue a 536 adolescentes de ambos os sexos (318 do sexo feminino e 218 do sexo masculino) com idade compreendida entre 14 anos \pm 6 meses. Foi-lhes proposto por escrito participar no estudo e caso concordassem com a colheita de sangue, explicava-se que esta tinha entre outros o objectivo de rastrear anemia por deficiência

de ferro e DC por serem dois rastreios de patologia com tratamento. A proposta incluía 4 alíneas: a) só inquérito anónimo; b) inquérito anónimo e entrevista com exame médico; c) alínea b) mais colheita de sangue ou d) não desejo participar no estudo.

A colheita de sangue foi efectuada para tubo seco em sistema de *vacutainer*.

Os soros dos adolescentes foram congelados em alíquotas para se poderem efectuar determinações em vários tempos, se necessário, sem perda de capacidade imunogénica do soro.

Determinámos a IgA total pelo método de imunoturbodimetria, tendo sido os Acs ATt de isótipo IgA, detectados pelo método de ELISA e os AAE, de isótipo IgA, foram avaliados pelo método de IFI em cortes de congelação de intestino delgado e fígado de Primata (EUROIMMUNE). A diluição dos soros foi de 1:10.

Todas as amostras e controlos foram testados em duplicado.

O tratamento estatístico consistiu no cálculo da prevalência e o respectivo intervalo de confiança a 95% (distribuição binomial).

RESULTADOS

Dos 950 adolescentes contactados através dos pais, 859 desejaram participar no estudo (90,4%). Quarenta e um adolescentes efectuaram apenas o inquérito anónimo (0,5%). Dos 818 que completaram o estudo, 536 adolescentes tinham consentimento e desejaram fazer colheita de sangue (65,5%). As colheitas correspondiam a uma distribuição por sexo de 318 adolescentes do sexo feminino (59,3%), percentagem de distribuição por sexo semelhante à população total de adolescentes que desejaram participar no estudo 859 (59,5% do sexo feminino). A amostra era representativa da população de adolescentes do concelho de Braga.

Uma adolescente, com AAE e ATt negativos, tinha DC conhecida e cumpria a dieta isenta de glúten. Não foram diagnosticadas deficiências de IgA. Onze adolescentes tinham ATt positivos e quatro destes adolescentes tinham também AAE positivos (Quadro). A mediana dos valores de ATt foi de 33,2 UI (máximo: 242,6 UI e mínimo: 20,2 UI). Foi efectuada biopsia jejunal nos quatro adolescentes, após explicação aos pais, adolescentes e médicos assistentes. Três apresentaram alterações da mucosa, dois atrofia total com hipertrofia das criptas e infiltrado linfocitário e um atrofia moderada com hipertrofia das criptas e infiltrado inflamatório linfocitário B, marcado com CD79a (sexo masculino). Uma adolescente assintomática apresentou mucosa normal, sem hipertrofia das criptas e

sem aumento do número de linfócitos, fez também marcação de linfócitos B e T.

Quadro – Serologia para os anticorpos anti-transglutaminase e anti-endomísio em 536 soros de adolescentes com designação do número do inquérito, resultado da biopsia jejunal e sexo do adolescente.

Nº do Inquérito	Anticorpo anti-transglutaminase Método de ELISA (UI)	Anticorpo anti-endomísio (Imunofluorescência ind)	Biopsia	Sexo
26	20.2	Negativo	-	M
42	28.8	Negativo	-	M
86	178.7	Positivo	Normal	F
138	242.6	Positivo	Atrofia moderada	M
158	20.5	Negativo	-	M
207	33.2	Negativo	-	F
351	274.2	Positivo	Mucosa plana	F
390	22.8	Negativo	-	F
600	119.4	Positivo	Mucosa plana	F
672	26.1	Negativo	-	F
744	38.2	Negativo	-	F

Caso 1 – Adolescente de 15 anos, sexo masculino com história de diarreia, com visitas a vários pediatras entre os 3 e os 4 anos, com perda ponderal após o que recuperou. Neste momento, três dejectões/dia. Somatometria: estatura - 181cm 90 < P < 95; peso - 71 Kg 75 < P < 90.

