

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM
GASTROENTEROLOGIA**

**ANÁLISE DA PRESENÇA DE GLÚTEN EM ALIMENTOS
ROTULADOS COMO LIVRES DE GLÚTEN ATRAVÉS DE
ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO E DE FITAS
IMUNOCROMATOGRÁFICAS**

ÁLVARO MACEDO LAUREANO

PORTO ALEGRE,

2010

ÁLVARO MACEDO LAUREANO

**ANÁLISE DA PRESENÇA DE GLÚTEN EM ALIMENTOS
ROTULADOS COMO LIVRES DE GLÚTEN ATRAVÉS DE
ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO E DE FITAS
IMUNOCROMATOGRÁFICAS**

Orientadora: Prof. Dra. Themis Reverbel da Silveira

A apresentação desta
dissertação é exigência do
Programa de Pós-Graduação:
Ciências em Gastroenterologia,
da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul

Porto Alegre,

2010

L378a Laureano, Álvaro Macedo

Análise da presença de glúten em alimentos rotulados como livres de glúten através de ensaio imunoenzimático e de fitas imunocromatográficas / Álvaro Macedo Laureano ; orient. Themis Reverbel da Silveira. – 2010.

129 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências em Gastroenterologia. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Análise de alimentos 2. Glutens 3. Dieta livre de glúten 4. Técnicas imunoenzimáticas 5. Cromatografia I. Silveira, Themis Reverbel da II. Título.

NLM: QU 60

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Dedico esse trabalho à minha família, especialmente a meus pais por terem me incentivado e ajudado a vencer os obstáculos da caminhada. Principalmente pelo exemplo de vida, sempre me incentivando a correr atrás dos meus ideais. Aos meus irmãos, amigos presentes e confidentes. Foram vocês todos que me fizeram ser quem sou hoje.

*"Los hermanos sean unidos
Porque ésa es la ley primera
Tengan unión verdadera
En cualquier tiempo que sea
Porque si entre ellos pelean
Los devoran los de afuera"*

(José Hernández, em Consejos de Martín Fierro a sus hijos)

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof^a. Dra. **Themis Reverbel da Silveira**, que me deu “régua e compasso” desde a iniciação científica, quando me apresentou a esse mundo chamado pesquisa, pelo qual me apaixonei, até minha pós-graduação, me “resgatando” da campanha e me colocando novamente na bancada, de volta à pesquisa, onde me sinto em casa. Muito obrigado por ter me recebido tão receptivamente em sua casa nos fins-de-semana para a discussão da dissertação. Tenho certeza de que nossa caminhada juntos não para por aqui.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Ursula da Silveira Matte, minha orientadora na iniciação científica, por seguir me auxiliando na dissertação de mestrado de forma objetiva e despretensiosa.

À Dra. Fernanda Oliveira por me alegrar nas horas em que eu não via saída e pelo seu constante estímulo. Ao seu marido, Professor Jarbas de Oliveira, que de forma indireta teve uma enorme contribuição para o bom andamento da minha pesquisa.

À Dra. Sandra Gonçalves Vieira, por ter comentado meu projeto e feito observações importantíssimas que certamente auxiliaram para o crescimento do estudo.

Ao amigo Msc. Rafael Maurer, pelo seu coleguismo e amizade dentro e fora do laboratório.

Ao Dr. Ivan Bustamante, *gracias* pelas discussões científicas, mesmo após o expediente.

À equipe do Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia: Dr. Jorge Luiz dos Santos, pelas conversas do meio da tarde e auxílio na parte artística da dissertação; Gabriela Pedroso e Thaís Hammes, que tornaram os dias bem mais curtos e animados.

À turma de iniciação científica Ariella Cardoso, Patrícia Ponce de Leon e Cleandra Gregório, pela disponibilidade e boa vontade de facilitar e ajudar em nossas atividades de pesquisa.

Ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela estrutura oferecida no Centro de Pesquisa Experimental, bem como à sua equipe de trabalho, da qual nomeio Everaldo de Almeida e Jéferson Beck da Silva, sempre dispostos a ajudar a todos.

Aos financiadores CNPq, FINE e CAPES que deram o aporte para que esse estudo fosse concluído.

Enfim, agradeço a todos que me ajudaram a chegar aqui, seja contribuindo com a pesquisa em si, seja me dando apoio moral nas horas que precisei e mesmo aqueles que, porventura, não acreditaram no projeto, afinal, esses serviram para me estimular a convencê-los do contrário. A todos, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

Introdução: A doença celíaca é uma condição autoimune que afeta cerca de 1% da população geral. Seu único tratamento é a dieta livre do glúten de trigo, centeio e cevada, que deve durar por toda a vida. **Objetivos:** Esse estudo foi desenhado com o intuito de avaliar a presença de glúten por meio de teste imunocromatográfico e de R5-ELISA em alimentos comercializados no Brasil com o rótulo “sem glúten” e para determinar se o método imunocromatográfico é um método confiável e sensível o suficiente para detectar glúten em níveis “seguros” para celíacos. **Materiais e métodos:** Analisamos setenta amostras de alimentos embalados comercializados com o rótulo sem glúten, incluindo farinhas e biscoitos, entre outros. A extração do glúten foi feita por solução de etanol e após analisado por kit R5-ELISA e fitas imunocromatográficas disponíveis comercialmente. **Resultados:** Mais de um quarto das amostras analisadas (28,6) por R5-ELISA apresentaram teor de glúten acima de 5 ppm. Em quase metade dessas (12,9%) foi detectado nível de glúten superior a 20 ppm, o máximo tolerado pelo *Codex Alimentarius* para alimentos naturalmente livres de glúten. O método imunocromatográfico é qualitativo, fornecendo resultados positivos para amostras que tenham 5 ppm de glúten ou mais. 27,1% das amostras apresentaram resultado positivo quando testadas pelas fitas imunocromatográficas. Não encontramos diferença significativa entre os resultados do R5-ELISA iguais ou superiores a 5 ppm de glúten e os positivos para o teste imunocromatográfico (McNemar, $p=1,00$). Ao compararmos o R5-ELISA (≥ 5 ppm de glúten) com o método imunocromatográfico, encontramos uma sensibilidade de 90% e especificidade de 98%, (Kappa=0,89). **Conclusões:** Encontramos glúten em uma alta proporção das amostras utilizando os dois métodos. Nesse estudo também demonstramos que o teste imunocromatográfico bastante sensível para a detecção de glúten em níveis seguros aos portadores de doença celíaca e pode servir como uma alternativa barata e rápida ao R5-ELISA.

Abstract

Objectives: This study was designed to compare the effectiveness of the R5-ELISA and immunochromatographic assays in detecting gluten in Brazilian foods labeled gluten-free and to determine if the immunochromatographic method is a sensitive and reliable method for detecting gluten at levels recommended as safe by the *Codex Alimentarius Commission*. **Materials/Methods:** We analyzed seventy different commercially available foods that were labeled “gluten-free” including several types of flours and snacks. Gluten was extracted by ethanol precipitation and subsequently analyzed using a commercially available immunochromatographic test and R5-ELISA kit. **Results:** More than a quarter of the samples (28.6%) analyzed by ELISA contained levels of gluten greater than 5 ppm. Almost half of these (12.9%) exhibited levels that exceeded 20 ppm, the maximum gluten level recommended by the *Codex Alimentarius* for a naturally gluten free product. The immunochromatographic method is qualitative and returns a positive reading for samples that contain gluten levels greater than 5 ppm. We found 27.1% of the samples tested positive in the immunochromatographic test. There was no statistically significant difference between the results of the ELISA (detection value >5 ppm) and the immunochromatographic test (McNemar test, $p = 1.00$). Comparing the ELISA (>5 ppm) and immunochromatographic test, we obtained 90% sensitivity and 98% specificity (Kappa of 0.89). **Conclusions:** We found gluten in a high proportion of the samples tested using both methods. In this study we also demonstrate that the immunochromatographic method is nearly as sensitive as the ELISA in detecting gluten levels and thus may serve as an inexpensive and rapid alternative to the R5-ELISA screening test.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS.....	14
LISTA DE QUADROS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. O QUE É O GLÚTEN?.....	17
1.2. DOENÇA CELÍACA	21
1.1.1. <i>Uma breve visão histórica</i>	21
1.1.2. <i>Uma visão contemporânea</i>	24
1.3. CONDIÇÕES PATOLÓGICAS ASSOCIADAS	30
1.4. PATOGENIA	34
1.5. DIAGNÓSTICO	38
1.6. TRATAMENTO	43
1.7. DETECÇÃO DE GLÚTEN NOS ALIMENTOS	46
1.7.1. <i>Ensaio Imunoenzimáticos</i>	46
1.7.2. <i>Espectometria de massa</i>	47
1.1.3. <i>Análise de DNA</i>	48
2. JUSTIFICATIVA	49
3. OBJETIVOS	50
3.1. OBJETIVO GERAL.....	50
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1. AMOSTRAS	51
4.2. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO.....	51
4.3. PREPARO DAS AMOSTRAS DE ALIMENTO.....	52
4.4. EXTRAÇÃO	53
4.5. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO LIGADO À ENZIMA (ELISA).....	54
4.6. IMUNOCROMATOGRAFIA.....	56

5. RESULTADOS	59
5.1. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE GLÚTEN EM ALIMENTOS ROTULADOS COMO LIVRES DE GLÚTEN	59
5.2. AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO MÉTODO IMUNOCROMATOGRAFICO EM COMPARAÇÃO COM O MÉTODO R5-ELISA.....	62
5.3. COMPARAÇÃO ENTRE PRODUTOS PROCEDENTES DE SUPERMERCADOS E DE LOJAS ESPECIALIZADAS EM PRODUTOS DIETÉTICOS	64
6. DISCUSSÃO	66
6.1. AMOSTRA ANALISADA	66
6.2. DIETA SEM GLÚTEN E QUALIDADE DE VIDA DOS CELÍACOS.....	68
6.3. COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS R5-ELISA E FITAS IMUNOCROMATOGRAFICAS	70
6.4. COMPARATIVO ENTRE AS AMOSTRAS OBTIDAS EM SUPERMERCADOS E EM LOJAS ESPECIALIZADAS EM PRODUTOS DIETÉTICOS	72
6.5. EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO TÓXICA E FATOR DE CORREÇÃO.....	73
6.6. ALIMENTOS COM O RÓTULO “CONTÉM GLÚTEN”: QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA	74
6.7. QUAL O VALOR DE GLÚTEN CONSIDERADO “ACEITÁVEL” PARA OS CELÍACOS?	76
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
7.1. PROGRESSOS NA DOENÇA CELÍACA	80
7.2. PERSPECTIVAS.....	83
8. CONCLUSÕES	85
7. BIBLIOGRAFIA	86
ANEXOS.....	102
8.1. ANEXO A – AMOSTRA DISCRIMINADA.....	103
8.2. SUBMISSION ACKNOWLEDGEMENT	106
8.3. ARTIGO	107

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Representação da forma que o glúten se apresenta no endosperma do glúten do trigo. 18
- Figura 2: Esquema de classificação das gramíneas, demonstrando a diferença da aveia (em verde) e dos cereais tóxicos aos celíacos (em azul) quanto à suas tribos. 21
- Figura 3: Diagrama da história da doença celíaca. 24
- Figura 4: O “iceberg” da doença celíaca, demonstrando a variabilidade de apresentação da doença, onde a ponta emersa representa as formas sintomáticas, mais comumente diagnosticadas, clássica e atípica. Os indivíduos normais aqui citados são aqueles que apresentam os genes HLA DQ2/DQ8, sem alterações na mucosa nem marcadores sorológicos indicativos de doença celíaca. 26
- Figura 5: Mecanismo de dano da mucosa na doença celíaca (Di Sabatino e Corazza). Os três mecanismos pelos quais o glúten pode ser transportado através do epitélio intestinal são a via paracelular (em azul) como consequência do comprometimento da integridade da mucosa pelo aumento da liberação de zonulina, via transcitose (em verde), ou por retrotranscitose, ligado a moléculas de IgA secretadas (sIgA), através do receptor de transferrina CD71 (em vermelho). A deamidação e ligação do glúten à transglutaminase tecidual (tTG) (painel rosa) reforça a apresentação de peptídeos de glúten pelas células dendríticas HLA-DQ2/-DQ8 às células T CD4+. Estas, por sua vez, quando ativadas produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias induzindo uma padrão de resposta de células T-helper tipo 1 (Th-1), dominada pelo Interferon-gama (IFN- γ). Citocinas Th-1 promovem efeitos inflamatórios incluindo secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs) por fibroblastos ou por células mononucleares da lâmina própria (LPMC). Essas MMPs são responsáveis pela degradação da membrana basal e matriz extracelular e aumento da citotoxicidade de linfócitos intra-epiteliais (IELs) e células T "natural killer" (NK). Estes últimos facilitam a morte celular dos enterócitos por apoptose pelo sistema Fas / Fas Ligante (FasL), ou pelas rotas perforin-granzima induzida por interleucina-15 (IL-15). O Interferon-alfa (IFN- α), liberado pelas células dendríticas ativadas perpetua a reação inflamatória pela indução da produção de IFN- γ pelas células T CD4+. Além disso, através da produção de citocinas Th-2, as células T CD4+ ativadas estimulam a ativação e expansão clonal de células B, que diferenciam em plasmócitos e produzem anticorpos anti gliadina e anti-tTG. Pela interação com a tTG extracelular ligada à membrana (mtTG), os depósitos de autoanticorpo tTG da região de membrana basal podem induzir alterações do citoesqueleto do enterócito com a redistribuição de actina e consequente dano epitelial. 37
- Figura 6: Espectro de má-absorção e sintomas na doença celíaca. A magnitude da má-absorção e sintomas em pacientes com doença celíaca é frequentemente correlacionada com a extensão da lesão na mucosa intestinal. 42
- Figura 7: Representação esquemática do preparo dos alimentos 53

Figura 8: Representação esquemática do processo de extração de glúten das amostras.	54
Figura 9: Interpretação de resultados das fitas imunocromatográficas. Em caso de resultado positivo a banda azul (controle da reação – C) e a banda vermelha (teste – T) são vistas. Para resultados negativos somente a banda controle é vista. Caso não apareça a banda C o resultado é inválido.....	57
Figura 10: Representação gráfica dos procedimentos para a realização dos testes de R5-ELISA e imunocromatografia. Observando a figura é possível comparar a praticidade do teste imunocromatográfico em comparação ao R5-ELISA, tanto no que se refere ao número de passos a serem realizados, quanto ao tempo necessário à execução.	58
Figura 11: Avaliação do glúten, em ppm, pelo método ELISA baseado no cálculo sugerido pelo fabricante e pelo proposto por Wieser e Koehler (2009). Foi excluída uma amostra (nº 11) com valor superior a 200 ppm para uma melhor visualização do gráfico.	61
Figura 12: Valor em ppm de glúten das amostras analisadas por R5-ELISA. São mostrados valores utilizando os fatores de correção 2 e 1,3 (ver texto). Para melhor visualização foi excluída a amostra número 11 por apresentar valores acima de 200 ppm de glúten. Em destaque as linhas com os valores de 5 e 20 ppm de glúten.	62
Figura 13: Representação esquemática do efeito prozona, à esquerda a o excesso de anticorpos impede a formação adequada do “sanduíche” entre anticorpo de captura+antígeno+anticorpo marcado. À direita, quando fase líquida é dispensada, vários antígenos ligados a anticorpos marcados são descartados junto. Dessa forma a leitura de concentração resulta em valores menores do que os reais.....	75
Figura 14: Disfunção da barreira intestinal: à esquerda uma mucosa normal, à direita, uma mucosa rompida por ação da Zonulina, permitindo a entrada de antígeno, o que desencadeia uma reação imunológica.	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Prevalência de doença celíaca em diferentes grupos populacionais no Brasil.....	30
Tabela 2: Condições patológicas associadas à doença celíaca e porcentagem aproximada de portadores entre essas populações.....	32
Tabela 3: Sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos usados para diagnóstico da doença celíaca.....	39
Tabela 4: Apresentação dos valores obtidos nas amostras por R5-ELISA e os resultados do teste imunocromatográfico.....	60
Tabela 5: Comparação entre os métodos.....	64
Tabela 6: comparativo da presença de glúten nas amostras rotuladas como livres de glúten adquiridas em supermercados e em lojas especializadas em produtos dietéticos.....	65
Tabela 7: diluição das amostras de acordo com o conteúdo esperado de glúten.....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação de Marsh das lesões duodenais	42
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AGA – antigliadina.

DC - Doença celíaca

DSG - Dieta sem glúten

EMA – anticorpo antiendomísio

ESPGHAN - Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição

HLA – Antígeno Leucocitário Humano

IgA – imunoglobulina A

IgA-AGA – Imunoglobulina A Antigliadina

IgG – Imunoglobulina G

LIEs- Linfócitos intraepiteliais

MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal

PSQQ - Prolina-Serina-Glutamina-Glutamina

Q-PCR - Reação em cadeia de polimerase quantitativa

QQQP - Glutamina-Glutamina-Glutamina-Prolina

R5-ELISA - Ensaio Imunoenzimático baseado em anticorpo R5

RIA – Radioimunoensaio

tTGA – anticorpo antitransglutaminase tecidual

tTGgp – tTGA com substrato de cobaia

tTGh – tTGA com substrato humano

1. INTRODUÇÃO

1.1. O que é o Glúten?

De acordo com Wieser, o termo “Glúten” refere-se à massa formada por um complexo protéico que permanece quando a farinha de trigo é lavada removendo o amido e outros constituintes solúveis em água (Wieser, 2007). Tal complexo é composto por gliadinas e gluteninas, proteínas que são encontradas em proporções similares na maioria das variedades de trigo (Valdés, Garcia, Llorente *et al.*, 2003; Hischenhuber, Crevel, Jarry *et al.*, 2006) A função dessas moléculas é agir como proteína de armazenamento (figura 1), para fornecer nitrogênio ao embrião durante a germinação do grão (Wieser, 1995). Na panificação, essas moléculas têm grande valor devido à sua elasticidade e extensibilidade. Ao assar a massa o CO₂ expande as colunas de glúten e este, ao se fundir, forma um esqueleto com um miolo elástico, distribuído homogeneamente (Salinas, 2002). As gliadinas pertencem a uma categoria de proteínas chamadas de prolaminas e as gluteninas, à das glutelinas (Shewry, Halford, Belton *et al.*, 2002; van den Broeck, America, Smulders *et al.*, 2009).

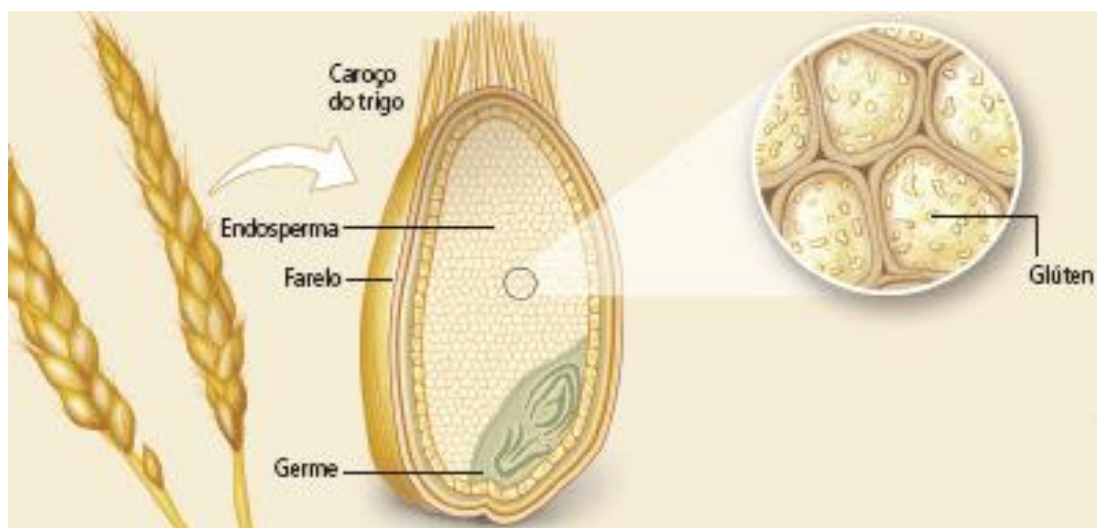


Figura 1: Representação da forma que o glúten se apresenta no endosperma do glúten do trigo. Fonte: (Fasano, 2009)

Embora “glúten” seja estritamente relacionado ao trigo, este termo é frequentemente usado em referência à combinação de prolaminas e glutelinas que ocorre em outros grãos, inclusive aqueles que não são tóxicos aos celíacos como o glúten do arroz e glúten do milho (Kasarda, 2005). Em relação à doença celíaca (DC), esse termo é usado para definir as proteínas desencadeadoras da doença – glúten do trigo, glúten do centeio e glúten da cevada (Jabri, Kasarda e Green, 2005).

As frações prolamina: gliadina, hordeína e secalina – do trigo, cevada e centeio, respectivamente –, têm uma sequência de aminoácidos similar, tóxica aos celíacos. As proteínas lesivas são ricas em prolina e glutamina, especialmente aquelas com as sequências de aminoácidos Prolina-Serina-Glutamina-Glutamina e Glutamina-Glutamina-Glutamina-Prolina (PSQQ e QQQP). O alto conteúdo de prolinas faz com que essas proteínas sejam resistentes à digestão proteolítica pelas enzimas digestivas (Wieser e Koehler, 2008). Não sendo suficientemente digerido o glúten transpõe a barreira intestinal e desencadeia a resposta imune. Fragmentos de α -gliadina (resíduos 56-88) contêm vários epítomos imunodominantes nas células T

(resistentes à degradação das enzimas digestivas) (Shan, Molberg, Parrot *et al.*, 2002).