Dois meses após dieta sem glúten referiu desaparecimento de mal-estar abdominal não valorizável pelo adolescente na primeira consulta e diminuição do número de dejectões para uma dejectão/dia. Aumento de 0,89 Kg.

Caso 2 – Adolescente do sexo feminino de 14 anos, seguida por Psiquiatra por depressão reactiva, seguida por Endocrinologista por atraso de crescimento com o diagnóstico de baixa estatura familiar.

Irmã com antecedente de tumor de Wilms. Somatometria: estatura - 114 cm < P3; peso - 36,5 Kg P3. Dois meses após dieta sem glúten melhora da depressão sem terapêutica anti-depressiva. Aumento de 1,5 Kg de peso e 2 cm de estatura.

Caso 3 – Adolescente do sexo feminino de 15 anos com história de atraso de crescimento e diarreia quando criança. Neste momento episódios de mal-estar abdominal. Postura e humor depressivo durante a consulta, sem verbalização. Somatometria: estatura: 161 cm 25 < P < 50; peso: 46,5 Kg 10 < P < 25. Após dois meses de dieta sem glúten aumento de 3,8 Kg e desaparecimento do mal-estar abdominal. Melhora franca do aspecto e humor: *na escola dizem que eu fiquei bonita*.

Das 536 entrevistas com colheita de sangue quatro apresentaram DC comprovada. Três do sexo feminino e um do sexo masculino. A prevalência de doença celíaca foi de 1:134, [intervalo de confiança a 95%, 1:53-1:500].

DISCUSSÃO

É essencial a determinação da prevalência de uma doença para se delinear estratégias de abordagem, recursos a programar e impacto social, económico, legislativo e não só de saúde física ou psíquica.

A DC é uma doença paradigmática em todos estes aspectos. Não só dá graves problemas de saúde que podem implicar a morte, como, com um diagnóstico atempado e uma dieta cumprida parece torna-se uma forma de profilaxia de uma neoplasia rara mas altamente letal, neoplasia que tem vindo a ser fortemente associada a esta doença⁹.

A DC tem, até agora, como tratamento exclusivamente a dieta, mas uma dieta especialmente onerosa sobretudo porque são doentes ainda com pouca força em Portugal em relação a outros países da Europa, e os apoios para este tratamento são poucos e não se criam condições porque se julga ser uma doença rara.

Determinar a prevalência não ajuda só o doente que diagnosticamos, ajuda os já diagnosticados e dado este resultado (1:134), leva a considerar rentável um rastreio quando existe um sintoma, mesmo que este seja isolado, ou doença associada a DC de que estes são alguns exemplos: baixa estatura, distensão abdominal, amenorreia inexplicada, esterilidade¹⁰, abortamentos de repetição, anemia por deficiência de ferro, sobretudo se resistente à terapêutica com ferro¹¹, deficiência de IgA, dermatite herpética e doenças autoimunes como diabetes tipo 1¹² e tireoidite, síndrome de Down, síndrome de Williams, síndrome de Turner¹³, diarreia crónica, aumento ligeiro mas persistente das transaminases¹⁴, e osteopenia precoce.

Para estudar a prevalência numa população tem de haver um método de rastreio sensível para não escaparem casos mas que seja também específico. Especialmente nesta doença em que o diagnóstico tem de ser confirmado por biopsia jejunal, um método agressivo.

Conforme foi referido na introdução, vários Acs foram descritos associados a DC. Sabe-se hoje que alguns destes Acs não contribuem muito para o seu diagnóstico e não devem ser utilizados como testes de rastreio devido a sua baixa sensibilidade e a sua limitada especificidade. É o caso, neste momento já, dos AAG em que a sua determinação depende da técnica utilizada, diferenças na purificação dos antigénios, depende também da idade dos doentes estudados e como já mencionamos aparecem noutras patologias¹⁵. Daí termos aguardado por marcadores

mais sensíveis e mais específicos para se determinar a prevalência da DC na população portuguesa.

Optamos por avaliar os Acs ATt, por ELISA, e os AAE, por IFI. Grupos diferentes demonstraram uma boa correlação entre os Acs ATt com os AAE nos adultos e em crianças^{5,16}. Os nossos resultados, obtidos em adolescentes, mostram também uma boa correlação entre a presença destes dois Acs, pois os quatro doentes com valores elevados de Acs ATt (119.4UI-274.24UI) foram também positivos para os AAE.

No nosso rastreio detectamos mais sete soros positivos, cinco deles com valores fracos positivos (20-30 UI) e dois com valores moderados (33.2 UI e 38.2 UI). Estes soros foram negativos para os AAE.

Como os valores dos soros ATt positivos e AAE negativos, foram baixos comparados com os valores de cerca de 10 vezes superiores observados nos soros dos adolescentes que possuíam ambos os Acs (Quadro) pareceu-nos ético efectuar biopsia apenas nos que tinham os dois Acs positivos e foi assim que actuamos, tanto mais que há que ter em conta a existência de resultados falsos positivos (IgA ATt positivos sem DC) com certos soros que possuem por exemplo Factores Reumatóides elevados ou uma IgG monoclonal, interferências conhecidas das técnicas de ELISA.

Essa atitude invalida um dos nossos objectivos, determinar qual o melhor método de rastreio. Mas os resultados deste estudo com prevalência de 1:134 de DC e nível de positividade tão diferente dos ATt dos casos com os dois anticorpos positivos, em relação ao nível de positividade dos soros só com ATt positivo, e o não ter sido encontrado nenhum soro positivo para AAE sem o ser para o ATt, auxilia-nos, junto com conhecimentos de preços e técnicas a recomendar o rastreio através dos ATt, com AAE só em laboratório de referência.

As biopsias jejunais realizadas nestes quatro adolescentes mostraram a existência de alterações da mucosa em três, dois com marcada atrofia e um com atrofia moderada, e todos os que tinham atrofia da mucosa tinham hipertrofia das criptas¹⁷ e infiltrado linfocitário B, achados anatomopatológicos típicos desta doença, o que uma vez mais vem confirmar a importância destes dois anticorpos no rastreio da DC.

A adolescente com marcadores positivos e biopsia normal, sem hipertrofia das criptas¹⁷ nem infiltrado linfocitário, fez contudo marcação com CD79a para se verificar se os poucos linfócitos eram predominantemente B, o que não se verificou, não havendo portanto alteração da relação de linfócitos nos escassos linfócitos observados. Tem, contudo, de manter vigilância, porque pode vir

a apresentar alterações da mucosa posteriormente, doença celíaca latente.

A dieta só deve ser iniciada quando houver alterações da mucosa, apesar da discussão ainda se estar a efectuar, a maioria dos autores considera que os três critérios descritos são suficientes e não devemos iniciar a dieta em pequenas alterações mais subtis¹⁸. Os Acs ATt e os AAE não foram positivos numa das adolescentes estudadas com DC já conhecida porque cumpria a dieta isenta de glúten.

A determinação da IgA sérica é mandatória para se avaliar a existência ou não, de deficiência em IgA, uma vez que estes dois Acs são de classe IgA.

No nosso estudo não observamos deficiências em IgA e constatamos uma predominância do sexo feminino (3:1) nesta doença, como é esperado, mesmo após corrigirmos para o ligeiro predomínio de soros de adolescentes do sexo feminino, igual predominância encontramos, contudo, na população total tal como já referimos.

Dado que o preço da determinação dos Acs ATt é 2 a 3 vezes inferior ao preço da determinação dos AAE e a sua sensibilidade é de 95-100%⁷, aliada a ser um método menos subjectivo e já utilizado na maioria dos laboratórios portugueses, e também em face dos resultados por nós obtidos como já referimos - não houve nenhum doente com AAE que fosse negativo para ATt e os valores de positividade foram muito diferentes nos positivos para AAE -, o rastreio da DC poderá ser feito começando pela detecção dos Acs ATt e em caso de serem positivos efectuar-se, ou não, a pesquisa dos AAE num laboratório de referência, podendo ser no mesmo soro, uma vez que a técnica de IFI requer uma maior experiência do observador.