Não há consenso se a aveia também é tóxica para os celíacos. Estudos *in vivo* afirmam que é seguro o consumo de pequenas quantidades de aveia pura e não contaminada com glúten. Por exemplo, um estudo finlandês testou 92 pacientes adultos com DC, para os quais foi randomizada uma dieta sem glute (DSG) ou uma similar contendo aveia. Os 45 que ingeriram aveia por 6 a 12 meses não tiveram a mucosa intestinal afetada nem apresentaram atraso na normalização dos testes sorológicos (Janatuinen, Pikkarainen, Kempainen *et al.*, 1995). Cinco anos depois os pacientes foram reavaliados, e dos 35 pacientes re-analisados, 23 ainda consumiam aveia. Não foi encontrada diferença significativa entre os resultados séricos e histológicos do grupo com aveia em comparação ao controle (Janatuinen, Kempainen, Julkunen *et al.*, 2002). Na Suécia, foi feito um estudo duplo-cego com 116 crianças celíacas divididas em dois grupos: um com DSG padrão, outro com a mesma dieta com adição de aveia. Nenhum dos pacientes que concluiu o estudo apresentou sinais de toxicidade (Högberg, Laurin, Fälth-Magnusson *et al.*, 2004). Vale salientar que em ambos os estudos houve significativa desistência de pacientes, o que interfere na análise dos resultados.

Contudo, é importante ressaltar que os epítomos da secalina, hordeína e gliadina, que ativam a resposta imune em celíacos, também foram encontrados na avenina, proveniente da aveia (Vader, Stepniak, Bunnik *et al.*, 2003). Em um estudo da Noruega, 19 adultos celíacos receberam aveia na sua dieta por 12 semanas. A maioria dos pacientes tolerou bem a dieta, porém, um apresentou atrofia vilositária e dermatite, só obtendo melhora com uma dieta sem aveia (Lundin, Nilsen, Scott *et al.*,

2003). Um seguimento desse estudo encontrou mais dois pacientes que apresentaram resposta imune à aveia (Arentz-Hansen, Fleckenstein, Molberg *et al.*, 2004). Nesses estudos foram encontradas células T reativas a peptídeos de aveia, com especificidade a epítomos similares aos do trigo, porém não idênticos (Ciclitira, Ellis e Lundin, 2005). Estudos *in vitro* realizados por Silano *et al.*, demonstraram resposta imunogênica a determinadas variedades de aveia (Lampton, Astra, Ava e Nave) (Silano, Dessi, De Vincenzi *et al.*, 2007; Silano, Di Benedetto, Maialetti *et al.*, 2007). Alguns estudos sugerem que, embora a aveia apresente reatividade com as células T, ela não ativa lesão de mucosa na maioria dos pacientes (Kilmartin, Wieser, Abuzakouk *et al.*, 2006).

Outro aspecto a considerar relacionado à toxicidade da aveia para os celíacos é a eventual contaminação da aveia por glúten. Em estudo recentemente publicado, Hernando *et al.*, utilizando técnicas de R5-ELISA (Ensaio Imunoenzimático baseado em anticorpo R5) e Q-PCR (Reação em cadeia de polimerase quantitativa), demonstraram que a maioria das amostras de aveia estava contaminada com trigo, centeio e cevada (Hernando, Mujico, Mena *et al.*, 2008).

Vale salientar que a classificação taxonômica foi demonstrada como sendo uma boa ferramenta para guiar a classificação de alimentos em seguros e não seguros para celíacos. Os grãos comprovadamente tóxicos são pertencentes à tribo *Triticeae*. A aveia não pertence à tribo *Triticeae*, e sim à *Avenae*. Cereais não tóxicos, como arroz, milho e sorgo são mais distantes da *Triticeae* (Wieser e Koehler, 2008) (vide figura 2).

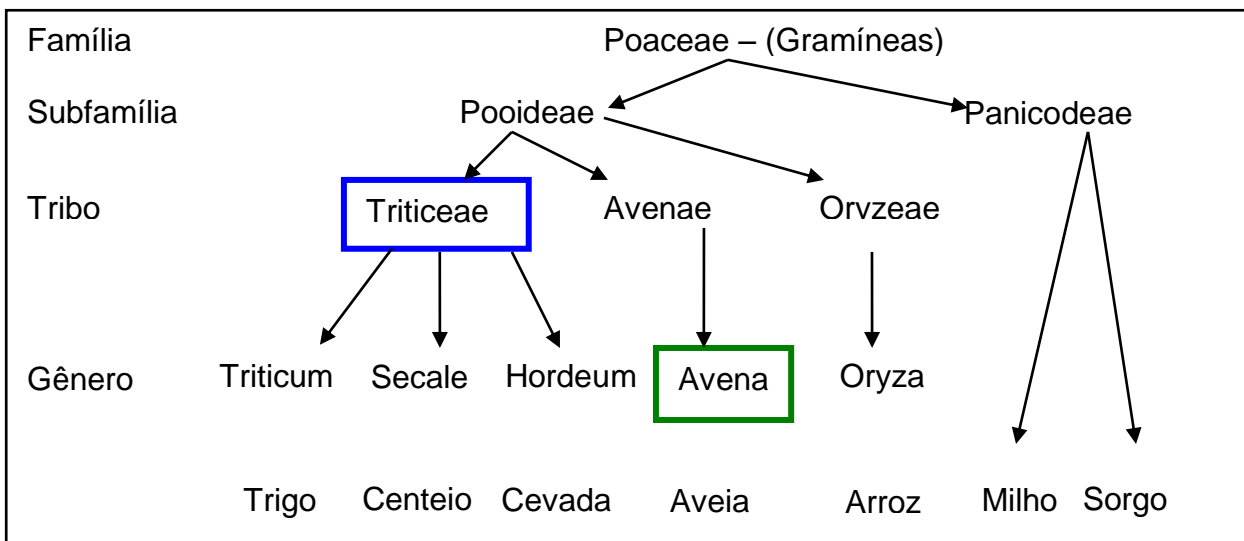


Figura 2: Esquema de classificação das gramíneas, demonstrando a diferença da aveia (em verde) e dos cereais tóxicos aos celíacos (em azul) quanto à suas tribos.

1.2. Doença Celíaca

1.1.1. Uma breve visão histórica

Fontes: (Guandalini, 2008; Losowsky, 2008)

Com a revolução agropastoril do período Neolítico, há cerca de dez mil anos, os seres humanos mudaram seus hábitos alimentares, passando a consumir alimentos com antígenos completamente novos aos seus organismos, como proteína do leite, ovos e cereais. Nem todos os indivíduos se adaptaram a essa mudança, surgindo as intolerâncias alimentares e, provavelmente, a DC.

Atribui-se a Aretaeus da Capadócia, que viveu no século 2 D.C., a descrição de uma síndrome de má-absorção com diarreia crônica. Aos portadores, ele denominou *koiliakos* (do grego *koelia* – abdômen). Somente em 1887 Samuel Gee apresentou o conceito moderno desta síndrome, bem como sugeriu que a enfermidade fosse associada à dieta.

Em 1924 Sidney Haas descreveu seu sucesso no tratamento de crianças celíacas com dieta de banana, que se tornou por muito tempo o único tratamento

para a DC. O pediatra holandês Dicke notou que durante a escassez de pão causada pela segunda guerra seus pacientes mostraram significativa melhora da DC, também percebeu que quando as tropas aliadas distribuíram pães aqueles pacientes pioraram. Alguns anos depois, em 1953, Dicke, Weijers e van de Kamer mostraram que a exclusão do trigo, centeio, cevada e aveia da dieta dos celíacos acarretava significativa melhora na DC. Assim, atribuiu-se importância ao glúten desses cereais.

Com a descoberta do papel do glúten na DC, os pesquisadores começaram a pesquisar como essa proteína poderia causar tal doença. Inicialmente foi sugerido que a falta ou deficiência na atividade de uma enzima provocaria digestão inadequada do glúten e, por consequência, produziria fragmentos tóxicos. Tal teoria perdurou até o início da década de 1990, quando começou a se reconhecer a base imunológica da DC. Houve, em 1997, comprovação pela identificação da enzima transglutaminase tecidual como sendo autoantígeno, descoberta feita por um grupo da Alemanha, liderado por Dieterich (Dieterich, Ehnis, Bauer *et al.*, 1997).

Anormalidades do intestino delgado já haviam sido descritas em autópsias no fim do século 19, porém foram desconsideradas por serem vistas como consequências da autólise pós-morte. Mas, em 1954, Paulley descreve essas anormalidades em amostras obtidas por cirurgia. A obtenção de amostras duodenais por biópsia, em 1955 por uma equipe argentina, liderada por Marcelo Royer e, em 1956, por Margot Shiner da Inglaterra, possibilitou o estudo da histopatologia intestinal *in vivo*. A cápsula de Crosby-Kugler, desenvolvida em 1957, foi uma otimização dos métodos anteriores e permitiu que fosse feita a associação da DC com o dano na mucosa intestinal.

No Brasil, a biópsia perioral foi introduzida em 1957 no serviço de gastroenterologia do Hospital das Clínicas de São Paulo (Campos, 1970).

A patogênese da DC começou a ser estudada mais a fundo nos anos 60 com o conhecimento da relação entre o glúten e a DC, as lesões da mucosa e a facilidade para obter biópsias intestinais. Com essas informações a DC começou a ser diferenciada de outras causas de diarreia crônica com base nas lesões intestinais. Essas lesões, no entanto, também podem ser ocasionadas por outras causas, tais como infecções intestinais crônicas, alergia a proteínas animais e imunodeficiências. Para diferenciar a DC das demais causas de atrofia vilositária era necessário provar que o glúten era o causador da condição, dessa forma o glúten era retirado da dieta até a remissão das lesões e, posteriormente, reintroduzido para testar a recorrência das mesmas.

Os critérios diagnósticos propostos pela Sociedade Européia de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição (ESPGHAN) em 1970 foram usados até o fim da década de 1980 (Meeuwisse, 1970). Esses critérios exigiam a realização de três biópsias e englobavam:

- sintomas de má absorção intestinal;
- mucosa jejunal com aspecto celíaco – vilosidades achatadas, hiperplasia de criptas e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário de submucosa;
- remissão clínica e histológica após dieta sem glúten;
- recorrências clínica e histológica na reintrodução do glúten.

Nos anos 80, foi demonstrado que o uso de um teste sorológico aliado a uma única biópsia era capaz de diagnosticar 95% dos casos de DC. Tal achado acarretou novos critérios diagnósticos adotados pela ESPGHAN, passando a considerar indispensável o achado de anormalidades histológicas em, no mínimo, um espécime de biópsia, associado à sorologia (anticorpos IgA antigliadina, antireticulina e antiendomísio) positiva. No acompanhamento dos pacientes, após início da DSG, deveria ocorrer a normalização da sorologia e progressiva melhora clínica. Os achados sorológicos isoladamente não serviriam como diagnóstico, mas sim, como apoio para tal (Walker-Smith, Guandalini, Schmitz *et al.*, 1990). A figura 3 é uma representação esquemática da história dos principais aspectos da história da DC.

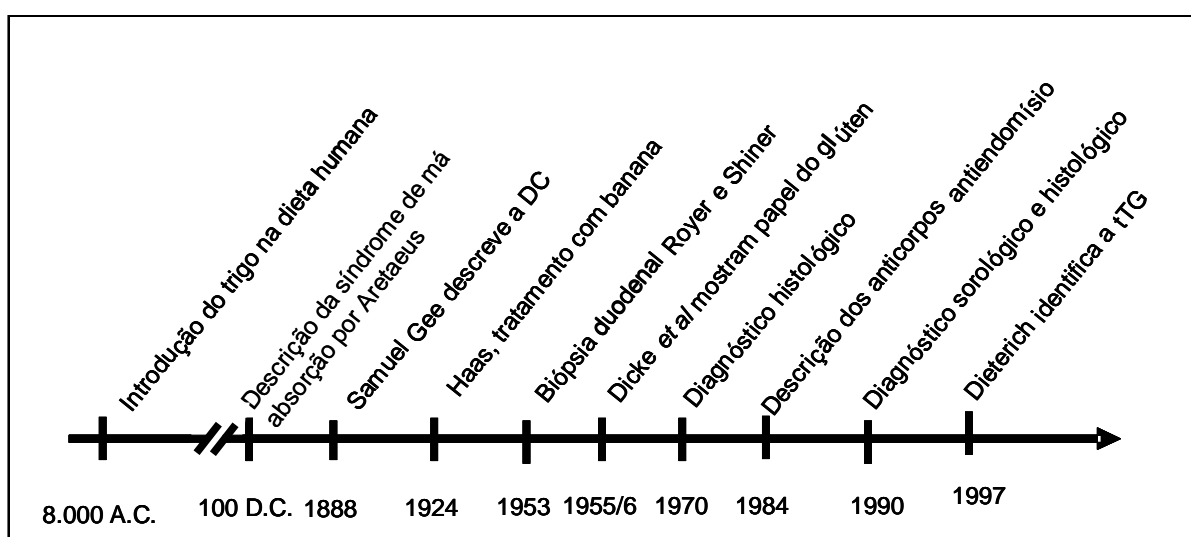


Figura 3: Diagrama da história da doença celíaca.

Não obedece escala. tTG = transglutaminase tecidual. Adaptado de (Guandalini, 2008)

1.1.2. Uma visão contemporânea

A DC é uma enteropatia autoimune desencadeada em indivíduos geneticamente suscetíveis pela ingestão de proteínas do trigo, centeio e cevada (Di Sabatino e Corazza, 2009).

Os sintomas e manifestações clínicas da DC são muito variáveis entre os indivíduos afetados (Peña, Garrote e Crusius, 1998; Dewar, Pereira e Ciclitira, 2004). A grande diferença na percepção da doença é conhecida como o “iceberg” da DC (figura 4). A ponta do *iceberg* representa a minoria das pessoas que apresentam os sintomas da DC, o restante do *iceberg* é representado pelas formas assintomáticas, silenciosa e latente, e pelos indivíduos com os marcadores de predisposição genética. Se considerarmos a taxa de prevalência média de 1% de portadores de DC no nosso país, a população estimada é de 1,9 milhões de pessoas. No Reino Unido, a estimativa é de que somente um em cada oito casos é identificado.

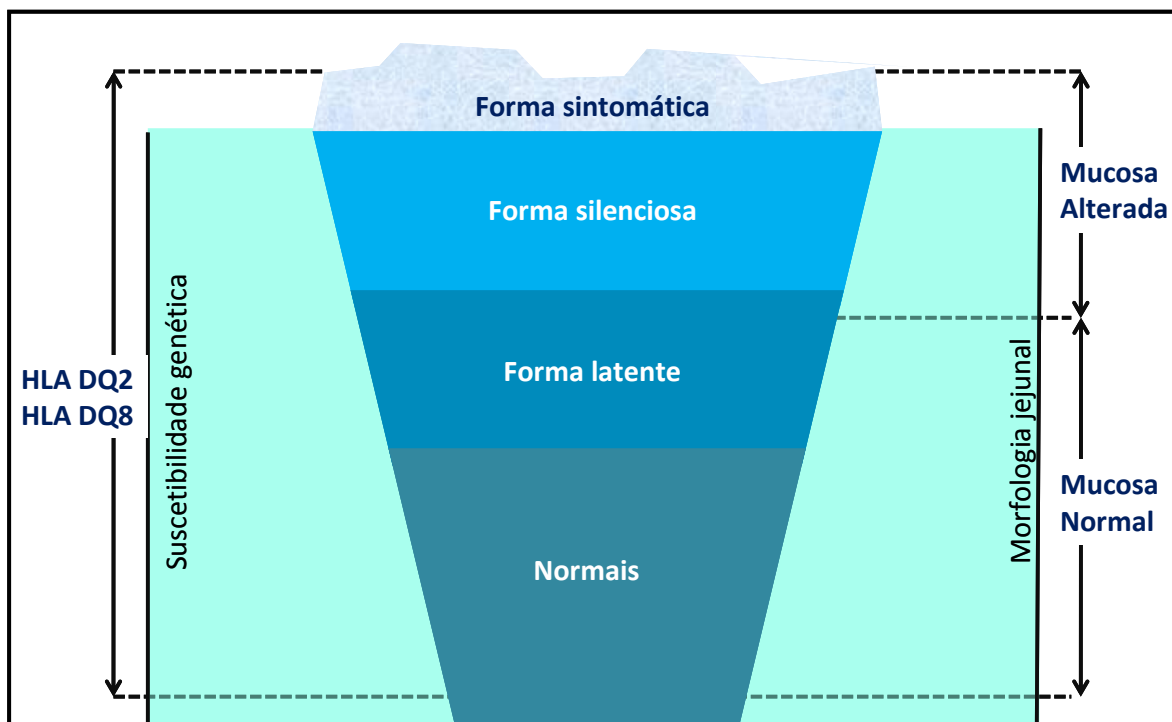


Figura 4: O “iceberg” da doença celíaca, demonstrando a variabilidade de apresentação da doença, onde a ponta emersa representa as formas sintomáticas, mais comumente diagnosticadas, clássica e atípica. Os indivíduos normais aqui citados são aqueles que apresentam os genes HLA DQ2/DQ8, sem alterações na mucosa nem marcadores sorológicos indicativos de doença celíaca.

Fonte: modificado de: (Maki, Mustalahti, Kokkonen et al., 2003) por Dr. Jorge Luís dos Santos.

Classificação da doença celíaca de acordo com a Associação Americana de Gastroenterologia (Rostom, Murray e Kagnoff, 2006):

- **Clássica:** é a mais frequentemente descrita. É marcada por pacientes com apresentação de sintomas e sequelas de má absorção intestinal, que têm atrofia vilositária induzida por glúten e outras manifestações histológicas clássicas
- **Atípica:** é a forma mais comum de DC, apesar do nome. Esses pacientes geralmente têm pouco ou nenhum sintoma gastrointestinal e chegam ao médico por outro motivo, como deficiência de ferro, osteoporose, baixa estatura, infertilidade. Esses pacientes, em geral, têm atrofia vilositária induzida pelo

glúten. Por serem esses pacientes assintomáticos do ponto de vista gastrointestinal, um grande número permanece não diagnosticado.

- **Silenciosa:** refere-se aos pacientes assintomáticos nos quais a atrofia vilositária induzida pelo glúten é descoberta. A identificação desses pacientes geralmente ocorre em estudos de rastreamento populacional ou em pacientes que fizeram endoscopia ou biópsia por outra razão. Esses pacientes são clinicamente silenciosos, uma vez que não apresentam sintomas gastrointestinais claros ou características associadas à DC, como osteoporose e deficiência de ferro.
- **Forma latente:** é apresentada por pacientes celíacos que exibiam atrofia vilositária e tiveram remissão com a DSG e mantêm a mucosa normal ou com um pequeno aumento de linfócitos intraepiteliais mesmo em uma dieta com glúten. Outra possibilidade de apresentação dessa forma é em pacientes que fizeram biópsia jejunal por qualquer outra causa e apresentaram mucosa normal e, posteriormente, desenvolvam a DC.
- **Forma refratária:** essa forma é definida pela ausência de resposta à DSG. Alguns desses pacientes desenvolvem complicações, tais como: jejuno-ileíte ulcerativa e enteropatia associada a linfoma de células T. Essa forma é classificada em dois tipos, ambos com inflamação crônica do intestino delgado, similar à DC não tratada, porém a inflamação ocorre mesmo na ausência do glúten (Rostom, Murray *et al.*, 2006). A causa do caráter refratário da doença ainda não está bem definida, de acordo com Di Sabatino e Corazza, poderia estar relacionada ao não cumprimento da DSG ou ingestão de glúten não intencional (Di Sabatino e Corazza, 2009). A frequência dessa forma é

desconhecida, a estimativa foi apresentada por uma coorte do Reino Unido acompanhada entre 1978 e 2005, com uma prevalência de 0,7% (West, 2009). De acordo com Rubio-Tapia *et al* e Al-Toma *et al*, aproximadamente 5% dos pacientes com DC podem desenvolver essa forma da doença (Al-toma, Verbeek, Hadithi *et al.*, 2007; Rubio-Tapia, Kelly, Lahr *et al.*, 2009).

Em alguns indivíduos a DC se manifesta apenas na idade adulta. Segundo van Heel e West esse fato pode ser atribuído a alterações tardias no controle imunológico (van Heel e West, 2006). A condição primordial para desencadear a DC é o contato com as proteínas dos cereais tóxicos. Sabe-se que há diferentes modalidades de introdução do glúten na alimentação humana, principalmente relacionadas a aspectos culturais: o tempo de aleitamento materno exclusivo, a idade na qual as diferentes farinhas são introduzidas na alimentação das crianças e as diversas variedades existentes de fontes de glúten. Essas circunstâncias têm enorme influência nos dados epidemiológicos (sobretudo na frequência da doença) e nas características clínicas manifestas da DC (Di Sabatino e Corazza, 2009). Infecção com vírus enteropáticos e alterações da flora bacteriana intestinal também apresentaram correlação com o desenvolvimento da DC (Plot e Amital, 2009).

A DC atualmente é aceita como a condição geneticamente predeterminada mais comum no Ocidente, atingindo cerca de 1% da população, com variação entre as diferentes etnias (Di Sabatino e Corazza, 2009; Nusier, Brodtkorb, Rein *et al.*, 2010). Quando são analisados grupos especiais, como pacientes com síndrome de Down e com Diabete Melito tipo 1, verifica-se que a proporção de DC nesses indivíduos é bem maior (em torno de 10%) (Rodrigo, Garrote e Vivas, 2008). Nisihara, Kotze, Utiyama *et al* demonstraram, em 71 pacientes provenientes de

Curitiba, 5,6% de prevalência entre portadores de Síndrome de Down (Nisihara, Kotze, Utiyama *et al.*, 2005). Foi descrita, em Salvador, uma frequência de DC de 1.7% entre pacientes pediátricos portadores de Diabete Melito tipo 1 (Diniz-Santos, Adan, Andrade *et al.*, 2009).

No Brasil, foram mostradas, de uma maneira geral, prevalências que vão desde 1:56 em pacientes pediátricos hospitalizados (Trevisiol, Brandt, Silva *et al.*, 2004; Brandt e Silva, 2008) a 1:681 em doadores de sangue (Gandolfi, Pratesi, Cordoba *et al.*, 2000) (tabela 1). Um dos fatores que influencia fortemente os resultados de prevalência é o método diagnóstico utilizado. Observamos que todos foram analisados por exames de sorologia. Apenas no estudo de Crovella *et al.*, foi utilizado a análise genética do perfil HLA. Dos sete estudos, quatro foram feitos com doadores de sangue, que sabidamente são, em sua maioria, homens, como a DC se apresenta mais no sexo feminino - a uma razão de 2:1 a 3:1 (Tack, Verbeek, Schreurs *et al.*, 2010) -, essa amostra não reflete fidedignamente a população geral. O estudo apresentado por Brandt e Silva, que mostrou uma prevalência de 1:52, foi feito em crianças hospitalizadas, sem queixas digestivas, porém, como já apresentamos, a DC não ocasiona apenas distúrbios digestivos. Com base nessas informações, não se pode afirmar que a prevalência da DC na população brasileira seja realmente conhecida. No Rio Grande do Sul, a prevalência da DC ainda é desconhecida.

Tabela 1: Prevalência de doença celíaca em diferentes grupos populacionais no Brasil

Prevalência	População estudada (n)	Local	Método	Referência
1:52	Pediátrica hospitalar (1080)	Recife	IgA's para EMA, tTGgp e tTGh, todos positivos	(Brandt e Silva, 2008)
1:119	adultos jovens ambulatoriais (1074)	Olinda	IgA tTGh, perfil HLA-DQ2 e HLA-DQ8, confirmados por histologia	(Crovella, Brandao, Guimaraes <i>et al.</i> , 2007)
1:214	Doadores de sangue (3000)	São Paulo	IgA tTGh e confirmação por histologia	(Oliveira, Sdepanian, Barreto <i>et al.</i> , 2007)
1:273	Doadores de sangue (3000)	Ribeirão Preto	IgA's para tTGh e EMA, com biópsia confirmatória	(Melo, Fernandes, Peres <i>et al.</i> , 2006)
1:276	Ambulatorial (4405)	Brasília	IgA EMA, IgG AGA e confirmados por histologia	(Pratesi, Gandolfi, Garcia <i>et al.</i> , 2003)
1:417	Doadores de sangue (2086)	Curitiba	IgA's tTGgp e EMA com confirmação histológica	(Pereira, Ortiz-Agostinho, Nishitokukado <i>et al.</i> , 2006)
1:681	Doadores de sangue (2045)	Brasília	IgG AGA, IgA AGA e IgA EMA, com confirmação histológica	(Gandolfi, Pratesi <i>et al.</i> , 2000)

Legenda: IgA – imunoglobulina A; EMA – anticorpo antiendomísio; tTGA – anticorpo antitransglutaminase tecidual; tTGgp – tTGA com substrato de cabaia; tTGh – tTGA com substrato humano; IgG – Imunoglobulina G; AGA – antigliadina.

1.3. Condições patológicas associadas

A DC é uma enfermidade que afeta vários sistemas. São observados, por exemplo, com grande frequência, anemia ferropênica, osteoporose e distúrbios reprodutivos. A falta de adesão à dieta sem glúten (DSG) costuma ser a causa desses distúrbios, tanto isso é verdade, que, em muitos casos, as alterações podem ser contornadas pela adesão à dieta. Abaixo uma breve descrição.

- **Anemia Ferropênica:** A região mais afetada pela DC é a região proximal do intestino delgado. Como o ferro é absorvido nessa região, a sua absorção fica

prejudicada e, conseqüentemente, há um decréscimo no conteúdo de ferro na circulação. Por essa característica, a anemia não responde ao tratamento com a terapia de ferro oral (Corazza, Valentini, Andreani *et al.*, 1995). A adesão à DSG geralmente é efetiva no tratamento desses casos (Bode e Gudmand-Hoyer, 1996).

• **Osteoporose:** alguns celíacos têm uma queda da densidade mineral óssea proporcional ao grau de má-absorção (Kemppainen, Kröger, Janatuinen *et al.*, 1999). Supõe-se que o mecanismo causador seja a má-absorção de vitamina D e cálcio. Em crianças é possível restaurar níveis normais da densidade óssea após a adesão à DSG (Mora, Barera, Beccio *et al.*, 2001), o mesmo não se mostrou em adultos, os quais apresentaram apenas melhora na densidade óssea após um a dois anos de DSG, porém sem normalização da mesma (Kemppainen, Kröger *et al.*, 1999).

• **Distúrbios Reprodutivos:** A DC afeta a saúde reprodutiva tanto de homens quanto de mulheres, porém o mecanismo pelo qual isso ocorre ainda não é bem compreendido. Os distúrbios associados são redução da fertilidade, infertilidade, queda da libido e risco aumentado de eventos adversos durante a gravidez (Rostami, Steegers, Wong *et al.*, 2001).

• **Câncer:** Os celíacos têm um risco aumentado para desenvolvimento de linfoma intestinal, de 2,7 a 6,3 vezes quando comparados com a população em geral (Rostom, Murray *et al.*, 2006). Os tipos mais frequentes são linfomas não-Hodkin de células B ou T. A maior causa de mortalidade entre os celíacos é a neoplasia maligna, dentre estas, um terço por linfoma não-Hodkin (Corrao, Corazza, Bagnardi *et al.*, 2001).

• **Doenças autoimunes:** pacientes celíacos têm risco de apresentar doenças autoimunes aumentado de três a dez vezes em comparação com a população em geral. Esse maior risco é atribuído a mecanismos imunológicos e genéticos semelhantes entre a DC e as doenças autoimunes e também à presença direta da DC (Green e Jabri, 2006). A adesão à DSG não previne o desenvolvimento de doenças autoimunes, porém, idade avançada ao diagnóstico e diagnóstico tardio acarretam em aumento do risco para essas (Sategna Guidetti, Solerio, Scaglione *et al.*, 2001).

A tabela 2 mostra várias enfermidades associadas à DC. Esse material é uma compilação das publicações (Green e Jabri, 2003; Lebenthal, Shteyer e Branski, 2008; Di Sabatino e Corazza, 2009)

Tabela 2: Condições patológicas associadas à doença celíaca e porcentagem aproximada de portadores entre essas populações.

Doenças Autoimunes	
• Diabete insulino-dependente	8-10%
• Síndrome de Sjögren	10%
• Dermatite Herpetiforme	6-7%
• Doença de Addison	8%
• Hepatite Autoimune	6%
• Colangite Autoimune	3,5%
• <i>Alepecia areata</i>	3-4%
• Gastrite Atrófica	ND
Síndromes	
• Down	5-10%
• Turner	6%
• Beckwitt-Wiedmann	ND
Doenças gastrointestinais	
• Doença de Crohn	18%

• Colite ulcerativa	ND
• Jejuno-ileíte ulcerativa	ND
• Colite microscópica	ND
• Enteropatia associada a linfoma de célula T	
Doenças cardíacas	
• Miocardite autoimune	4%
• Cardiomiopatia dilatada idiopática	2-4%
• Pericardite	ND
Doenças Neurológicas	
• Neuropatia	5%
• Ataxia cerebelar	ND
• Epilepsia na criança	ND
• Exaureca	ND
• Epilepsia com calcificação parieto-occipital	ND
Doenças Endócrinas	
• Amenorréia	ND
• Tireoidite autoimune	ND
Doenças ósseas	
• Osteoporose	2-7%
• Fraturas ósseas	ND
• Hipoplasia do esmalte	ND
Doenças Dermatológicas	
• Dermatite atópica	ND
• Urticária crônica	ND
• Vasculite cutânea	ND
• Psoríase	ND
Doenças Hematológicas e imunológicas	
• Anemia Ferropênica	3-15%
• Deficiência de IgA	ND
• Hipoesplenismo	ND
Manifestações nefrológicas	

• Glomerulonefrite imune	ND
• Síndrome nefrótica	ND
• Nefropatia IgA/Púrpura H-Schönlein	ND
Manifestações pulmonares	
• Alveolite fibrosante	ND
• Pneumonia Intersticial Linfocítica	ND
• Pneumonite intersticial descamativa	ND
Doenças hepáticas	
• Cirrose biliar primária	5-10%
• Transaminases elevadas	9%
Outras	
• Estomatite aftosa	ND

Legenda: ND = valor não disponível: (Green e Jabri, 2006; Lebenthal, Shteyer *et al.*, 2008; Di Sabatino e Corazza, 2009).

1.4. PATOGENIA

No centro da patogenia da DC, há o reconhecimento imune, de maneira alterada e exacerbada, pelas células T (CD4+) da lâmina própria do intestino delgado a peptídeos das proteínas que compõem o glúten. A resposta direta do epitélio intestinal a essas proteínas, através do sistema imune, resulta em alteração no trato digestivo em pessoas predispostas (Robins e Howdle, 2005). A expressão fenotípica da DC requer a presença de genes específicos que são pertencentes ao Complexo de Histocompatibilidade Principal (MHC), os alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8.

Em indivíduos normais, as proteínas dos alimentos são degradadas por enzimas digestivas em peptídeos pequenos e aminoácidos. O alto conteúdo de prolina dá às proteínas tóxicas aos celíacos uma maior resistência à digestão proteolítica. Dessa forma, fragmentos grandes com alto conteúdo de prolina e glutamina ficam acumulados no intestino delgado. A capacidade de indivíduos

saudáveis e celíacos de digerir tais proteínas é similar (Wieser e Koehler, 2008). Sendo assim, a DC deve ser ativada por uma alteração funcional da barreira da mucosa intestinal. O aumento da permeabilidade da mucosa permite que os peptídeos do glúten alcancem o tecido linfático subepitelial. Em 2006, foi descrito que um aumento na liberação de zonulina – peptídeo responsável pela modulação da permeabilidade intestinal – provoca maior permeabilidade intestinal em portadores de DC (Drago, El Asmar, Di Pierro *et al.*, 2006).

A associação entre o antígeno leucocitário humano (HLA) e a DC, assim como o papel dessas moléculas na predisposição genética à doença é bastante reconhecida (Stene, Honeyman, Hoffenberg *et al.*, 2006; Di Sabatino e Corazza, 2009). A molécula HLA-DQ2 é encontrada em 95 a 98% dos pacientes celíacos. Nos demais está associada com o HLA-DQ8.

Recentemente foi sugerida, também, a influência da infecção por Rotavírus. Em um estudo com 1931 crianças norte-americanas, positivas para os alelos HLA-DQ2 e HLA-DQ8, o risco de desenvolver DC aumentou com a maior frequência das infecções virais. A base desse achado é o mimetismo celular: o sistema imune dessas crianças teria respondido ao glúten da mesma maneira que fez em relação ao vírus (através da proteína VP-7) (Stene, Honeyman *et al.*, 2006).

A produção de anticorpos direcionados à transglutaminase tecidual (tTG – “*tissue Transglutaminase*”) é uma característica da resposta imune aberrante ao glúten. A tTG é uma enzima cálcio-dependente que catalisa a modificação pós-traducional das proteínas. Essa enzima é encontrada no citoplasma, podendo ser liberada em caso de lesão tecidual (Dieterich, Ehnis *et al.*, 1997). Ao promover a

deamidação da glutamina a ácido glutâmico, a tTG aumenta o efeito imunoestimulatório do glúten, permitindo que o mesmo se ligue ao HLA-DQ2 ou ao HLA-DQ8 (Molberg, McAdam, Korner *et al.*, 1998; van de Wal, Kooy, van Veelen *et al.*, 1998). Em pacientes com DC, células T CD4 reconhecem esses peptídeos modificados. Ao serem ativadas, essas células liberam citocinas pró-inflamatórias, causando a lesão intestinal (Rostom, Murray *et al.*, 2006).

Os enterócitos aparentam possuir uma função patogênica na DC. Peptídeos de glúten que passaram a camada de enterócitos e chegaram à circulação são capazes de ativar a resposta por dois mecanismos imunológicos: resposta imune adaptativa envolvendo células apresentadoras de antígeno, HLA-DQ2 ou DQ8 e células T CD4+ na lâmina própria; e resposta imune inata (Wieser e Koehler, 2008). Os mecanismos de dano à mucosa na DC, de acordo com Di Sabatino e Corazza, são representados na figura 5.

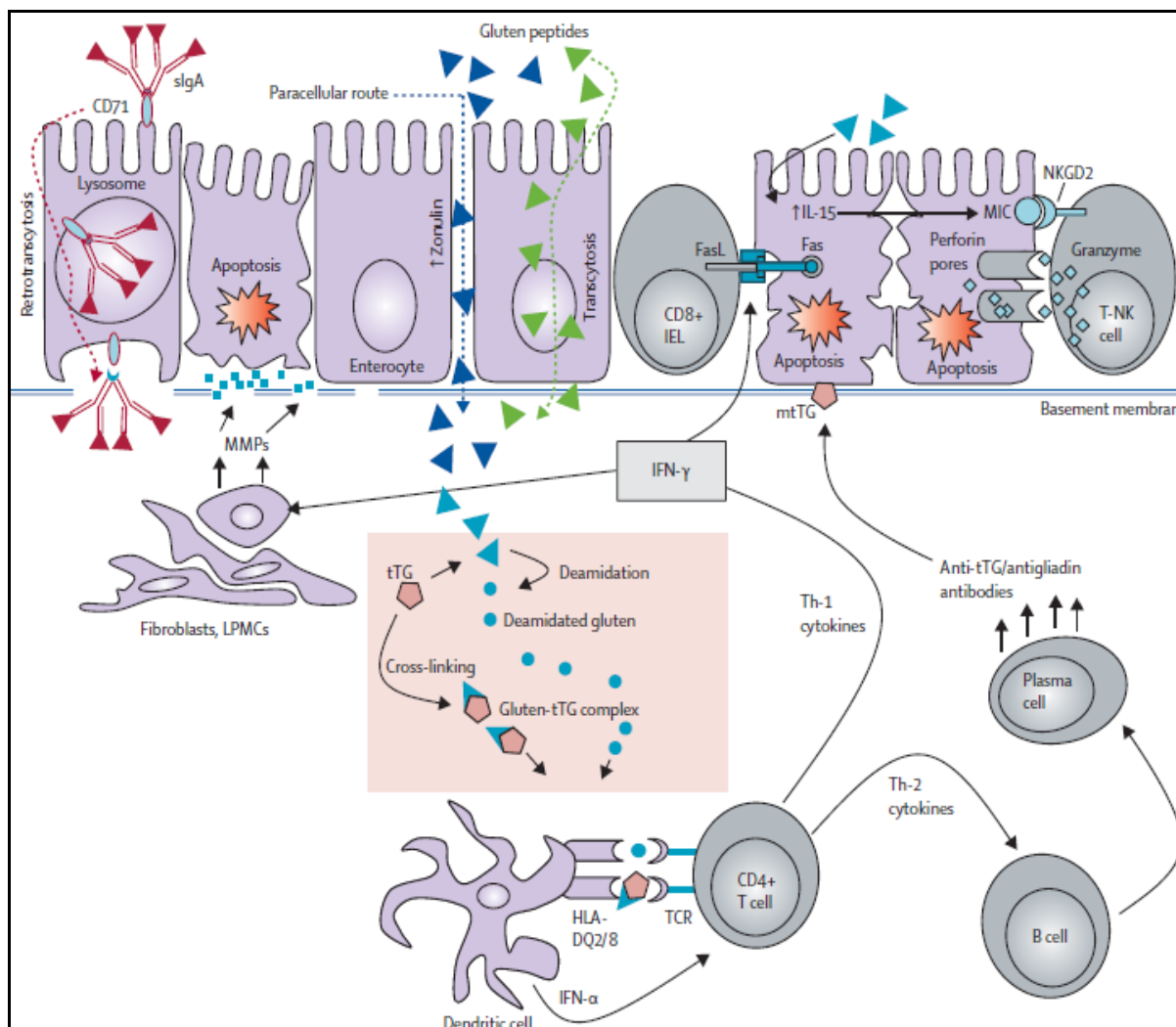


Figura 5: Mecanismo de dano da mucosa na doença celíaca (Di Sabatino e Corazza). Os três mecanismos pelos quais o glúten pode ser transportado através do epitélio intestinal são a via paracelular (em azul) como consequência do comprometimento da integridade da mucosa pelo aumento da liberação de zonulina, via transcitose (em verde), ou por retrotranscitose, ligado a moléculas de IgA secretadas (sIgA), através do receptor de transferrina CD71 (em vermelho). A deamidação e ligação do glúten à transglutaminase tecidual (tTG) (painel rosa) reforça a apresentação de peptídeos de glúten pelas células dendríticas HLA-DQ2/-DQ8 às células T CD4+. Estas, por sua vez, quando ativadas produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias induzindo uma padrão de resposta de células T-helper tipo 1 (Th-1), dominada pelo Interferon-gama (IFN- γ). Citocinas Th-1 promovem efeitos inflamatórios incluindo secreção de metaloproteinases de matriz (MMPs) por fibroblastos ou por células mononucleares da lâmina própria (LPMC). Essas MMPs são responsáveis pela degradação da membrana basal e matriz extracelular e aumento da citotoxicidade de linfócitos intra-epiteliais (IELs) e células T "natural killer" (NK). Estes últimos facilitam a morte celular dos enterócitos por apoptose pelo sistema Fas / Fas Ligante (FasL), ou pelas rotas perforina-granzima induzida por interleucina-15 (IL-15). O Interferon-alfa (IFN- α), liberado pelas células dendríticas ativadas perpetua a reação inflamatória pela indução da produção de IFN- γ pelas células T CD4+. Além disso, através da produção de citocinas Th-2, as células T CD4+ ativadas estimulam a ativação e expansão clonal de células B, que diferenciam em plasmócitos e produzem anticorpos antigliadina e anti-tTG. Pela interação com a tTG extracelular ligada à membrana (mtTG), os depósitos de autoanticorpo tTG da região de membrana basal podem induzir alterações do citoesqueleto do enterócito com a redistribuição de actina e consequente dano epitelial.

Fonte: (Di Sabatino e Corazza, 2009).

Estudos epidemiológicos, incluindo a falta de completa concordância para DC em gêmeos monozigóticos – 75% e de 10% em dizigóticos -, sugerem fortemente a ação de fatores ambientais no desencadeamento da DC e que o padrão de herança seja poligênico (Greco, Romino, Coto *et al.*, 2002; Nistico, Fagnani, Coto *et al.*, 2006; Di Sabatino e Corazza, 2009).

Atualmente não existe nenhum modelo animal completo para DC, ou seja, que englobe todas as características da doença (Fasano e Troncone, 2008). A inexistência de modelo animal torna difícil a compreensão de aspectos básicos relacionados tanto à etiopatogenia quanto à terapêutica da DC (Stazi, 2005). Recentemente, porém, um modelo animal mais aproximado foi estabelecido em macacos rhesus (*Macaca mulatta*) que apresentaram sensibilidade espontânea ao glúten em 3% dos indivíduos, sendo que 0,6% apresentaram o fenótipo celíaco completo (Bethune, Borda, Ribka *et al.*, 2008)

1.5. Diagnóstico

Hoje em dia, testes sorológicos confiáveis servem como triagem prévia à biópsia, que permanece como padrão áureo de diagnóstico. Outra ferramenta disponível é o uso dos marcadores genéticos HLA-DQ2/DQ8 como teste de exclusão do diagnóstico de DC. Os métodos diagnósticos da doença são descritos em maior detalhe a seguir.

- **Sorologia**

Com o surgimento de testes sorológicos mais confiáveis - inicialmente o anticorpo IgA antigliadina (IgA AGA), posteriormente os anticorpos antiendomísio e

os IgA antitransglutaminase tecidual (IgA tTG) - pôde-se estabelecer que a DC não é tão rara quanto anteriormente suposto (Rostom, Murray *et al.*, 2006; Di Sabatino e Corazza, 2009). Testes baseados na detecção de anticorpos antiendomísio (EMA) e tTG, que apresentam elevadas sensibilidade e especificidade (tabela 3), estão sendo cada vez mais usados como testes de *screening* para DC.

Tabela 3: Sensibilidade e especificidade dos testes sorológicos usados para diagnóstico da doença celíaca

Teste	Especificidade	Sensibilidade
IgA AGA	<80% em 50% dos estudos	>80% na maioria dos estudos
IgG AGA	Variável	Não especificado
IgA EMA	96-97% ME	100% ME
	90% HU	100% HU
IgA tTg	90% GP	95% GP
	98% HU	98% HU
IgG tTG	40% (maior em caso de deficiência de IgA)	98%

Legenda: IgA – imunoglobulina A; IgG – imunoglobulina G; AGA – anticorpo antigliadina; AGA – anticorpo antigliadina; EMA – anticorpo antiendomísio; tTG – transglutaminase tecidual; ME – substrato de esôfago de macaco; HU – substrato de cordão umbilical humano; GP – substrato de cobaia (Crowe, 2007)

Em uma revisão, envolvendo 32 estudos com IgA EMA e 27 com IgA tTG, Hill demonstrou que estes dois testes são os melhores para a identificação de quais indivíduos devem ser encaminhados à biópsia. Nesse estudo, não foi apresentada nenhuma evidência de que o uso de ambos os testes fosse melhor que o uso de apenas um deles (Hill, 2005). Vale destacar que todos os estudos foram feitos em ambiente de pesquisa, dessa forma, a acurácia é provavelmente maior do que na prática clínica. Em um amplo estudo multinacional, envolvendo 20 laboratórios, Li *et al* encontraram uma significativa variabilidade na sensibilidade e especificidade do teste tTG entre os laboratórios estudados, mostrando a necessidade de uma melhor padronização deste teste (Li, Yu, Tiberti *et al.*, 2009).