Contudo para se efectuar o diagnóstico é ainda necessário recorrer a biópsia do intestino delgado. As alterações características após os dois anos de idade, aliada a esta serologia e resposta terapêutica determinam o diagnóstico da DC, tal como aconteceu em todos os nossos casos¹⁹.

Outros locais de biópsia têm sido propostos como a mucosa rectal²⁰ e oral²¹ mas em provocações e não no diagnóstico.

A prevalência encontrada, porque semelhante à maioria dos mais recentes estudos de populações europeias³, não parece uma prevalência regional mas sim da população portuguesa, contudo não podemos determinar com certeza. Mas para obter a prevalência em Portugal é estatisticamente mais correcto saber a prevalência numa amostra significativa de determinada população portuguesa do que soros avulsos de amostras não representativas de

populações de diversos pontos do país. As diferenças étnicas e antropológicas existentes na Europa, não fazem esquecer os antepassados comuns como esta doença vem reafirmar. Contudo para se obter a prevalência da população portuguesa nesta como noutras doenças tinha-se de ter projectos tipo o projecto MONICA da OMS²², que determinasse um banco de dados nacional, incluindo soros, como outros países já conseguiram e que já foram usados para a prevalência de doença celíaca, como é o caso da França. Esse banco se ficasse aberto a obter prevalências nacionais propostas, por exemplo, pelo Ministério da Saúde ou por Sociedades de reconhecido mérito, por exemplo, a Sociedade Portuguesa de Pediatria, poderíamos depois de estabelecido, facilmente obter prevalências nacionais. Com rigor, não temos entre nós nenhum estudo que realmente nos dê a prevalência portuguesa de qualquer doença dado não termos acesso a esse banco de soros.

O intervalo de confiança (1:53; 1:500) ainda alargado por não termos feito colheita de sangue de propósito para a determinação desta doença, dado ser o primeiro estudo de prevalência de DC numa população portuguesa, será com certeza não só de ajuda para outros trabalhos como dá a validação ética que faltava para terem lugar se se decidir fazer colheitas com esse objectivo.

Agrada-nos também saber responder à pergunta que mais nos fizeram os pais em relação a DC, é frequente, qual é a prevalência? Há algum estudo em população portuguesa? Seria importante, como já o está a fazer a Secção de Gastrenterologia e Nutrição Pediátrica da Sociedade Portuguesa de Pediatria, recolher quantos doentes estão diagnosticados para fazermos uma estimativa do trabalho que ainda precisamos fazer.

CONCLUSÃO

Presentemente, a avaliação da IgA total conjuntamente com a determinação dos anticorpos anti-transglutaminase tecidular é aparentemente o melhor método de rastreio, porque é menos dispendioso e devido à utilização do método de ELISA, menos dependente do observador, e por isso, mais fácil de estar disponível em todo o país. Devendo-se efectuar, caso julguemos necessário, mas só em laboratórios de referência, os anticorpos anti-endomísio nos soros positivos para anticorpos anti-transglutaminase tecidular.

A prevalência de doença celíaca por nós encontrada, está de acordo com a prevalência recentemente referida em outras populações europeias, pelo que há razões para inferir que a doença celíaca é uma doença sub-diagnosticada também em Portugal.

AGRADECIMENTOS

Às Escolas e Colégios de Braga: Maximinos, André Soares, Frei Caetano Brandão, Alberto Sampaio, D. Maria II, Carlos Amarante, Lamações, Nogueira, D. Diogo, Real, Francisco Sanches, Gualtar e Palmeira. Ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São Marcos e ao seu Director, Fernando Pardal.

Agradeço especialmente a participação dos adolescentes e autorização das respectivas famílias.