Uma opção recente, que além de apresentar utilidade diagnóstica também é indicada para monitorar a aderência à DSG, é o teste de anticorpos antitransglutaminase na saliva, que apresenta uma boa relação com os valores séricos. Bonamico et al. utilizaram a análise da saliva por radioimunoensaio (RIA) e observaram 109 pacientes por ocasião do diagnóstico de DC e no acompanhamento da dieta (Bonamico, Nenna, Luparia *et al.*, 2008). Recentes estudos demonstraram que o uso do anticorpo IgG-antigliadina deamidada aliado ao uso do teste de IgA tTG permite uma otimização na triagem dos casos a serem biopsiados (Kaukinen, Collin, Laurila *et al.*, 2007; Volta, Granito, Parisi *et al.*, 2010).

Um dos problemas enfrentados pelo diagnóstico sorológico é a deficiência de IgA, que tem prevalência aumentada, em relação à população geral, de 10 a 15 vezes nos celíacos, nos quais varia de 1,7 a 3% (Rostom, Murray *et al.*, 2006). Cataldo *et al.*, recomendam que a sorologia IgA seja sempre checada (Cataldo, Lio, Marino *et al.*, 2000). Já Rostom *et al.*, recomendam que a dosagem IgA não seja feita como rotina junto às dosagens de EMA IgA e tTG IgA, sim em casos com suspeita de deficiência IgA, como pacientes com exames sorológicos IgA negativo mas com suspeita de DC (Rostom, Murray *et al.*, 2006). Em caso de deficiência IgA, devem ser feitas as dosagens de EMA IgG e tTG IgG.

- **Marcadores Genéticos**

De acordo com Schuppan, virtualmente todos os pacientes com DC compartilham os genes de classe II do HLA DQ2 ou DQ8 (Schuppan, Junker e

Barisani, 2009). Estudos realizados em americanos demonstraram que o gene HLA-DQ2 está presente em cerca de 95% dos pacientes com DC, enquanto o HLA-DQ8 se encontra nos de 5% restantes (Rostom, Dubé, Cranney *et al.*, 2004; Rostom, Murray *et al.*, 2006). Na população em geral estes dois marcadores têm alta prevalência (30 a 40%), mas apenas ~2 a 5% dos portadores desenvolvem DC. Isso implica que outros fatores, tanto genéticos (não-HLA) quanto ambientais contribuem para as manifestações da DC. Até o momento foi identificada suscetibilidade em outros treze diferentes loci (Schuppan, Junker *et al.*, 2009). Apesar disso, a ausência de HLA-DQ2 e HLA-DQ8 tem alto valor preditivo negativo, tornando a sua tipagem um excelente teste para excluir suspeita DC (Di Sabatino e Corazza, 2009).

- **Histologia**

Mesmo com os avanços obtidos no diagnóstico sorológico, ainda se faz necessário o estudo histológico da mucosa intestinal, padrão áureo para a detecção de DC, embora as alterações não sejam patognomônicas. É baseada na presença de lesões características em biópsia duodenal. As alterações histopatológicas da doença podem abranger desde lesões infiltrativas, com aumento de linfócitos intraepiteliais (LIEs) com arquitetura normal até uma mucosa completamente plana (Walker-Smith, Guandalini *et al.*, 1990). Para classificar essas lesões quanto à gravidade utiliza-se o critério de Marsh (Marsh, 1992), que classifica as lesões por seu estado evolutivo (quadro 1 e Figura 6).

Quadro 1: Classificação de Marsh das lesões duodenais

Estágio	Características histológicas
0 (sem mudanças)	Biópsia duodenal normal
1 (infiltrativo)	Aumento de linfócitos intraepiteliais (>30 por cada 100 células epiteliais)
2 (hiperplásico)	Hiperplasia de criptas – infiltrado inflamatório crônico nas submucosas
3 (atrófico)	Atrofia vilositária parcial ou leve
3a	Atrofia vilositária subtotal ou moderada
3b	Atrofia vilositária total ou completa
3c	Desaparição da mucosa e submucosa
4 (hipoplásico)	

Adaptado de Marsh 1992(Marsh, 1992)

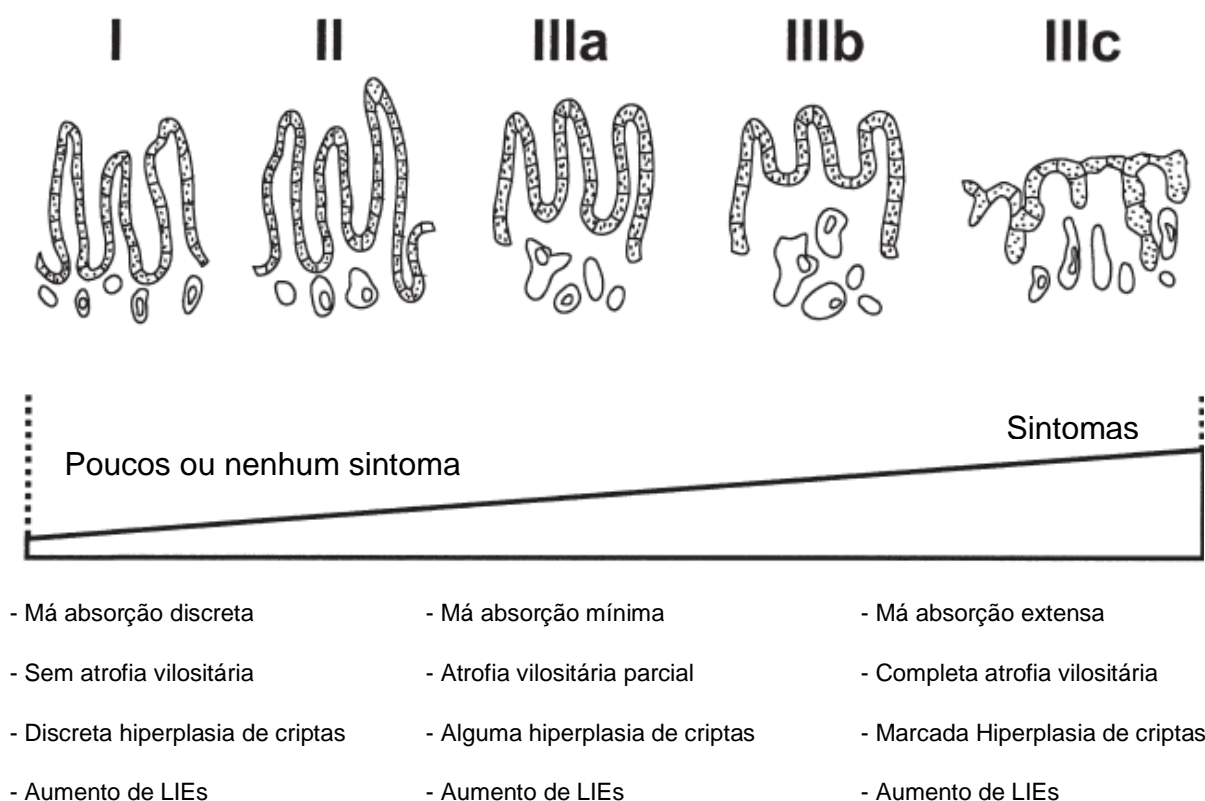


Figura 6: Espectro de má-absorção e sintomas na doença celíaca. A magnitude da má-absorção e sintomas em pacientes com doença celíaca é frequentemente correlacionada com a extensão da lesão na mucosa intestinal.

Fonte: Adaptado (Rostom, Murray *et al.*, 2006)

Cabe ressaltar que as alterações na biópsia não podem ser consideradas isoladamente, uma vez que não são exclusivas da DC. O aumento do número de linfócitos intraepiteliais, por exemplo, pode ser encontrado em: sprue tropical, giardíase, enteropatias infecciosas, doença de Crohn e em outras doenças. A atrofia vilositária, por sua vez, também pode ser observada em: enteropatia autoimune, enterite por radiação, doença de Crohn, alergia alimentar (leite de vaca, por exemplo), etc. Em casos de lesões Marsh I e II, os testes sorológicos são necessários para detecção da DC. A persistência de testes sorológicos positivos e histologia normal são indicativos de DC latente (Rostom, Murray *et al.*, 2006).

Recentemente foi mostrado que, ao contrário do apresentado por Rostom *et al.*, pacientes com lesão Marsh I e Marsh IIIc não tiveram diferença significativa nas manifestações clínicas (Shahraki, Shahraki, Al Dulaim *et al.*, 2009).

1.6. Tratamento

O tratamento da DC é, ao mesmo tempo, simples de ser prescrito e difícil de ser obedecido. Consiste em manter, por toda vida, uma dieta completamente isenta de cereais com conteúdo elevado de prolamina. Excluir definitivamente da dieta todos os alimentos e/ou bebidas feitos com trigo, centeio e cevada não é tarefa fácil. Torna-se obrigatória a retirada de massas, pães, biscoitos, bolos e cervejas, elaborados com os cereais já referidos. Bebidas com malte, por definição, devem ser abolidas, pois a prolamina da cevada é só parcialmente digerida. O glúten pode estar presente como excipiente de medicamentos, deve-se, portanto, atentar para a constituição dos mesmos (Schubert-Ullrich, Rudolf, Ansari *et al.*, 2009). Um grande problema na condução da dietoterapia é a possibilidade de contaminação de outros

alimentos com glúten. Isso pode ocorrer em diversas ocasiões: nas fazendas onde diversos cereais são plantados, em moinhos onde os grãos são processados, em armazéns onde os alimentos são vendidos “à granel” e, evidentemente, nos restaurantes (Di Sabatino e Corazza, 2009).

A sensibilidade dos celíacos ao glúten varia entre os indivíduos e, até mesmo, nas diferentes fases da vida. Há evidências de que até a quantidade existente nas “hóstias de comunhão” possa desencadear manifestações clínicas da doença (Moriarty, Loft, Marsh *et al.*, 1989). Estudos demonstraram, em diferentes partes do mundo e com pacientes de várias idades, que as regras dietéticas não são observadas em uma proporção que varia de 9 a 58% dos casos (Hall, Rubin e Charnock, 2009), o que costuma trazer consequências importantes para a saúde dos afetados.

Considerando que a base do tratamento da DC é a DSG, é fundamental saber o teor de glúten nos alimentos para a correta prescrição da dieta. Apesar de se reconhecer a importância do glúten na dieta dos celíacos, não há, até agora, unanimidade em relação a qual o teor da proteína aceito para assinalar os alimentos como livres de glúten. As diretrizes do *Codex Alimentarius Commission of the Joint Food and Agricultural Organization and the World Health Organization of the United Nations* (Codex) de 2008 indicam três categorias de alimentos rotulados como livres de glúten. A primeira aceita que o alimento naturalmente livres de glúten (que não contêm nenhum dos cereais tóxicos aos celíacos na composição) possa conter no máximo 20 miligramas de glúten por quilograma de alimento (20 ppm). A segunda, trata dos alimentos produzidos a partir de ingredientes considerados tóxicos que foram tratados para minimizar o teor de glúten, para esses, são toleradas até 200

ppm de glúten. Quando houver uma mistura dos dois tipos de alimentos, aceita-se menos de 200 ppm. Esses valores são baseados em peso de matéria seca (Codex, 2008), porém esse limite se refere ao máximo de glúten em um determinado alimento, e não à quantidade diária que pode ser ingerida por um celíaco. Esse tópico será retomado com maiores detalhes no capítulo discussão. Não há consenso, também, sobre qual quantidade de glúten seria segura para os celíacos, pois, com já foi dito, há grande variação na sensibilidade dos indivíduos à proteína. Com base nos estudos atuais pode-se dizer que a margem de segurança é abaixo de 50mg/dia (Troncone, Auricchio e Granata, 2008). Alguns autores, porém, recomendam um máximo de 20 mg/dia (Wieser e Koehler, 2008) e ainda outros, apenas 10 mg/dia (Catassi, Fabiani, Iacono *et al.*, 2007).

No nosso país, em 1992, foi promulgada a Lei Federal nº 8543/1992 (Brasil, 1992) que determinou a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten. Em 2002, pela resolução da ANVISA, RDC nº 40 (Brasil, 2002) a advertência “CONTÉM GLÚTEN” em caracteres com destaque, nítidos e de fácil leitura, tornou-se obrigatória também para as bebidas embaladas, exceto as alcoólicas. Mais recentemente, a Lei Federal 10.674 de 2003 (Brasil, 2003) obriga as empresas a exibir de forma clara nos rótulos dos produtos a presença ou ausência de glúten (“CONTÉM GLÚTEN” ou “NÃO CONTÉM GLÚTEN”). Essa rotulagem é baseada nas informações dos conteúdos dos ingredientes utilizados no preparo dos alimentos. São considerados livres de glúten os alimentos que não apresentem trigo, centeio, cevada ou aveia, mas não há exigência de comprovação laboratorial quanto a eventual presença de glúten.

1.7. Detecção de glúten nos alimentos

Há diferentes métodos para a detecção de glúten. Nem todos correspondem às exigências mínimas de sensibilidade, seletividade e reprodutibilidade. Alguns ainda carecem de testes sistemáticos ou não estão disponíveis comercialmente, limitando-se ao ambiente de pesquisa. A maioria dos métodos é baseada em detecção de prolaminas tóxicas aos celíacos (Wieser e Koehler, 2008). Os principais métodos disponíveis são baseados em ensaios imunoenzimáticos, espectrometria de massa e análise de DNA.

1.7.1. Ensaios Imunoenzimáticos

O método de ensaio imunoenzimático (ELISA) é o mais frequentemente utilizado devido às suas altas sensibilidade e especificidade e simples manuseio. Sua capacidade de padronização e automatização tornam-no excelente para este propósito. Existem vários testes comercializados, com variados limites de detecção, por exemplo: Immunotech (República Tcheca), Ingenasa (Espanha), Morinaga (Japão), Diffchamb (Suécia), Neogen Corporation (EUA), R-Biopharm (Alemanha) e Tepnel BioSystems (Inglaterra). Entre os ensaios imunoenzimáticos disponíveis cabe destacar o ELISA γ -gliadina e o R5-ELISA.

O ELISA γ -gliadina, desenvolvido por Skerritt e Hill (Skerritt e Hill, 1991) e aceito pelo AOAC (*Association of Analytical Communities*), é baseado em um anticorpo monoclonal que reage à fração γ -gliadina do trigo. Embora haja métodos que detectem valores menores, o aceito pelo AOAC tem um limite inferior de detecção de 150ppm (AOAC, 2005). Este teste tem como seu ponto fraco subestimar os conteúdos de hordeínas (Valdés, Garcia, Llorente *et al.*, 2003).

O método R5-ELISA, desenvolvido pelo *Prolamin Working Group* (Valdés, Garcia *et al.*, 2003), é o método de preferência do Codex para a detecção de glúten em alimentos (Codex, 2008). É baseado em um anticorpo monoclonal contra o epítopo QQPFP (glutamina – glutamina – prolina – fenilalanina – prolina), presente nas proteínas tóxicas aos celíacos. Seu limite de detecção é de 1,5 a 3ppm de gliadina, dependendo do fabricante, enquanto o Codex preconiza que o método de detecção deva ter um limite de detecção de pelo menos 10ppm (Codex, 2008).

As fitas imunocromatográficas são uma alternativa rápida e de fácil manuseio ao ELISA. Seu limite de detecção é de 5 a 20ppm, dependendo do fabricante. Entre suas vantagens destacam-se, além do fácil manuseio e rapidez no resultado (3 a 15 minutos), a ausência da necessidade de equipamentos caros como leitores de absorvância e centrífugas. As fitas ainda não foram validadas em estudos interlaboratoriais, mas apresentam um grande potencial para análise de alimentos.

Os métodos de ELISA disponíveis comercialmente não são capazes de quantificar glúten hidrolizado de maneira adequada, podendo subestimar conteúdo total de glúten. Dentre os métodos comerciais, o R5-ELISA é o que consegue um melhor aproveitamento dessas proteínas hidrolizadas para a leitura (Thompson e Mendez, 2008).

1.7.2. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa é um método microanalítico, não-imunológico para detectar os diferentes átomos que compõem uma substância. Um espectrômetro de massa emite um feixe de elétrons contra a amostra para produzir íons, ou átomos eletricamente carregados. Os íons atravessam um campo magnético que curva suas

trajetórias de modos diferentes, dependendo de suas massas. O campo separa os íons em um padrão chamado espectro de massa. A massa e a carga dos íons podem ser medidas por sua posição no espectro. Dessa forma os elementos e isótopos presentes na amostra podem ser identificados (Hernando, Valdes e Mendez, 2003). Tal método, no entanto, é de pouco auxílio na prática clínica porque requer equipamentos de altíssimo custo e condições muito específicas para ser realizado.

1.1.3. Análise de DNA

Baseada em técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) essa análise para detecção de glúten se baseia na estabilidade do DNA dos cereais mesmo após aquecimento. A reação funciona da seguinte forma, o DNA é extraído da amostra, submetido a vários ciclos de amplificação de um gene alvo em um termociclador para depois ser analisado em gel de agarose (Debnath e Ricard, 2009). A análise de DNA apresenta excelente sensibilidade e especificidade e Dahinden *et al* sugerem que pode ser utilizada como método confirmatório dos testes ELISA (Dahinden, Von Büren e Lüthy, 2001). Estudo recente de Debnath e Ricard demonstrou um excelente limite de detecção de 21,5 pg de DNA da glutenina do trigo não tendo sido realizada amplificação do DNA de outros cereais (Debnath, Martin e Gowda, 2009).

2. JUSTIFICATIVA

O grau de adesão dos pacientes celíacos à DSG é modesto. Além disso, embora a maioria dos pacientes relate seguir a dieta, não raramente consomem inadvertida ou propositadamente alimentos contendo glúten ou contaminados por essa proteína. No nosso país a presença de glúten nos alimentos é baseada apenas na informação dos fabricantes. Não há exigência de comprovação do teor de glúten nos alimentos e ainda não foi estabelecido um limite tolerável pela legislação nacional.

Justifica-se o presente estudo pela necessidade de avaliar, do ponto de vista laboratorial, o teor de glúten de alimentos comerciais rotulados “Não contém glúten”. Esse estudo visa proporcionar aos pacientes celíacos uma maior segurança em relação aos alimentos que consomem.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Analisar a presença de glúten em alimentos de várias procedências, rotulados como livres de glúten.

3.2. Objetivos Específicos

- 3.2.1. Avaliar quantitativamente, através de teste imunoenzimático (R5-ELISA), os alimentos comerciais rotulados como livres de glúten quanto à presença da proteína;
- 3.2.2. Avaliar qualitativamente, através de teste imunocromatográfico, os alimentos comerciais rotulados como livres de glúten quanto à presença da proteína;
- 3.2.3. Comparar os resultados obtidos pelo teste imunocromatográfico com aqueles obtidos com o método R5-ELISA.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostras

Foram adquiridos produtos que substituam, na dieta de portadores da DC, aqueles que contêm glúten. Tais produtos foram obtidos em supermercados e lojas especializadas em produtos dietéticos. O critério de inclusão foi a rotulagem (NÃO CONTÉM GLÚTEN) e composição baseada em ingredientes naturalmente sem glúten. O critério de exclusão foi a presença de chocolate nos alimentos. Esses, por conter polifenóis, exigem método especial de extração do glúten. A amostra constou de 70 produtos de diferentes marcas, vendidos em embalagens fechadas e distribuídos da seguinte maneira: farinhas (17), biscoitos (16), salgadinhos (12), barra cereal/granola (8), pão de queijo (4), massas (4), outros (4), tempero em pó (3) e sopa (2) – relação completa das amostras no anexo I.

4.2. DELINEAMENTO ESTATÍSTICO

Esse é um estudo prospectivo transversal. Foram analisadas setenta amostras, para obter um intervalo de confiança de 95% e margem de erro absoluta de 7% para a estimativa de sensibilidade e de especificidade esperada de 95% (88%; 100%) entre os testes. Os valores foram obtidos com base nos resultados de estudos que analisaram teor de glúten nos alimentos (Abreu, Barbosa, Torre *et al.*, 2006; Hirayama e Sdepanian, 2007). As variáveis foram descritas através de frequências absolutas e relativas. As amostras foram analisadas utilizando o teste de concordância Kappa. Para fazer essa análise os resultados foram considerados como sendo qualitativos, tanto para a técnica de R5-ELISA, quanto para a

imunocromatografia. Para comparação entre os métodos foi utilizado o teste qui quadrado de McNemar e a análise de concordância - kappa. Para comparar os grupos “supermercado” e “lojas dietéticas” foi aplicado o teste qui quadrado de Pearson.

4.3. PREPARO DAS AMOSTRAS DE ALIMENTO

As amostras foram preparadas no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia) conforme o método desenvolvido por Garcia *et al*, (Garcia, Llorente, Hernando *et al.*, 2005). Cerca de 5 g de alimento seco passaram por completa moagem. O produto moído foi tamisado em uma peneira com aberturas de 600µm para garantir uma uniformidade de tamanho entre as amostras. Alimentos úmidos foram cortados em fragmentos e colocados em cuba contendo sílica para desidratar, sendo processados da mesma forma que os alimentos secos. O conteúdo de glúten foi avaliado proporcionalmente ao peso de matéria seca. Conforme figura 7.

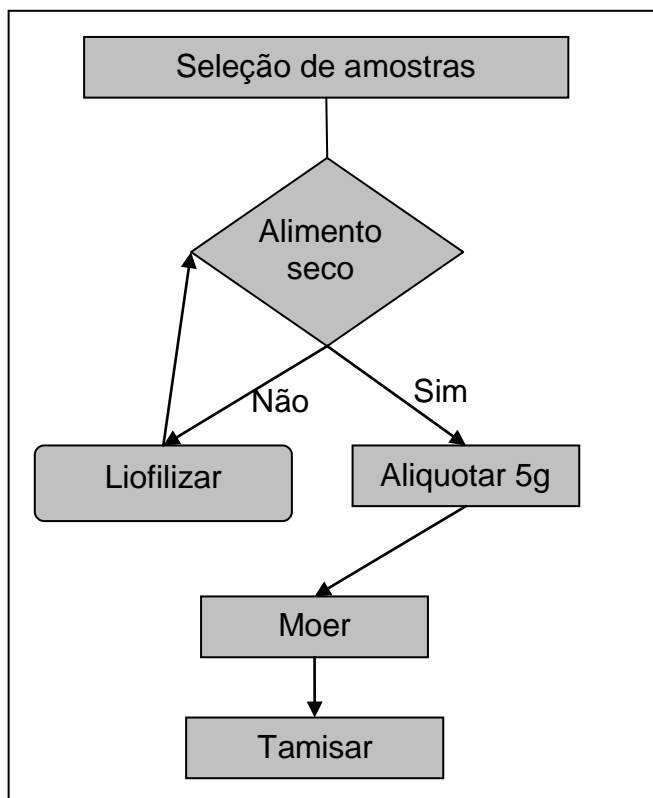


Figura 7: Representação esquemática do preparo dos alimentos

4.4. EXTRAÇÃO

As amostras foram extraídas com solução aquosa de etanol 60%, de acordo com o seguinte procedimento (figura 5):

1. Pesar 1g da amostra moída em tubo de polipropileno
2. Adicionar 10mL de Etanol 60%.
3. Homogeneizar por 30 segundos em homogeinizador (vórtex)
4. Homogeneizar em agitador orbital a 50 rpm por 1 hora
5. Homogeneizar novamente em vórtex por 30 segundos
6. Centrifugar a 2500 rcf por 10 minutos em temperatura ambiente

- Transferir o sobrenadante para outro tubo de polipropileno para posterior diluição

Após a extração, as amostras foram identificadas de forma randomizada para que o pesquisador fosse “cegado” quanto à amostra analisada.

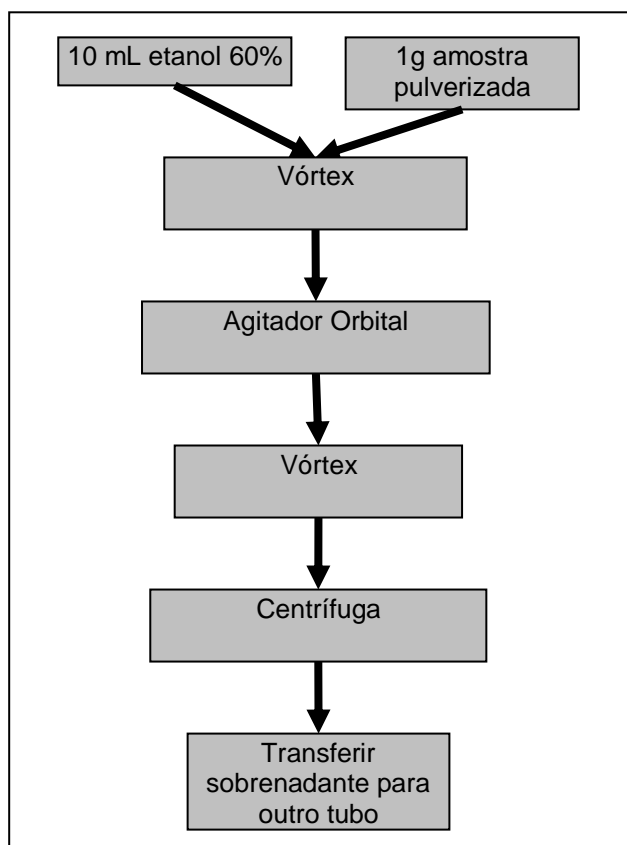


Figura 8: Representação esquemática do processo de extração de glúten das amostras.

4.5. Ensaio Imunoenzimático Ligado à Enzima (ELISA)

As pesquisas de detecção e quantificação de glúten nos alimentos foram feitas por Ensaio Imunoenzimático Ligado à Enzima (ELISA – Enzyme-Linked Immunoassay), usando o kit Transia[®]Plate Prolamins (Ingenasa, Madrid, Espanha) de acordo com as instruções do fabricante. Resumindo, o sobrenadante da extração foi diluído em tampão para diluição em 1:25 e 1:50. A placa foi lavada 3 vezes com 300 µL de

tampão de lavagem em cada poço. Foram adicionados 100 µl de controle negativo, padrões e diluições das amostras em seus respectivos poços. A placa foi incubada por 1 hora à temperatura ambiente para permitir a formação do complexo Antígeno-Anticorpo (Ag-Ac) entre o anticorpo monoclonal R5 imobilizado na placa e o antígeno das amostras. Então a placa foi esvaziada e lavada com tampão de lavagem por 4 vezes. No fim da lavagem, a placa foi drenada e 100 µL de conjugado (anticorpo marcado com peroxidase) foram adicionados a cada poço, misturados e a placa foi incubada por 1 hora. Esse procedimento é feito para ligar o conjugado ao complexo Ag-Ac com gliadina que está fixado na placa (formando Ac-Ag-Ac-Enzima). Passada a incubação, 100 µL de substrato cromogênico (Tetrametilbenzidina – TMB) foram adicionados. Ao se ligar à peroxidase, o TMB dá uma coloração azul à amostra. Após incubar por 10 minutos, a reação de revelação foi interrompida usando-se a solução de parada (ácido sulfúrico 2.5M), desenvolvendo uma coloração amarela. A intensidade do sinal colorimétrico foi medida em um leitor de microplacas Zenith 200rt (Anthos-Labtec, Cambridge, UK) com comprimento de onda de 450nm. Ver figura 7.

A partir da leitura da absorbância dos padrões, foi feita uma curva padrão onde foram interpolados valores obtidos nas amostras. O conteúdo de glúten foi calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{ppm de glúten} = G \times D \times 2^* \times 10 / 1000$$

Onde:

- G = concentração de gliadina obtida na curva padrão
- D = fator de diluição do extrato

- 2* = fator de correção para o cálculo do conteúdo de glúten, uma vez que o kit identifica gliadina, que representa cerca de 50% do glúten (definido pelo fabricante). Também utilizamos o fator de 1,3, discutido adiante.

- 10 = fator de diluição utilizado no preparo da amostra (1g de alimento em 10 mL de etanol)

- 1000 = conversão da concentração de ng/g em ppm (mg/kg)

4.6. Imunocromatografia

Foi usado o teste Rida®Quick Gliadin (R-Biopharm Inc., US), de acordo com as especificações do fabricante. Nesse método, 50 µL do sobrenadante resultante da extração foram adicionados a 500 µL de tampão de diluição. A fita-teste foi colocada dentro dessa solução e lida depois de 5 minutos. Os resultados foram lidos visualmente. Em caso de resultado negativo apenas uma banda foi vista (banda controle), em casos de resultado positivo, duas bandas foram vistas (bandas controle e teste). A forma como os resultados são interpretados está ilustrada na figura 9 e seu procedimento na figura 10.

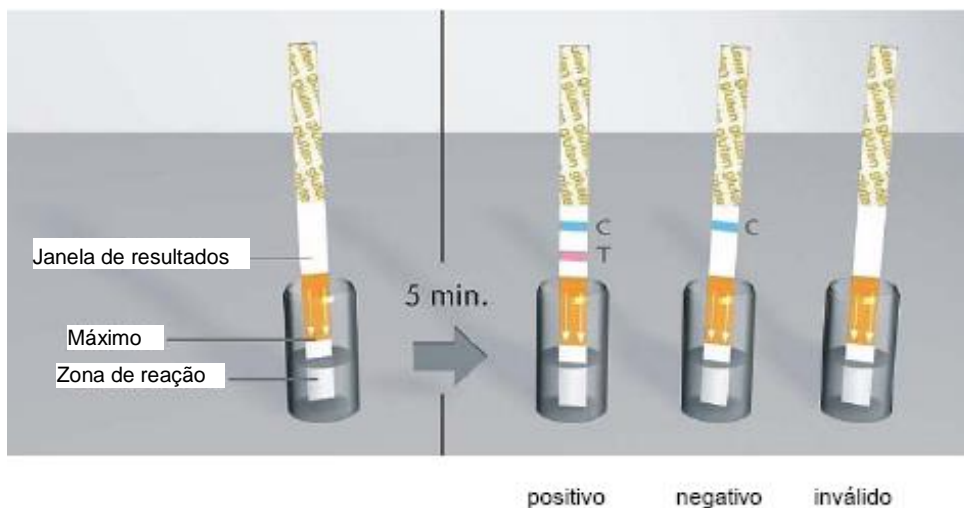


Figura 9: Interpretação de resultados das fitas imunocromatográficas. Em caso de resultado positivo a banda azul (controle da reação – C) e a banda vermelha (teste – T) são vistas. Para resultados negativos somente a banda controle é vista. Caso não apareça a banda C o resultado é inválido.

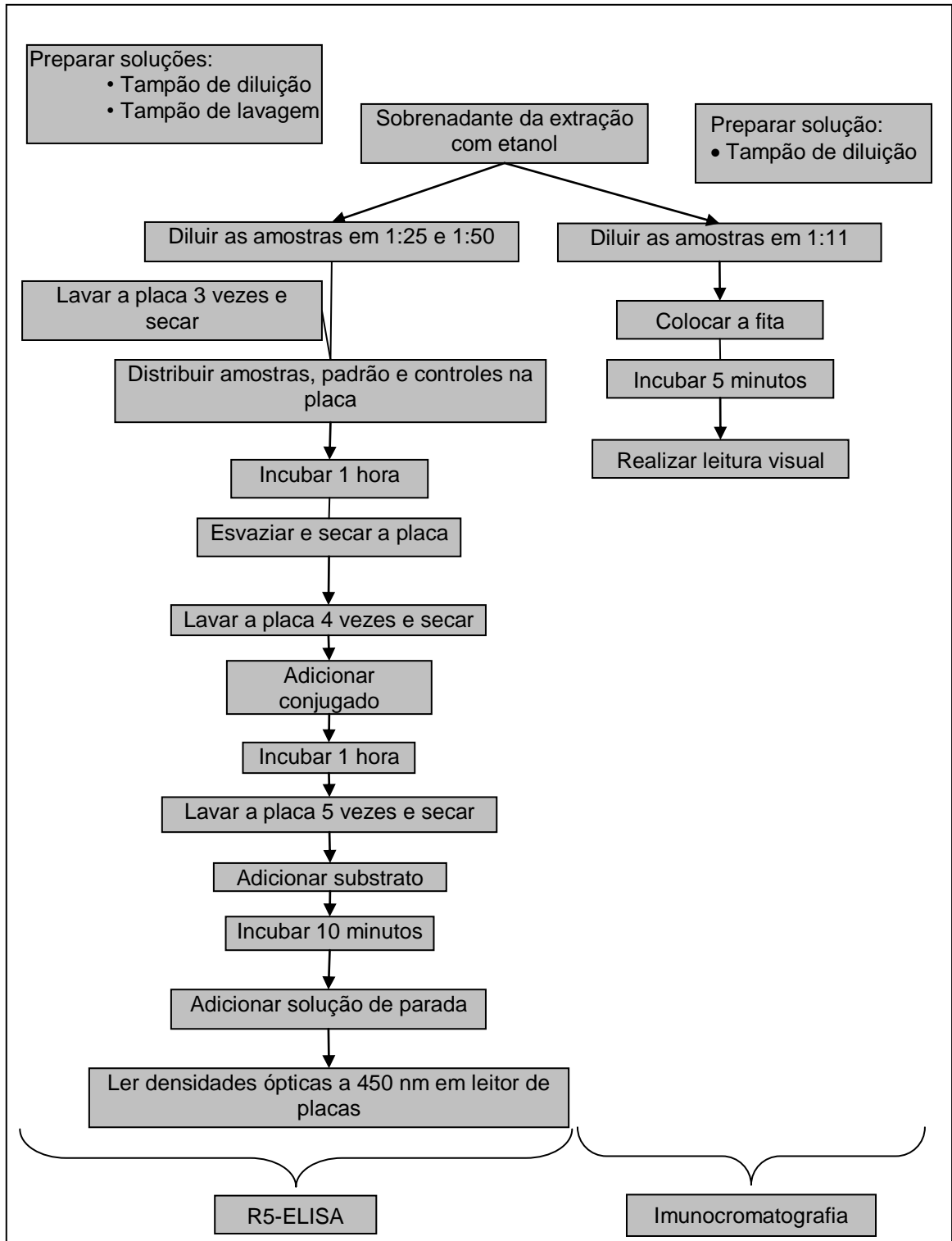


Figura 10: Representação gráfica dos procedimentos para a realização dos testes de R5-ELISA e imunocromatografia. Observando a figura é possível comparar a praticidade do teste imunocromatográfico em comparação ao R5-ELISA, tanto no que se refere ao número de passos a serem realizados, quanto ao tempo necessário à execução.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da Presença de Glúten em Alimentos

Rotulados como Livres de Glúten

Das 70 amostras, 9 (12,9%) apresentaram valores acima de 20 ppm (limite máximo aceito pelo Codex e 11 (15,7%) valores entre 5 ppm (limite inferior de detecção do método imunocromatográfico) e 20 ppm. O fator de correção utilizado nessas amostras foi 2 - baseado em um conteúdo de 50% de prolamina no conteúdo total de glúten -, valor recomendado pelo fabricante e que é amplamente utilizado pela comunidade científica, sendo essas amostras denominadas não corrigidas. Os valores obtidos nas amostras estão apresentados na tabela 4 e, individualmente, no anexo I. Foram feitas duplicatas de 10% das amostras analisadas por R5-ELISA para checar a reprodutibilidade do teste, todos os resultados foram concordantes.

Tabela 4: Apresentação dos valores obtidos nas amostras por R5-ELISA e os resultados do teste imunocromatográfico

Variáveis	n=70	Amostras de 5 a 20ppm	Amostras com > 20ppm	Imunocromatográfico
Tipo de alimento	n de amostras	n (glúten em ppm)	n (glúten em ppm)	resultados positivos
Tempero em pó sabor frango	3	-	-	1
Farinhas	6			
• Milho	4	1 (8,61)	1 (52,97)	2
• Arroz	3	-	-	-
• Mandioca	3	1 (8,63)	-	1
• Soja	1	-	2 (55,15; >200)	2
• Banana		-	-	-
Massa				
• Arroz	3	-	-	-
• Trigo Sarraceno	1	1 (9,68)	-	-
Pão de queijo				
• Pó	2	-	1 (49,24)	1
• Congelado	2	-	-	-
Biscoitos				
• Milho	5	1 (13,56)	-	1
• Arroz	4	-	-	-
• Polvilho	4	-	1 (52,28)	1
• Amendoim	1	1 (19,69)	-	1
• Soja	1	-	-	-
• Quinoa	1	1 (17,73)	-	1
Salgadinhos				
• Milho	4	1 (10,15)	-	1
• Batata Chips	3	-	-	-
• Batata Palha	3	-	-	-
• Arroz	1	1 (5,38)	-	-
• Soja	1	-	-	-
Outros				
• Pão de Milho	1	-	-	-
• Mistura para bolo	1	1 (6,06)	-	1
• Torta congelada	1	-	-	-
• Massa de pizza	1	-	-	-
Barra de Cereal	3	1 (5,68)	-	-
Granola	5	1 (5,03)	3 (27,60; 42,21; 56,51)	4
Pó para sopa				
• Feijão	1	-	1(57,07)	1
• Milho	1	-	-	-

Usando o fator de correção proposto por Wieser e Koehler, que afirmam que o glúten é constituído por cerca de 75% de prolamina – amostras denominadas corrigidas (Wieser e Koehler, 2009) –, os resultados obtidos foram os seguintes: 8

amostras (11,4%) apresentaram valores acima de 20 ppm e 8 (11,4%) entre 5 e 20 ppm. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores encontrados. A figura 11 mostra a distribuição dos valores entre as amostras corrigidas e não corrigidas e a figura 12 apresenta os valores de glúten de cada amostra (os valores de cada amostra, bem como identificação da mesma estão disponíveis no anexo I).

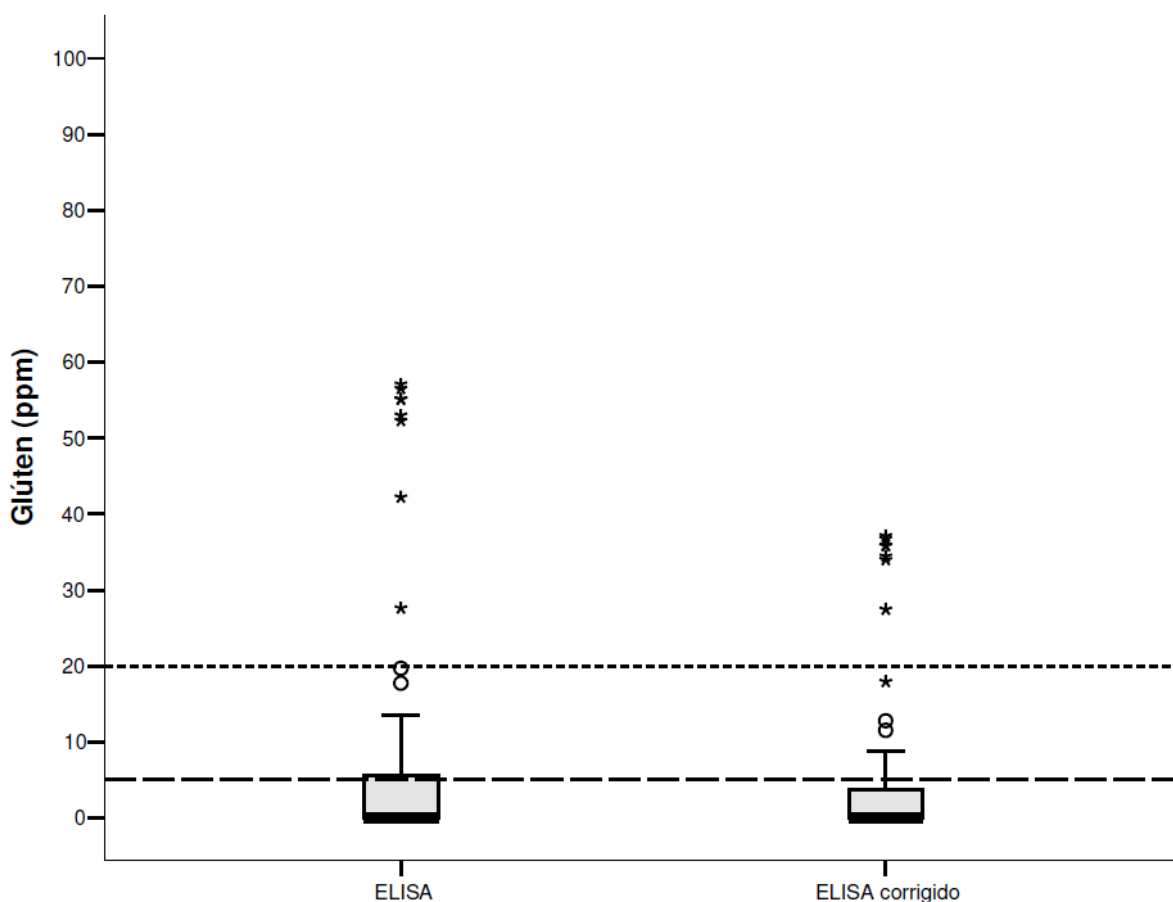


Figura 11: Avaliação do glúten, em ppm, pelo método ELISA baseado no cálculo sugerido pelo fabricante e pelo proposto por Wieser e Koehler (2009). Foi excluída uma amostra (nº 11) com valor superior a 200 ppm para uma melhor visualização do gráfico.