BIBLIOGRAFIA

1. ILTANEU S, HOLM K, PARTANEN J et al: Increased density of jejunal gammadelta+ T cells in patients having normal mucosa marker of operative autoimmune mechanisms? *Autoimmunity* 1999; 29: 179-87
2. WILLIAMSON D, MARSH MN: Celiac Disease. *Mol Biotechnol* 2002; 22 (3): 293-9
3. COLLIN P, KANKINEN K, MAKI M: Clinical features of celiac disease today. *Dig Dis* 1999; 17(2): 100-6
4. RAMALHO P, DE SOUSA JS, ANTÓNIO AM et al: Incidência da doença celíaca em Portugal Continental e Regiões Autónomas (1979-83). *Rev Port Pediatr* 1990;21:147-49
5. VITORIA JC, ARRIETA A, ARRANZ C et al: Antibodies to gliadin, endomysium, and tissue transglutaminase for the diagnosis of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 29(5): 602-8
6. BOIGE V, BOUHNİK Y, DELCHIER JC et al: Anticorps anti-endomysium et anti-reticuline chez des adults atteints de maladie coeliaque suivis en région parisienne. *Gastroenterol Clin Biol* 1996; 20: 931-37
7. SCOTT H, BRANDTZAEG P: Endomysial auto-antibodies. In Peter J B and Shoenfeld Y. *Autoantibodies Elsevier*, 1996. Amsterdam 237-44
8. DIETERICH W, EHNIS T, BAUER M et al: Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997; 3: 797-801
9. HOLMES GH: Coeliac disease and malignancy. *Dig Liver Dis* 2002; 34(3): 229-37
10. HIN H, FORD F: Coeliac disease and infertility: making the connection and achieving a successful pregnancy. *J Fam Health Care* 2002; 12(4): 94-7
11. MODY RJ, BROWN PI, WECHSLER DS: Refractory iron deficiency anemia as the primary clinical manifestation of celiac disease. *J Pediatr Hematol Oncol* 2003; 25(2): 169-72
12. LAZZAROTTI F, BASSO D, FLEBANI M et al: Celiac disease and type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26(1): 248-9
13. BONAMICO M, PASQUINO AM, MARIANI P et al: Prevalence and clinical Picture of celiac disease in Turner syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(12): 5495-8
14. FARRE C, ESTEVE M, CURCOY A et al: Hypertransaminasemia in pediatric celiac disease patients and its prevalence as diagnosis clue. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(12): 3176-81
15. CATASSI C: Gliadin antibodies. In Peter J B and Shoenfeld Y. *Autoantibodies Elsevier*. Amsterdam 1996; 285-90
16. HUMBEL RL, ANDRÉ C, ESCANDE A et al: Antibodies to tissue transglutaminase in coeliac disease. In Conrad K (Ed) *Pathogenic and diagnostic relevance of autoantibodies*. Pabst Science Publishers. Lengerich 1998
17. DRUT R, RUA EC: The histopathology of pediatric celiac disease: order must prevail out of chaos. *Int J Surg Pathol* 2001; 9(4): 261-4
18. TURSI A, BRANDIMARTE G: The symptomatic and histologic response to a gluten-free diet in patient with borderline enteropathy. *J Clin Gastroenterol* 2003; 36(1): 13-7
19. WALKER-SMITH JA, GUANDALINI S, SCHMITZ J et al: Revised criteria for diagnosis of celiac disease. *Arch Dis Child* 1990; 65: 909-911
20. SALAZAR DE SOUSA J: Rectal gluten challenge and coeliac disease. *Lancet* 1990; 336: 323
21. LAHTEENOJA H, MAKI M, VIANDER M et al: Local challenge of oral mucosa with gliadin in patients with coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 2000; 120(1): 38-45
22. TUNSTALL-PEDOE H: WHO MONICA Project, The World Health Organization Monica Project (MONItoring trends and determinants in CARDiovascular disease): a major international collaboration. *J Clin Epidemiol* 1988; 41: 105-114