Comparação dos valores obtidos utilizando-se fatores de correção de 1,3 e 2

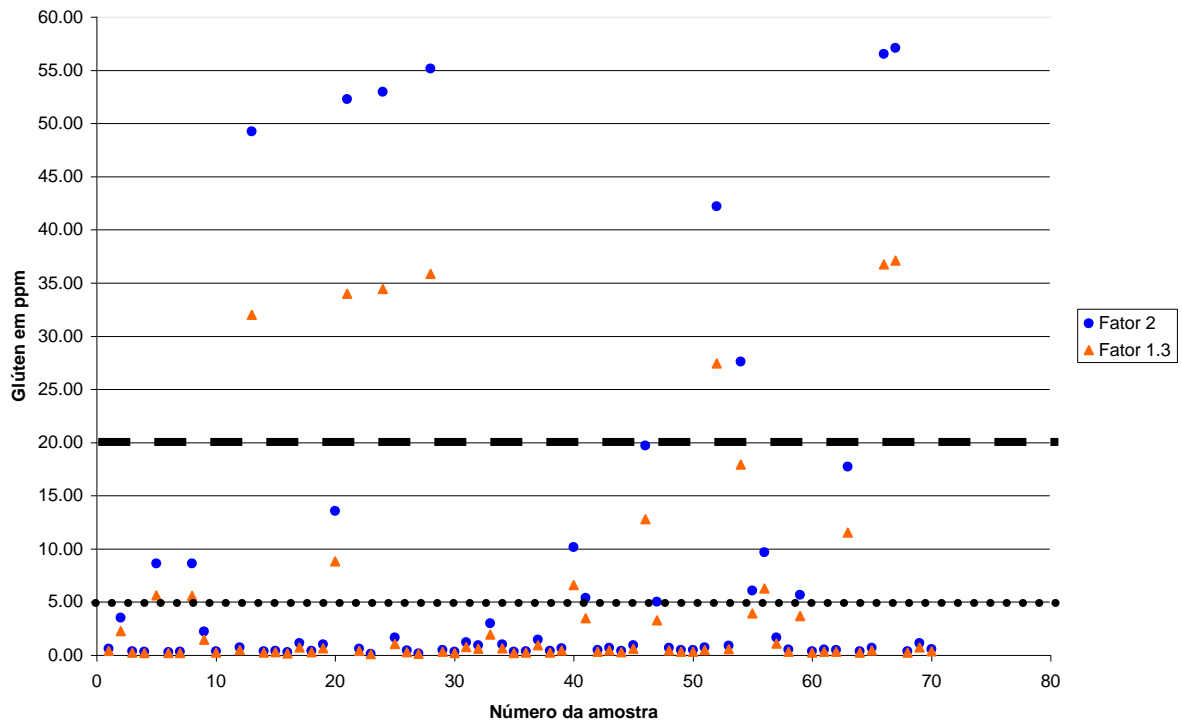


Figura 12: Valor em ppm de glúten das amostras analisadas por R5-ELISA. São mostrados valores utilizando os fatores de correção 2 e 1,3 (ver texto). Para melhor visualização foi excluída a amostra número 11 por apresentar valores acima de 200 ppm de glúten. Em destaque as linhas com os valores de 5 e 20 ppm de glúten.

5.2. Avaliação da Sensibilidade e Especificidade do Método

Imunocromatográfico em Comparação com o Método R5-ELISA

Usando o método imunocromatográfico, 19 (27,1%) amostras se mostraram positivas quanto à presença de glúten.

Utilizamos como pontos de corte: 20 ppm para comparar a adequação do método imunocromatográfico ao valor tolerado pelo Codex; 5 ppm para analisar a fidedignidade do limite inferior de detecção fornecido pela empresa fabricante do

teste, para dessa forma poder garantir que as amostras negativas para esse teste realmente tenham valores abaixo de 5 ppm.

Como pode ser visto na tabela 5, a sensibilidade do método imunocromatográfico foi de 100% (IC 95%: 68,8% a 100%) quando comparado ao método R5-ELISA com resultados acima de 20 ppm e a especificidade foi de 83,6% (IC95%: 72,7%-100%) para valores não corrigidos acima de 20ppm e 82,3% (IC95%: 71,3%-90,3%) para valores corrigidos acima de 20 ppm.

Para os valores de ELISA não corrigidos acima de 5 ppm, a especificidade foi de 98%(IC95%: 90,5%-99,9%) e a sensibilidade de 90%(IC95%: 70,7%-98,3%). A sensibilidade para valores de ELISA corrigidos acima de 5 ppm foi 100% (IC95%: 82,9%-100%) e a especificidade 94,4% (IC95%: 85,6%-98,6%).

Usando-se o teste qui-quadrado de McNemar obtivemos uma diferença estatisticamente significativa na detecção de glúten do método Elisa>20 para os métodos imunocromatográfico ($p = 0,002$) e ELISA > 5($p = 0,001$). No entanto, entre a fita e Elisa>5 não houve diferença significativa ($p = 1,00$), todos os valores de Kappa foram estimados significativos ($p < 0,001$).

Tabela 5: Comparação entre os métodos

Métodos	C/ glúten	S/ glúten
	n (%)	n (%)
Imunocromatográfico	19 (27,1)	51 (72,9)
ELISA \geq 20 ppm	9 (12,9)	61 (87,1)
ELISA corrigido \geq 20 ppm	8 (11,4)	62 (88,6)
ELISA \geq 5 ppm	20 (28,6)	50 (71,4)
ELISA corrigido \geq 5 ppm	16 (22,9)	54 (77,1)

Comparações	S	E	VPP	VPN	Kappa
Imuno x ELISA >20ppm	100	83,6	47,4	100	0,57
Imuno x ELISA cor \geq 20 ppm	100	82,3	42,1	100	0,52
Imuno x ELISA \geq 5 ppm	90	98	94,7	96,1	0,89
Imuno x ELISA cor \geq 5 ppm	100	94,4	84,2	100	0,89

Legenda: ELISA corrigido = ELISA cor – ELISA usando o fator de correção 1,3. Imuno – método imunocromatográfico. S-sensibilidade, E-especificidade, VPP-valor preditivo positivo, VPN-valor preditivo negativo.

5.3. Comparação entre Produtos Procedentes de Supermercados e de Lojas Especializadas em Produtos Dietéticos

Foi feita uma análise comparando os resultados obtidos nas amostras adquiridas em supermercados com aqueles das adquiridas em lojas especializadas em produtos dietéticos.

Para amostras com valor de R5-ELISA > 5 ppm foi encontrada uma tendência ($p=0,067$) a se encontrar mais produtos com presença de glúten nas ditas lojas do que em supermercados(tabela 6).

Tabela 6: comparativo da presença de glúten nas amostras rotuladas como livres de glúten adquiridas em supermercados e em lojas especializadas em produtos dietéticos.

	Supermercados		Lojas especializadas		
	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	
ELISA >20ppm	5	35	4	26	p=0,918
ELISA >5ppm	8	32	12	18	p=0,067
Imunocromatográfico	9	31	10	20	p=0,313

6. DISCUSSÃO

6.1. Amostra Analisada

A nossa amostra visou englobar alimentos utilizados pelos celíacos em substituição àqueles que contêm glúten. Essa escolha foi baseada na experiência do grupo no manejo da dieta desse tipo de pacientes. Não foram analisadas amostras vendidas à granel para evitar eventuais contaminações do produto pelo ambiente e pelo manuseio.

O resultado obtido nesse estudo é preocupante, pois cerca de 13% das amostras apresentaram conteúdo de glúten acima do tolerado pelo Codex para alimentos naturalmente sem glúten. Mais de um quarto das amostras apresentou valores de glúten acima de 5 ppm. Tais resultados são extremamente inquietantes, uma vez que a ausência de glúten na dieta é essencial ao tratamento da DC e, a não adesão à mesma, pode acarretar em agravamentos inerentes à patologia.

Das 70 amostras analisadas, apenas uma, de farinha de soja, apresentou valores superiores a 200 ppm de glúten. A quantificação dessa amostra não foi feita inicialmente com exatidão em virtude do seu conteúdo de glúten estar fora da curva de leitura. Fizemos, então, uma segunda leitura usando diluição maior para contornar o efeito gancho, (ver adiante em 6.4.3). Nessa última avaliação obtivemos uma leitura de 642 ppm. Embora o fabricante do kit R5-ELISA usado nessa pesquisa não faça nenhuma consideração especial em relação a produtos baseados em soja, resultados inconsistentes em relação ao conteúdo de glúten no leite de soja já foram descritos por Immer e Haas-Lauterbach (Immer e Haas-Lauterbach, 2005). Esses

pesquisadores encontraram resultados próximos a 100 ppm em amostras extraídas por etanol, enquanto as mesmas amostras extraídas usando agentes redutores e desagregantes apresentaram resultados inferiores ao limite de detecção do teste (3,1 ppm de glúten) (Immer e Haas-Lauterbach, 2005). A empresa R-Biopharm, que produz o teste imunocromatográfico utilizado no presente estudo, também produz um teste R5-ELISA. E, recentemente, relatou resultados discrepantes com o uso de etanol para extração de glúten em produtos à base de soja (R-Biopharm, 2010). A interferência do método de extração pode ter sido o motivo pelo qual encontramos resultados positivos em uma de três amostras de farinha de soja (que apresentou 55,13 ppm de glúten). O teor de glúten de 642 ppm pode ter sido superestimado, mas tal valor, tão elevado, não pode ser considerado como consequência do método de extração. Outros produtos à base de soja (farinha, biscoito e salgadinho – tabela 4) foram analisados, passaram pelo mesmo processo de extração de glúten, e não apresentaram resultados positivos.

Das 17 farinhas analisadas, 5 apresentaram valores acima de 5 ppm de glúten (tabela 4). Dentre as amostras de farinha de milho, uma delas apresentou valor acima de 20 e outra valor acima de 5 ppm de glúten. Esse achado é preocupante, uma vez que esses produtos são frequentemente utilizados na dieta dos celíacos em substituição àqueles com glúten.

Das 5 amostras de granola, 4 apresentaram valores de glúten superiores a 5 ppm. Dessas, 3 tinham mais de 20 ppm de glúten. Das 3 barras de cereal analisadas em uma se detectou mais de 5 ppm de glúten. Esses resultados põem em questão a adequação desses produtos, à base de cereais e castanhas para os pacientes celíacos. Talvez esses cereais não sejam produzidos de forma a evitar a

contaminação por glúten, o que pode ocorrer desde a produção no campo até o processamento industrial.

Entre os 16 biscoitos analisados, 4 tiveram teor de glúten superior a 5 ppm. Dentre eles, uma marca de biscoito de polvilho, com resultado superior a 20 ppm de glúten (52,28). Uma vez que os pacientes de doença celíaca recorrem a esse tipo de alimentos com frequência, é de extrema importância uma análise mais aprofundada desse tipo de alimentos.

Os “salgadinhos”, dentre os quais constatamos dois com conteúdo de glúten acima de 5 e abaixo 20 ppm, se mostraram como uma alternativa mais confiável, desconsiderando seu valor nutricional, aos celíacos.

De posse desses dados, podemos concluir que o critério adotado por uma significativa porcentagem dos fabricantes para a rotulagem dos alimentos como livres de glúten é questionável. Tal conclusão reforça a obrigatoriedade de um método de controle para a presença de glúten nos alimentos em nosso país, bem como o estabelecimento de um valor aceitável da proteína em produtos rotulados como livres da mesma.

6.2. Dieta Sem Glúten e Qualidade de Vida dos Celíacos

Qualidade de vida, segundo definição da organização mundial da saúde, é a percepção do indivíduo em relação à sua vida nos contextos cultural e do sistema de valores em que ele vive, bem como em relação às suas expectativas e metas (Herrman, Metelko, Szabo *et al.*, 1993).

Existem vários estudos de avaliação da qualidade de vida dos portadores de DC. Por exigir a adesão a uma dieta diferenciada do grupo social em que o indivíduo está inserido, a DC pode comprometer o ajuste social e auto-satisfação do celíaco. Apesar da melhora em aspectos de saúde física alcançados pela DSG, como infertilidade, fadiga e depressão (Hall, Rubin *et al.*, 2009), por ser uma dieta restritiva, adultos celíacos relatam decréscimo na qualidade de vida por terem dificuldade para realizar tarefas corriqueiras, como comer em restaurantes, viajar e relataram impacto no convívio familiar. A natureza restritiva da dieta faz com que esses indivíduos limitem suas atividades sociais (Hallert, Sandlund e Broqvist, 2003; Lee e Newman, 2003; Zarkadas, Cranney, Case *et al.*, 2006).

A adesão à DSG é fortemente associada a influências cognitivas, sociais e sócio-culturais (Butterworth, Banfield, Iqbal *et al.*, 2004; Rostom, Murray *et al.*, 2006). Recentemente um estudo com uma coorte de adolescentes na Itália identificou uma estreita relação entre boa integração social na escola e obediência à dieta (Errichiello, Esposito, Di Mase *et al.*, 2010). A adesão dos celíacos às associações de portadores da doença (no Brasil, ACELBRA) exerce influência positiva, no sentido que esses pacientes têm um aporte de informações maior e melhor entendimento da dieta (Butterworth, Banfield *et al.*, 2004).

Diferente dos adultos, pacientes pediátricos e adolescentes em uma DSG por um período extenso, mostraram uma qualidade de vida semelhante à de indivíduos saudáveis (Mustalahti, Lohiniemi, Collin *et al.*, 2002; Mearin, 2007; Van Koppen, Schweizer, Csizmadia *et al.*, 2009). Em estudo realizado por nosso grupo, comparando a qualidade de vida de crianças celíacas e não celíacas, de 6 a 12 anos, foram mostrados, surpreendentemente para nós, melhores escores entre

aqueles que eram portadores de DC. Os escores de qualidade de vida foram dependentes de sexo e idade, sendo que os celíacos do sexo masculino apresentaram melhores escores as do feminino, e que crianças celíacas de 6 a 9 anos mostraram qualidade de vida melhorada em relação às crianças da mesma faixa etária e aos celíacos mais velhos (Rodrigues, Silveira e Fleck, 2007).

Além da dieta restritiva, esses pacientes ainda enfrentam o problema de que alimentos sem glúten têm, de uma forma geral, preços mais elevados do que seus equivalentes com glúten. A Associação dos Celíacos de Santa Catarina apresentou um estudo em que entre as principais dificuldades apontadas pelos celíacos para o cumprimento da DSG é a dificuldade financeira (39%) e a falta de alimentos disponíveis (57%) (Cassol e Pellegrin, 2006). Outro problema encontrado pelos portadores de DC para a adesão à dieta é a confiança na rotulagem desses alimentos. Os resultados do nosso estudo realmente parecem alimentar essa desconfiança.

6.3. Comparação Entre os Métodos R5-ELISA e Fitas Imunocromatográficas

Nesse estudo o método R5-ELISA foi utilizado como padrão áureo por ser um método quantitativo, com um bom limite de detecção de glúten e por ser validado por testes interlaboratoriais. A escolha do kit Transia[®]Plate Prolamins, da Ingenasa, se deu por ser este o método com melhor limite de detecção disponível comercialmente.

As fitas imunocromatográficas RidaQuick, da R-Biopharm foram escolhidas por apresentarem o limite de detecção de glúten mais baixo entre os testes desse mesmo tipo e pela praticidade na sua realização.

Fizemos a avaliação comparativa entre os métodos utilizando como ponto de corte os 20 ppm de glúten estabelecidos pelo Codex para esse tipo de alimento. A escolha desse valor se baseou na sua ampla aceitação pela comunidade científica (Valdés, Garcia *et al.*, 2003; Mendez, Vela, Immer *et al.*, 2005; Hischenhuber, Crevel, Jarry *et al.*, 2006; FDA, 2007; Codex, 2008) e por ser mais rígido que o limite permitido pela AOAC(100 ppm). Tal valor foi utilizado com o intuito de analisar se as amostras estão dentro do aceitável pelo Codex para serem consideradas como livres de glúten. O outro ponto de corte escolhido foi 5 ppm de glúten, esse valor foi baseado no limite de detecção do método imunocromatográfico.

Para comparar o teste imunocromatográfico com o teste de R5-ELISA foi utilizado o valor de 2 para a correção do conteúdo de glúten (será discutido em tópico posterior).

A comparação do teste imunocromatográfico com os resultados do teste R5-ELISA acima de 5 ppm de glúten apresentou ótimos valores preditivos positivo e negativo e mostrou uma concordância muito boa, o que comprova a adequação do uso dessas fitas para garantir que as amostras tenham um valor de glúten inferior ou muito próximo a 5 ppm, uma vez que o resultado desse teste seja negativo.

Quando comparamos o teste imunocromatográfico aos resultados de R5-ELISA maiores que 20 ppm de glúten, o valor preditivo negativo dessa análise foi de 100%, mostrando que amostras de glúten que apresentam resultado negativo na fita

têm, realmente, valor de glúten inferior a 20 ppm. O resultado preditivo positivo baixo, nesse caso, se explica por o método imunocromatográfico ser apenas qualitativo e detectar glúten em concentrações a partir de 5 ppm, considerando como positivas amostras que apresentam concentração entre 5 e 20 ppm que ao R5-ELISA com o ponto de corte de 20 ppm são descritas como não contaminadas. Dessa forma, considerando as 20 ppm de glúten como um valor tolerável, as fitas imunocromatográficas são um excelente método de triagem, onde alimentos com resultados negativos à presença de glúten podem ser considerados seguramente livres de glúten.

Se usarmos um critério mais rigoroso, a exemplo do que já existe na Austrália e Nova Zelândia, de 5 ppm de glúten (New Zealand and Australia, 2010), as fitas são extremamente adequadas e garantem uma maior margem de segurança para os pacientes celíacos consumirem esses alimentos.

6.4. Comparativo Entre as Amostras Obtidas em Supermercados e em Lojas Especializadas em Produtos Dietéticos

A comparação dos dados das amostras adquiridas em supermercados com o das lojas especializadas em produtos dietéticos foi feita por termos partido do pressuposto que, por serem estabelecimentos voltados a um público diferenciado, essas lojas possivelmente apresentariam um melhor controle de seus produtos. Como a amostra não foi desenhada com o objetivo de comparar a quantificação de glúten de dois diferentes tipos de estabelecimentos comerciais, os achados foram

similares, mas não são conclusivos. Com base nessa comparação podemos apenas inferir que a qualidade, quanto à presença de glúten, dos alimentos comercializados pelos dois tipos de estabelecimentos é equivalente.

6.5. Extração da Fração Tóxica e Fator de Correção

A extração da fração tóxica aos celíacos pode ser feita usando um reagente composto por 2-mercaptoetanol – agente redutor, usado para desnaturar proteínas por sua propriedade de romper pontes dissulfeto – e hidrocloreto de guanidina (Garcia, Llorente *et al.*, 2005) – desnaturante iônico, que permite solubilizar as proteínas – diluídos em tampão fosfato salino (PBS). Esse reagente é comercializado sob o nome comercial de *Coquetel Méndez*. O 2-mercaptoetanol e o hidrocloreto de guanidina são irritantes, tanto para a pele quanto à via respiratória, podendo ser nocivos ao sistema nervoso central se houver exposição crônica. Por esse motivo, apesar de reconhecermos a qualidade da extração do *Coquetel Méndez*, o mesmo não foi adotado no presente estudo. Pretendíamos desenvolver um método que fosse tão prático a ponto de ser adotado por celíacos e seus familiares. Por essa razão também não foram analisados alimentos com chocolate. Pelo seu elevado conteúdo de polifenóis, deve ser usado um reagente à base de gelatina de peixe para aumentar a sensibilidade do método e impedir a inibição da detecção de glúten. O que exige um passo a mais no processo de extração da proteína, tornando mais trabalhosa a avaliação do alimento.

Outra forma de extração é com solução alcoólica de etanol a 60% em água. As proteínas do glúten são insolúveis em água, mas solúveis em solução alcoólica. Embora não apresente uma extração tão eficiente quanto a extração pelo reagente

citado anteriormente, é de fácil manuseio e aquisição. Foi demonstrado em estudo de Garcia *et al.*, que a extração por etanol apresenta resultados semelhantes ao coquetel em alimentos não processados e um resultado inferior quando se refere a alimentos aquecidos a mais de 80°C (Garcia, Llorente *et al.*, 2005).

Em 2009, Wieser e Koehler apresentaram um estudo questionando a validade do fator de correção 2 usado para calcular o conteúdo total de glúten com base na detecção de prolamina (Wieser e Koehler, 2009). Baseados na informação desses autores, usamos o fator de correção de 1,3 para nossas amostras a fim de comparar com os resultados obtidos com o fator proposto pelo fabricante. Essa análise, mostrada anteriormente na figura 11, não apresentou alterações estatisticamente significativas nos resultados das amostras. Dessa forma, optamos pela utilização do fator proposto pelo fabricante, que é amplamente utilizado e aceito na comunidade científica (Valdés, Garcia *et al.*, 2003; Immer e Haas-Lauterbach, 2005; Mendez, Vela *et al.*, 2005; Hischenhuber, Crevel *et al.*, 2006; Codex, 2008).

6.6. Alimentos com o Rótulo “Contém Glúten”: Quantificação da proteína

O método de R5-ELISA se mostrou inadequado para detecção de altas quantidades de glúten. Antes de se fazer a análise dos alimentos deve-se ter em mente o conteúdo esperado de glúten da amostra para calcular a diluição a ser utilizada (tabela 7).

Tabela 7: diluição das amostras de acordo com o conteúdo esperado de glúten.

Conteúdo esperado de glúten	Diluição
< 50 ppm	1:25 e 1:50
50 – 100 ppm	1:50 e 1:100
100 – 200 ppm	1:100 e 1:200
200 – 300 ppm	1:200 e 1:400
300 – 600 ppm	1:400 e 1:800
Conteúdo desconhecido	1:50, 1:200 e 1:800

Inicialmente utilizamos este teste para quantificar glúten em alimentos que afirmavam conter glúten, porém a técnica se mostrou influenciada pelo efeito prozona ou gancho, no qual amostras diluídas apresentam valores maiores do que as não diluídas. O efeito gancho se deve à saturação do sistema, o que leva a um declínio da intensidade do sinal (Butch, Tang e Standage, 2000; Hoofnagle e Wener, 2009), (figura 13). Para contornar esse efeito foram necessárias diluições de até 1:20.000, o que reduz significativamente a confiabilidade do teste.

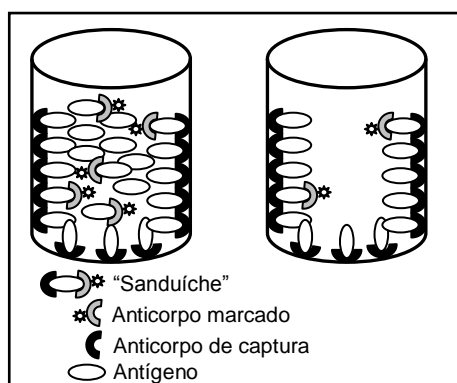


Figura 13: Representação esquemática do efeito prozona, à esquerda a o excesso de anticorpos impede a formação adequada do “sanduíche” entre anticorpo de captura+antígeno+anticorpo marcado. À direita, quando fase líquida é dispensada, vários antígenos ligados a anticorpos marcados são descartados junto. Dessa forma a leitura de concentração resulta em valores menores do que os reais.

Fonte: adaptado (Vilar, Naves e Gadelha, 2003)

Para fazer a quantificação de glúten em alimentos com altos conteúdos existem outros métodos, como o de Lowry (descrito em 1951), baseado em proteínas solúveis. Tal procedimento permite que se tenha uma idéia do conteúdo de glúten de maneira simples e econômica, porém não é um método adequado para se analisar presença de pequenas quantidades dessa proteína, além de sofrer interferência de várias substâncias.

6.7. Qual o Valor de Glúten Considerado “Aceitável” para os Celíacos?

Há uma relativa escassez de dados bibliográficos no que se refere à análise de glúten em alimentos comerciais. Apesar da importância do assunto, os dados encontrados são, em sua maioria, análises de técnicas de detecção usando apenas padrões com valores conhecidos, não as usando para avaliar produtos comerciais. Nossos resultados mostram que essa análise é de extrema importância, visto que mais de um quarto das amostras do nosso estudo apresentou valores acima de 5 ppm. Tendo por base a legislação brasileira, que exige a rotulagem “Contém glúten” ou “Não contém glúten”, sem um limite de tolerância definido, essas foram rotuladas erroneamente ou contaminadas em alguma fase de sua produção.

Estudos observacionais demonstraram que a adesão à DSG possibilita uma recuperação histológica gradativa, embora possa levar mais de dois anos ou até, em alguns casos, não ocorrer uma recuperação completa. A menor recuperação histológica ou ausência da mesma foi relacionada à falta de cumprimento da DSG e idade acima de 30 anos (Wahab, Meijer e Mulder, 2002; Lee, Lo, Memeo *et al.*, 2003; Tursi, Brandimarte, Giorgetti *et al.*, 2006). A longo termo a DSG diminui o risco

de osteoporose, deficiência nutricional e o desenvolvimento de doenças autoimunes associadas à DC (Hall, Rubin *et al.*, 2009).

Recentemente Tursi *et al* apresentaram um estudo no qual apenas 18 de 549 (3,3%) dos pacientes celíacos em DSG desenvolveram complicações, mostrando, mais uma vez, a importância da adesão a essa dieta (Tursi, Giorgetti, Brandimarte *et al.*, 2009).

Devemos recordar que pacientes celíacos podem desenvolver complicações graves, tais como jejuno-ileíte ulcerativa, enteropatia associada a linfoma de células T e DC refratária. Nesse contexto, conforme Di Sabatino e Corazza essas doenças constituiriam um *continuum*, no qual as alterações fenotípicas dos linfócitos intraepiteliais e os rearranjos cromossômicos causariam a perpetuação do dano intestinal. Para os autores, a forma refratária da doença poderia estar relacionada à ingestão, intencional ou não, de glúten (Di Sabatino e Corazza, 2009).

Quando falamos em alimentos sem glúten subentende-se que a presença desse complexo protéico seja zero, porém, ainda não são disponíveis comercialmente técnicas que garantam a inexistência de glúten em alimentos. O teste que mais se aproximou disso foi o método de espectroscopia de correlação de fluorescência que se mostrou sensível para a detecção de até 0,006 ppm de glúten (Varriale, Rossi, Staiano *et al.*, 2007), mas é um teste que requer equipamentos extremamente custosos. Como ainda não há como garantir a ausência completa de glúten nos produtos, existe uma tolerância em relação ao conteúdo do mesmo variando entre as entidades reguladoras (tabela 8).

Tabela 8: concentrações de glúten toleradas por órgãos fiscalizadores e denominação dos produtos de acordo com o conteúdo de glúten.

Órgão	Valor de glúten tolerado	Referência
Food and Drug Administration	≤ 20 ppm ¹ = <i>gluten-free</i>	(FDA, 2007)
Food Standards Agency	≤ 20 ppm = <i>gluten-free</i> ≤ 100 ppm = <i>very low gluten</i>	(EC, 2009)
Codex Alimentarius Commission	≤ 20 ppm = <i>gluten free</i> ≤ 100 ppm = <i>rendered gluten free</i> ²	(Codex, 2008)
Food Standard Code	≤ 5 ppm = <i>gluten free</i> ≤ 100 ppm = <i>low gluten</i>	(New Zealand and Australia, 2010)
ANVISA	0 ³ = sem glúten	(Brasil, 2003)

Legenda: ANVISA – Agência nacional de vigilância sanitária. ¹Proposta de lei; ² especialmente processados para reduzir o conteúdo de glúten a um nível entre 20 e 100 ppm; ³Não define valor tolerado

Embora existam na legislação brasileira normas que exijam a rotulagem quanto à presença ou ausência de glúten nos alimentos, não é estabelecido um controle laboratorial para essa rotulagem. Não existe, no Brasil, um método padrão para controle de qualidade nem um nível de conteúdo de glúten aceitável. Na Austrália há a definição do rótulo *gluten-free* para alimentos com conteúdo de glúten inferior a 5 ppm, para produtos com baixo conteúdo de glúten (abaixo de 100 ppm) é utilizado o rótulo *low gluten* (New Zealand and Australia, 2010). O Codex considera aceitável um conteúdo de 20 ppm de glúten para alimentos naturalmente livres de glúten e 200 ppm para alimentos com glúten retirado para serem considerados “sem glúten” (Codex, 2008). Já a legislação brasileira não define um valor a ser tolerado, o que permite a interpretação de que alimentos rotulados como “sem glúten” realmente o sejam.

Um fator que deve ser analisado para considerar uma “quantidade tolerável” de glúten em um alimento é a quantidade de alimento ingerida. Por exemplo, considerando-se o valor de 10 mg de glúten como seguro para celíacos (Catassi,

Fabiani *et al.*, 2007) e um valor de glúten de até 20 ppm para aceitar um alimento como livre de glúten, teoricamente, um celíaco poderia ingerir até 500 gramas desse alimento por dia sem danos à sua saúde. Tratando como aceitável um valor de 5 ppm de glúten para o alimento livre de glúten essa ingestão aceitável subiria para até 2 kg de alimento por dia. O uso das fitas imunocromatográficas para a avaliação da presença ou ausência de glúten nos permitiria indicar, para celíacos, com mais tranquilidade, alimentos com resultado negativo quanto à presença de glúten.

Nossos achados trouxeram à tona mais um problema dos celíacos, o de não poder confiar completamente nos rótulos dos produtos quando os mesmos afirmam não conter glúten. Enquanto não houver uma política bem definida para a rotulagem de alimentos considerados livres de glúten, que estabeleça valores aceitáveis e exija a comprovação laboratorial para esta constatação, resta aos celíacos se empenharem junto aos fabricantes para que os mesmos comprovem a incolumidade dos seus produtos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1. Progressos na Doença Celíaca

- **Novas ferramentas para o diagnóstico**

O anticorpo anti-peptídeo de gliadina deamidada (AGD) vem sendo bastante estudado na última década como um teste sorológico para o diagnóstico de DC, foi mostrada uma equivalência entre o teste IgG-AGD e o IgA-tTG (Vermeersch, Geboes, Mariën *et al.*, 2010), essa ferramenta é de grande utilidade, principalmente nos casos de deficiência seletiva de IgA, para os quais os métodos diagnósticos baseados em anticorpos IgG não são tão eficientes.

Foi demonstrado que todos pacientes celíacos com atrofia vilositária evidente apresentam depósitos de anticorpos antitransglutaminase 2 (TG2) no intestino delgado, mesmo aqueles com sorologia negativa. Tal achado proporciona uma excelente ferramenta na diferenciação entre DC e outras causas de atrofia vilositária (Salmi, Collin, Korponay-Szabó *et al.*, 2006). Além disso, esses depósitos de anticorpos IgA anti TG2 no intestino se mostraram como um método excelente de detecção precoce da DC, uma vez que em 93% dos casos os depósitos são identificáveis antes mesmo do desenvolvimento de atrofia vilositária, (Salmi, Collin, Järvinen *et al.*, 2006).

O uso de *microarrays* está sendo usado modernamente como uma estratégia para identificação de novas ferramentas diagnósticas e para melhor compreensão da fisiopatologia da DC. Di Niro *et al* identificaram, por *microarray* de antígenos, potenciais autoantígenos que, segundo os autores, possibilitarão analisar subgrupos

de pacientes em diferentes estágios da doença (di Niro, D'Angelo, Marzari *et al.*, 2009).

- **Modalidades terapêuticas**

O melhor conhecimento dos aspectos imunopatogênicos da DC e os enormes progressos alcançados na biotecnologia relacionada a alimentos possibilitaram a pesquisa de outras modalidades terapêuticas, além da completa exclusão do glúten da dieta dos celíacos.

Um dos exemplos de recente tentativa terapêutica para a DC é a inibição da disfunção na barreira intestinal característica dos celíacos. A barreira intestinal deve ter a capacidade de distinguir nutrientes que são necessários e permitir sua passagem. Quando essa barreira é violada, há um desequilíbrio causando reação inflamatória. Para o desenvolvimento da doença intestinal e sua persistência três fatores se fazem necessários: rompimento da membrana, contato do conteúdo luminal com a submucosa e a consequente resposta imune (figura 14) (Paterson e Turner, 2008). Uma das causas do aumento da permeabilidade intestinal é a ligação da gliadina com o receptor CXCR3, essa interação induz a liberação de zonulina que provoca um relaxamento das *tight junctions* e, conseqüentemente, passagem da gliadina para a submucosa (Lammers, Lu, Brownley *et al.*, 2008). O bloqueio medicamentoso da Zonulina, feito por antagonistas da Zonulina foi sugerido como tratamento da DC, visando à estabilidade da permeabilidade intestinal (Gadewar e Fasano, 2005). O Acetato de Larazotide, um peptídeo sintético, foi apresentado recentemente como inibidor do relaxamento das *tight junctions* com uma boa

tolerância pelos pacientes e eficaz na proteção às sequelas clínicas resultantes da exposição ao glúten pelos pacientes celíacos (KELLY, LEON, GREEN *et al.*, 2009).

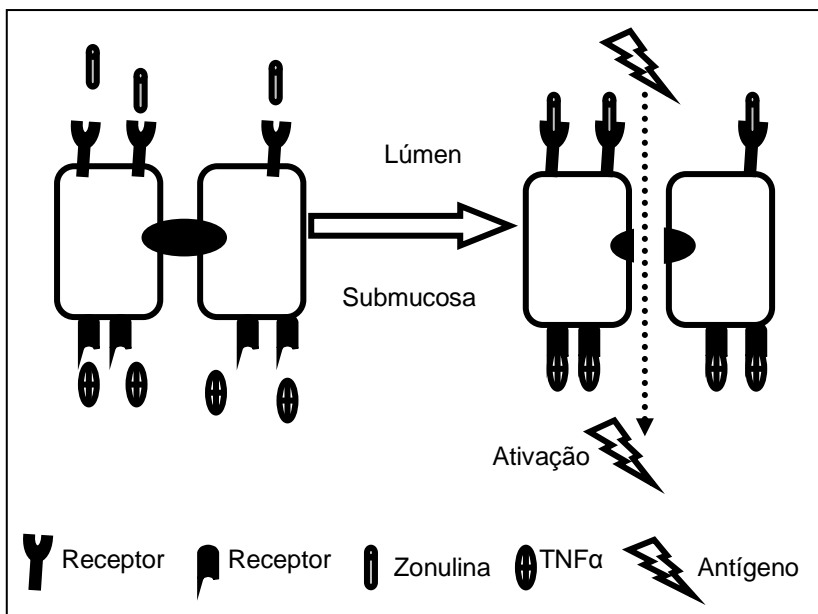


Figura 14: Disfunção da barreira intestinal: à esquerda uma mucosa normal, à direita, uma mucosa rompida por ação da Zonulina, permitindo a entrada de antígeno, o que desencadeia uma reação imunológica.

Fonte: Adaptado de (Paterson e Turner, 2008)

A diminuição da toxicidade do glúten também pode ser conseguida através de estratégias que atuem antes dele atingir a mucosa intestinal. Uma dessas é utilizar o recurso da engenharia genética para produzir cereais com menor (ou ausente) conteúdo de gliadina, pela incorporação de sequências menos tóxicas. Diferentes métodos estão sendo recentemente descritos (Bhalla, 2006; Baldassarre, Laneve, Grosso *et al.*, 2008).

O conhecimento de que um dos peptídeos “chave” no estímulo às células T nos celíacos é resistente à quebra por proteases intestinais, determinou o interesse em digerir os peptídeos, através de suplementos dietéticos, para remover a toxicidade do glúten. Recentemente foi demonstrado que uma classe de enzimas bacterianas, proil endopeptidases (PEP), podem degradar fragmentos de gliadina e

neutralizar a toxicidade do glúten (Shan, Molberg *et al.*, 2002; Matysiak-Budnik, Candalh, Cellier *et al.*, 2005; Shan, Mathews e Khosla, 2005). Abre-se, portanto, a possibilidade de suplementação com enzimas (incorporando o uso de PEP) para reduzir a imunogenicidade do glúten.

Na última década vem, sendo pesquisada a viabilidade de vacinas para a prevenção de DC. Anderson *et al* desenvolveram um vacina que combina dois peptídeos imunogênicos e está atualmente sob investigação em ensaios clínicos (Anderson, Degano, Godkin *et al.*, 2000; Keech, Dromey e Chen, 2009)

7.2. Perspectivas

Enquanto esses avanços não estão disponíveis à população, nosso esforço deve ser dirigido para que a alimentação dos celíacos seja segura. Se considerarmos que a prevalência de DC no Brasil seja, como na maioria dos outros países, em torno de 1% da população geral, há cerca de 2 milhões de afetados pela doença. A grande maioria dos pacientes ignora a sua condição. Com o avanço das técnicas diagnósticas, um número crescente de celíacos está sendo identificado. A introdução de um teste para detectar o glúten nos alimentos comprovadamente sensível, confiável e que pode ser realizado sem grande aparato tecnológico deverá contribuir para uma melhoria na qualidade de vida desses indivíduos. O teste imunocromatográfico que tem, ainda, as vantagens de ser simples e barato poderá, talvez, possibilitar aos próprios pacientes testar seus alimentos. Para que isso seja possível, nosso grupo estuda a possibilidade de, baseado no método imunocromatográfico, desenvolver técnica de detecção do glúten sem uso de equipamentos laboratoriais.

8. CONCLUSÕES

Com base nos resultados que obtivemos podemos concluir que:

1. Foi detectada a presença de glúten em alimentos rotulados como sem glúten;
2. Em 12,9% dos alimentos analisados foi detectada a presença de glúten em níveis superiores ao aceito pelo Codex (até 20 ppm) pela técnica de R5-ELISA. Quando o teor estabelecido como tolerável foi de 5 ppm, o percentual de positividade foi de 28,6%.
3. Baseado no teste imunocromatográfico, os resultados do presente estudo revelaram positividade para a presença de glúten em 27,1% da amostra.
4. Os resultados do teste imunocromatográfico apresentaram boa concordância com o teste R5-ELISA (de 5 ppm ou mais) ($\kappa=0,89$). Em relação ao valor de 20 ppm de glúten ou mais, obtivemos um valor preditivo negativo de 100%, porém a concordância entre os testes não foi boa ($\kappa=0,57$).
5. Se aceitarmos, para a rotulagem dos alimentos livres de glúten, um teor de glúten de até 5 ppm os dois testes se equivalem.
6. O uso do teste imunocromatográfico é uma excelente opção para garantir aos celíacos a qualidade do seu alimento em relação ao teor de glúten.

7. BIBLIOGRAFIA

ABREU, R. W. D.; BARBOSA, S. F. C.; TORRE, J. C. D. M. D.; LICHTIG, J.; ZENEBON, O. Detecção de glúten em alimentos por meio de ELISA. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 3, n. 65, p. 176-80, 14/07/2007 2006. ISSN 0073-9855.

AL-TOMA, A.; VERBEEK, W. H. M.; HADITHI, M.; VON BLOMBERG, B. M. E.; MULDER, C. J. J. Survival in refractory coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma: Retrospective evaluation of single-centre experience. **Gut**, v. 56, n. 10, p. 1373-1378, 2007.

ANDERSON, R. P.; DEGANNO, P.; GODKIN, A. J.; JEWELL, D. P.; HILL, A. V. S. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. **Nature Medicine**, v. 6, n. 3, p. 337-342, 2000.

AOAC. **Gliadin as a Measure of Gluten in Foods. Colorimetric Monoclonal Antibody Enzyme Immunoassay Method. First Action 1991. Final Action 2001**, 2005.

ARENTZ-HANSEN, H.; FLECKENSTEIN, B.; MOLBERG, O.; SCOTT, H.; KONING, F.; JUNG, G.; ROEPSTORFF, P.; LUNDIN, K. E.; SOLLID, L. M. The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. **PLoS Med**, v. 1, n. 1, p. e1, Oct 2004. ISSN 1549-1676 (Electronic).

BALDASSARRE, M.; LANEVE, A. M.; GROSSO, R.; LAFORGIA, N. Celiac disease: pathogenesis and novel therapeutic strategies. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 8, n. 3, p. 152-8, Sep 2008. ISSN 1871-5303 (Print).

BETHUNE, M. T.; BORDA, J. T.; RIBKA, E.; LIU, M. X.; PHILLIPPI-FALKENSTEIN, K.; JANDACEK, R. J.; DOXIADIS, G. G. M.; GRAY, G. M.; KHOSIA, C.; SESTAK, K. A non-human primate model for gluten sensitivity. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, 2008.

BHALLA, P. L. Genetic engineering of wheat--current challenges and opportunities. **Trends Biotechnol**, v. 24, n. 7, p. 305-11, Jul 2006. ISSN 0167-7799 (Print).

BODE, S.; GUDMAND-HOYER, E. Symptoms and haematologic features in consecutive adult coeliac patients. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 31, n. 1, p. 54-60, 1996.

BONAMICO, M.; NENNA, R.; LUPARIA, R. P. L.; PERRICONE, C.; MONTUORI, M.; LUCANTONI, F.; CASTRONOVO, A.; MURA, S.; TURCHETTI, A.; STRAPPINI, P.; TIBERITI, C. Radioimmunological detection of anti-transglutaminase autoantibodies in human saliva: A useful test to monitor coeliac disease follow-up. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, n. 3, p. 364-370, 2008.

BRANDT, K. G.; SILVA, G. A. [Seroprevalence of celiac disease at a general pediatric outpatient clinic]. **Arq Gastroenterol**, v. 45, n. 3, p. 239-42, Jul-Sep 2008. ISSN 1678-4219 (Electronic)

0004-2803 (Linking).

BRASIL. **Lei nº 8543, de 23 de dezembro de 1992. Determina a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten.** Diário Oficial da União: Brasília 1992.

_____. **Resolução RDC ANVISA/MS nº. 259. Regulamento Técnico para Rotulagem de alimentos e bebidas embalados que contenham glúten.** Brasília, DF: Diário Oficial da União 2002.

_____. **Lei nº 10.674 de 16 de Maio de 2003. Obriga a que todos produtos alimentícios informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva de controle da doença celíaca.** Diário Oficial da União. 19 de maio de 2003 2003.

BUTCH, A. W.; TANG, M. E.; STANDAGE, J. C. Dilution protocols for detection of hook effects/prozone phenomenon [3] (multiple letters). **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 1719-1721, 2000.

BUTTERWORTH, J. R.; BANFIELD, L. M.; IQBAL, T. H.; COOPER, B. T. Factors relating to compliance with a gluten-free diet in patients with coeliac disease: Comparison of white Caucasian and South Asian patients. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 5, p. 1127-1134, 2004.

CAMPOS, J. V. A biópsia peroral do intestino delgado na criança. Bases para o estudo da mucosa entérica. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 7, p. 107-110, 1970.

CASSOL, C. A.; PELLEGRIN, C. P. D. perfil dos portadores de doença celíaca associados na ACELBRA/SC. **Jornal Sem Glúten + Saúde**, v. A7, n. Maio 28, 2006.

CATALDO, F.; LIO, D.; MARINO, V.; PICARELLI, A.; VENTURA, A.; CORAZZA, G. R. IgG(1) antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patients with selective IgA deficiency. **Gut**, v. 47, n. 3, p. 366-369, 2000.

CATASSI, C.; FABIANI, E.; IACONO, G.; D'AGATE, C.; FRANCAVILLA, R.; BIAGI, F.; VOLTA, U.; ACCOMANDO, S.; PICARELLI, A.; DE VITIS, I.; PIANELLI, G.; GESUITA, R.; CARLE, F.; MANDOLESI, A.; BEARZI, I.; FASANO, A. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. **Am J Clin Nutr**, v. 85, n. 1, p. 160-6, Jan 2007. ISSN 0002-9165 (Print).

CICLITIRA, P. J.; ELLIS, H. J.; LUNDIN, K. E. A. Gluten-free diet - What is toxic? **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 19, n. 3 SPEC. ISS., p. 359-371, 2005.

CODEX, C. A. C. O. T. J. F. A. A. O. A. T. W. H. O. O. T. U. N. **Codex Standard for Foods for Special Dietary use for Persons Intolerant to Gluten**. Rome, Italy 2008.

CORAZZA, G. R.; VALENTINI, R. A.; ANDREANI, M. L.; D'ANCHINO, M.; LEVA, M. T.; GINALDI, L.; DE FEUDIS, L.; QUAGLINO, D.; GASBARRINI, G. Subclinical coeliac disease is a frequent cause of iron-deficiency anaemia. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 30, n. 2, p. 153-156, 1995.

CORRAO, G.; CORAZZA, G. R.; BAGNARDI, V.; BRUSCO, G.; CIACCI, C.; COTTONE, M.; SATEGNA GUIDETTI, C.; USAI, P.; CESARI, P.; PELLI, M. A.; LOPERFIDO, S.; VOLTA, U.; CALABRÀ³, A.; CERTO, M. Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: A cohort study. **Lancet**, v. 358, n. 9279, p. 356-361, 2001.

CROVELLA, S.; BRANDAO, L.; GUIMARAES, R.; DE LIMA FILHO, J. L.; ARRAES, L. C.; VENTURA, A.; NOT, T. Speeding up coeliac disease diagnosis in the developing countries. **Digestive and Liver Disease**, v. 39, n. 10, p. 900-902, 2007.

CROWE, S. Abstracts of Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute, May 19-24, 2007, Washington, DC, USA. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4 Suppl 2, 2007.

DAHINDEN, I.; VON BÜREN, M.; LÜTHY, J. A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. **European Food Research and Technology**, v. 212, n. 2, p. 228-233, 2001.

DEBNATH, J.; MARTIN, A.; GOWDA, L. R. A polymerase chain reaction directed to detect wheat glutenin: Implications for gluten-free labelling. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 782-787, 2009.

DEBNATH, S. C.; RICARD, E. ISSR, anthocyanin content and antioxidant activity analyses to characterize strawberry genotypes. **Journal of Applied Horticulture**, v. 11, n. 2, p. 83-89, 2009.

DEWAR, D.; PEREIRA, S. P.; CICLITIRA, P. J. The pathogenesis of coeliac disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 1, p. 17-24, 2004.

DI NIRO, R.; D'ANGELO, S.; MARZARI, R.; SANTORO, C.; SBLATTERO, D. Autoantibody Profiling of Celiac Disease by Antigen Microarrays. 13th International Coeliac Disease Symposium, 2009. Amsterdam, the Netherlands. April, 6-8. p.54.

DI SABATINO, A.; CORAZZA, G. R. Coeliac disease. **Lancet**, v. 373, n. 9673, p. 1480-93, Apr 25 2009. ISSN 1474-547X (Electronic).

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. **Nature Medicine**, v. 3, n. 7, p. 797-801, 1997.

DINIZ-SANTOS, D.; ADAN, L.; ANDRADE, C. D.; GALVÃO, Y.; JATOBÁ, I.; MOREIRA, A.; PAES, I.; FREITAS, L.; SILVA, L. Prevalence and Clinical Features of Unrecognized Celiac Disease in Young Brazilian Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. 13th International Coeliac Disease Symposium, 2009. Amsterdam, the Netherlands. April 6-8. p.92.

DRAGO, S.; EL ASMAR, R.; DI PIERRO, M.; CLEMENTE, M. G.; TRIPATHI, A.; SAPONE, A.; THAKAR, M.; IACONO, G.; CARROCCIO, A.; D'AGATE, C.; NOT, T.; ZAMPINI, L.; CATASSI, C.; FASANO, A. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 41, n. 4, p. 408-419, 2006.

EC, T. C. O. T. E. C.-. **COMMISSION REGULATION (EC) No 41/2009 of 20 January 2009 concerning the composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten.** <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:016:0003:0005:EN:PDF> 2009.

ERRICHELLO, S.; ESPOSITO, O.; DI MASE, R.; CAMARCA, M. E.; NATALE, C.; LIMONGELLI, M. G.; MARANO, C.; CORUZZO, A.; LOMBARDO, M.; STRISCIUGLIO, P.; GRECO, L. Celiac disease: Predictors of compliance with a gluten-free diet in adolescents and young adults. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 50, n. 1, p. 54-60, 2010.

FASANO, A.; TRONCONE, R. Frontiers in celiac disease. In: BRANSKI, D. (Ed.). **Pediatric and adolescent Medicine**. 1. Basel: S. Karger AG, v.12, 2008. p.222. ISBN 978-3-8055-8526-2

FDA, F. A. D. A. **72 FR 2795 January 23, 2007: Food Labeling; Gluten-Free Labeling of Foods.**
<http://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/FoodAllergensLabeling/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ucm077926.htm> 2007.

GADEWAR, S.; FASANO, A. Celiac disease: Is the atypical really typical? Summary of the recent National Institutes of Health Consensus Conference and latest advances. **Current Gastroenterology Reports**, v. 7, n. 6, p. 455-461, 2005.

GANDOLFI, L.; PRATESI, R.; CORDOBA, J. C. M.; TAUILL, P. L.; GASPARIN, M.; CATASSI, C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. **American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 3, p. 689-692, 2000.

GARCIA, E.; LLORENTE, M.; HERNANDO, A.; KIEFFER, R.; WIESER, H.; MENDEZ, E. Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, n. 5, p. 529-39, May 2005. ISSN 0954-691X (Print).

GRECO, L.; ROMINO, R.; COTO, I.; DI COSMO, N.; PERCOPO, S.; MAGLIO, M.; PAPARO, F.; GASPERI, V.; LIMONGELLI, M. G.; COTICHINI, R.; D'AGATE, C.; TINTO, N.; SACCHETTI, L.; TOSI, R.; STAZI, M. A. The first large population based twin study of coeliac disease. **Gut**, v. 50, n. 5, p. 624-8, May 2002.

GREEN, P. H. R.; JABRI, B. Coeliac disease. **Lancet**, v. 362, n. 9381, p. 383-391, 2003.

_____. **Celiac disease.** Annual Review of Medicine. 57: 207-221 p. 2006.

GUANDALINI, S. Historical perspective of celiac disease. **Frontiers in Celiac Disease**, v. 12, p. 1-11, 2008.

HALL, N. J.; RUBIN, G.; CHARNOCK, A. Systematic review: Adherence to a gluten-free diet in adult patients with coeliac disease. **Aliment Pharmacol Ther**, May 26 2009. ISSN 1365-2036 (Electronic).

HALLERT, C.; SANDLUND, O.; BROQVIST, M. Perceptions of health-related quality of life of men and women living with coeliac disease. **Scandinavian Journal of Caring Sciences**, v. 17, n. 3, p. 301-307, 2003.

HERNANDO, A.; MUJICO, J. R.; MENA, M. C.; LOMBARDIA, M.; MENDEZ, E. Measurement of wheat gluten and barley hordeins in contaminated oats from Europe, the United States and Canada by Sandwich R5 ELISA. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 20, n. 6, p. 545-54, Jun 2008. ISSN 0954-691X (Print).

HERNANDO, A.; VALDES, I.; MENDEZ, E. New strategy for the determination of gliadins in maize- or rice-based foods matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: fractionation of gliadins from maize or rice prolamins by acidic treatment. **J Mass Spectrom**, v. 38, n. 8, p. 862-71, Aug 2003. ISSN 1076-5174 (Print)

1076-5174 (Linking).

HERRMAN, H.; METELKO, Z.; SZABO, S.; RAJKUMAR, S.; KUMAR, S.; VAN HECK, G.; DE VRIES, J.; ARROYO, S.; KABANOV; LOMACHENKOV; BURKOVSKY; SUKWATANA, S.; MEESAPYA, K.; SKEVINGTON, S.; PATRICK, D.; MARTIN, M.; MUTAMBIRWA, J.; SARTORIUS, N.; ORLEY, J.; KUYKEN, W. Study protocol for the World Health Organization project to develop a Quality of Life assessment (WHOQOL). **Quality of Life Research**, v. 2, n. 2, p. 153-159, 1993.

HILL, I. D. What are the sensitivity and specificity of serologic tests for celiac disease? Do sensitivity and specificity vary in different populations? **Gastroenterology**, v. 128, n. 4, Supplement 1, p. S25-S32, 2005.

HIRAYAMA, K. B.; SDEPANIAN, V. L. [**Assessment of gluten in homemade foods prepared by celiac disease patients and/or their caretakers**]. 2007. 79 Thesis (Master). Universidade Federal de São Paulo - Brasil
São Paulo.

HISCHENHUBER, C.; CREVEL, R.; JARRY, B.; MAKI, M.; MONERET-VAUTRIN, D. A.; ROMANO, A.; TRONCONE, R.; WARD, R. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 23, n. 5, p. 559-75, Mar 1 2006. ISSN 0269-2813 (Print).

HÖGBERG, L.; LAURIN, P.; FÄLTH-MAGNUSSON, K.; GRANT, C.; GRODZINSKY, E.; JANSSON, G.; ASCHER, H.; BROWALDH, L.; HAMMERSJÖ, J. A.; LINDBERG, E.; MYRDAL, U.; STENHAMMAR, L. Oats to children with newly diagnosed coeliac disease: A randomised double blind study. **Gut**, v. 53, n. 5, p. 649-654, 2004.

HOOFNAGLE, A. N.; WENER, M. H. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 347, n. 1-2, p. 3-11, 2009.

IMMER, U.; HAAS-LAUTERBACH, S. The question of extraction procedures. **Proceedings of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity**, p. 45-52, 2005.

JABRI, B.; KASARDA, D. D.; GREEN, P. H. R. Innate and adaptive immunity: The Yin and Yang of celiac disease. **Immunological Reviews**, v. 206, p. 219-231, 2005.

JANATUINEN, E. K.; KEMPPAINEN, T. A.; JULKUNEN, R. J. K.; KOSMA, V. M.; MÄÄKI, M.; HEIKKINEN, M.; UUSITUPA, M. I. J. No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. **Gut**, v. 50, n. 3, p. 332-335, 2002.

JANATUINEN, E. K.; PIKKARAINEN, P. H.; KEMPPAINEN, T. A.; KOSMA, V. M.; JARVINEN, R. M.; UUSITUPA, M. I.; JULKUNEN, R. J. A comparison of diets with and without oats in adults with celiac disease. **N Engl J Med**, v. 333, n. 16, p. 1033-7, Oct 19 1995. ISSN 0028-4793 (Print).

KASARDA, D. D. **The Grain**. Greenbelt: Department of health and human services food and drug administration center for food safety and applied nutrition: 85-90 p. 2005.

KAUKINEN, K.; COLLIN, P.; LAURILA, K.; KAARTINEN, T.; PARTANEN, J.; MÄÄKI, M. Resurrection of gliadin antibodies in coeliac disease. Deamidated gliadin peptide antibody test provides additional diagnostic benefit. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 42, n. 12, p. 1428-1433, 2007.

KEECH, C. L.; DROMEY, J.; CHEN, Z. Immune tolerance induced by peptide immunotherapy in an HLA-DQ2-dependent mouse model of gluten immunity. **Gastroenterology**, v. 136, p. A-57, 2009.

KELLY, C. P.; LEON, F.; GREEN, P. H. R.; LEFFLER, D. A.; FEDORAK, R.; COLATRELLA, A.; LEON, F.; JIANG, J.; DI MARINO, A.; MURRAY, J. A. **Larazotide acetate reduces the immunological response and the clinical sequelae of**

gluten exposure in celiac disease. Proceedings of the 13th International Coeliac Disease Symposium. Amsterdam, the Netherlands 2009.

KEMPPAINEN, T.; KRÖGER, H.; JANATUINEN, E.; ARNALA, I.; KOSMA, V. M.; PIKKARAINEN, P.; JULKUNEN, R.; JURVELIN, J.; ALHAVA, E.; UUSITUPA, M. Osteoporosis in adult patients with celiac disease. **Bone**, v. 24, n. 3, p. 249-255, 1999.

KILMARTIN, C.; WIESER, H.; ABUZAKOUK, M.; KELLY, J.; JACKSON, J.; FEIGHERY, C. Intestinal T cell responses to cereal proteins in celiac disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, n. 1, p. 202-209, 2006.

LAMMERS, K. M.; LU, R.; BROWNLEY, J.; LU, B.; GERARD, C.; THOMAS, K.; RALLABHANDI, P.; SHEA-DONOHUE, T.; TAMIZ, A.; ALKAN, S.; NETZEL-ARNETT, S.; ANTALIS, T.; VOGEL, S. N.; FASANO, A. Gliadin Induces an Increase in Intestinal Permeability and Zonulin Release by Binding to the Chemokine Receptor CXCR3. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, 2008.

LEBENTHAL, E.; SHTEYER, E.; BRANSKI, D. The Changing Clinical Presentation of Celiac Disease. In: FASANO, A.; TRONCONE, R., *et al* (Ed.). **Frontiers in Celiac Disease**. Basel: S. Karger AG, v.12, 2008. p.19-22. ISBN 978-3-8055-8526-2

LEE, A.; NEWMAN, J. M. Celiac diet: Its impact on quality of life. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, n. 11, p. 1533-1535, 2003.

LEE, S. K.; LO, W.; MEMEO, L.; ROTTERDAM, H.; GREEN, P. H. R. Duodenal histology in patients with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 57, n. 2, p. 187-191, 2003.

LI, M.; YU, L.; TIBERTI, C.; BONAMICO, M.; TAKI, I.; MIAO, D.; MURRAY, J. A.; REWERS, M. J.; HOFFENBERG, E. J.; AGARDH, D.; MUELLER, P.; STERN, M.; BONIFACIO, E.; LIU, E. A report on the international transglutaminase autoantibody workshop for celiac disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 104, n. 1, p. 154-163, 2009.

LOSOWSKY, M. S. A history of coeliac disease. **Digestive Diseases**, v. 26, n. 2, p. 112-120, 2008.

LUNDIN, K. E.; NILSEN, E. M.; SCOTT, H. G.; LOBERG, E. M.; GJOEN, A.; BRATLIE, J.; SKAR, V.; MENDEZ, E.; LOVIK, A.; KETT, K. Oats induced villous

atrophy in coeliac disease. **Gut**, v. 52, n. 11, p. 1649-52, Nov 2003. ISSN 0017-5749 (Print).

MAKI, M.; MUSTALAHTI, K.; KOKKONEN, J.; KULMALA, P.; HAAPALAHTI, M.; KARTTUNEN, T.; ILONEN, J.; LAURILA, K.; DAHLBOM, I.; HANSSON, T.; HOPFL, P.; KNIP, M. Prevalence of Celiac disease among children in Finland. **N Engl J Med**, v. 348, n. 25, p. 2517-24, Jun 19 2003. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking).

MARSH, M. N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). **Gastroenterology**, v. 102, n. 1, p. 330-54, Jan 1992. ISSN 0016-5085 (Print).

MATYSIAK-BUDNIK, T.; CANDALH, C.; CELLIER, C.; DUGAVE, C.; NAMANE, A.; VIDAL-MARTINEZ, T.; CERF-BENSUSSAN, N.; HEYMAN, M. Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. **Gastroenterology**, v. 129, n. 3, p. 786-96, Sep 2005. ISSN 0016-5085 (Print).

MEARIN, M. L. Celiac Disease Among Children and Adolescents. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 37, n. 3, p. 86-105, 2007.

MEEUWISSE, G. W. Round table discussion. Diagnostic criteria in coeliac disease. **Acta Paediatrica Scandinavica**, v. 59, p. 461-3, 1970.

MELO, S.; FERNANDES, M.; PERES, L.; TRONCON, L.; GALVÃO, L. Prevalence and Demographic Characteristics of Celiac Disease Among Blood Donors in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, n. 5, p. 1020-1025, 2006.

MENDEZ, E.; VELA, C.; IMMER, U.; JANSSEN, F. W. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, n. 10, p. 1053-63, Oct 2005. ISSN 0954-691X (Print).

MOLBERG, O.; MCADAM, S. N.; KORNER, R.; QUARSTEN, H.; KRISTIANSEN, C.; MADSEN, L.; FUGGER, L.; SCOTT, H.; NOREN, O.; ROEPSTORFF, P.; LUNDIN, K. E.; SJOSTROM, H.; SOLLID, L. M. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. **Nat Med**, v. 4, n. 6, p. 713-7, Jun 1998. ISSN 1078-8956 (Print)

1078-8956 (Linking).

MORA, S.; BARERA, G.; BECCIO, S.; MENNI, L.; PROVERBIO, M. C.; BIANCHI, C.; CHIUMELLO, G. A prospective, longitudinal study of the long-term effect of treatment on bone density in children with celiac disease. **Journal of Pediatrics**, v. 139, n. 4, p. 516-521, 2001.

MORIARTY, K. J.; LOFT, D.; MARSH, M. N.; BROOKS, S. T.; GORDON, D.; GARNER, G. V. Holy communion wafers and celiac disease. **N Engl J Med**, v. 321, n. 5, p. 332, Aug 3 1989. ISSN 0028-4793 (Print).

MUSTALAHTI, K.; LOHINIEMI, S.; COLLIN, P.; VUOLTEENAHO, N.; LAIPPALA, P.; MÄKI, M. Gluten-free diet and quality of life in patients with screen-detected celiac disease. **Effective clinical practice : ECP**, v. 5, n. 3, p. 105-113, 2002.

NEW ZEALAND AND AUSTRALIA. **Food Standards Code. STANDARD 1.2.8 NUTRITION INFORMATION REQUIREMENTS**. CODE, A. N. Z. F. S. C.-T. <http://www.foodstandards.gov.au/foodstandards/foodstandardscode/>: Gluten-Free Certification Organization. 2010 2010.

NISIHARA, R. M.; KOTZE, L. M. S.; UTIYAMA, S. R. R.; OLIVEIRA, N. P.; FIEDLER, P. T.; MESSIAS-REASON, I. T. Celiac disease in children and adolescents with Down syndrome. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 5, p. 373-376, 2005.

NISTICO, L.; FAGNANI, C.; COTO, I.; PERCOPO, S.; COTICHINI, R.; LIMONGELLI, M. G.; PAPARO, F.; D'ALFONSO, S.; GIORDANO, M.; SFERLAZZAS, C.; MAGAZZU, G.; MOMIGLIANO-RICHIARDI, P.; GRECO, L.; STAZI, M. A. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. **Gut**, v. 55, n. 6, p. 803-8, Jun 2006.

NUSIER, M.; BRODTKORB, H.; REIN, S.; ODEH, A.; RADAIDEH, A.; KLUNGLAND, H. Serological screening for celiac disease in schoolchildren in Jordan. Is height and weight affected when seropositive? **Italian Journal of Pediatrics**, v. 36, n. 1, p. 16, 2010.

OLIVEIRA, R. P.; SDEPANIAN, V. L.; BARRETO, J. A.; CORTEZ, A. J. P.; CARVALHO, F. O.; BORDIN, J. O.; DE CAMARGO SOARES, M. A.; DA SILVA PATRÍCIO, F. R.; KAWAKAMI, E.; DE MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. High prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 19, n. 1, p. 43-49, 2007.

PATERSON, B. M.; TURNER, J. R. Inhibitors of Intestinal Barrier Dysfunction. In: FASANO, A.; TRONCONE, R., *et al* (Ed.). **Frontiers in celiac disease**. 1. Basel: S. Karger AG, v.12, 2008. p.157-171. ISBN 978-3-8055-8526-2

PEÑA, A. S.; GARROTE, J. A.; CRUSIUS, J. B. A. Advances in the immunogenetics of coeliac disease. Clues for understanding the pathogenesis and disease heterogeneity. **Scandinavian Journal of Gastroenterology, Supplement**, v. 33, n. 225 SUPPL., p. 56-58, 1998.

PEREIRA, M. A. G.; ORTIZ-AGOSTINHO, C. L.; NISHITOKUKADO, I.; SATO, M. N.; DAMIÃO, A. O. M. C.; ALENCAR, M. L.; ABRANTES-LEMOES, C. P.; CANAÏADO, E. L. R.; DE BRITO, T.; IOSHII, S. O.; VALARINI, S. B. M.; SIPAHI, A. M. Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 40, p. 6546-6550, 2006.

PLOT, L.; AMITAL, H. Infectious associations of Celiac disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 8, n. 4, p. 316-319, 2009.

PRATESI, R.; GANDOLFI, L.; GARCIA, G. S.; MODELLI, I. C.; LOPES DE ALMEIDA, P.; BOCCA, L. A.; CATASSI, C. Prevalence of Coeliac Disease: Unexplained Age-related Variation in the Same Population. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 38, n. 7, p. 747-750, 07 2003.

R-BIOPHARM. The R5 antibody contained in the RIDASCREEN® Gliadin product line shows no cross-reactivity to soy based products. 01/2010 2010. Disponível em: < http://www.r-biopharm.com/Gliadin_no%20cross-reactivity_1-2010.pdf >. Acesso em: 25/05/2010 14:00.

ROBINS, G.; HOWDLE, P. D. Advances in celiac disease. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 21, n. 2, p. 152-61, Mar 2005.

RODRIGO, L.; GARROTE, J. A.; VIVAS, S. [Celiac disease]. **Med Clin (Barc)**, v. 131, n. 7, p. 264-70, Sep 6 2008. ISSN 0025-7753 (Print).

RODRIGUES, L.; SILVEIRA, T. R. D.; FLECK, M. P. D. A. **Avaliação da qualidade de vida de crianças celíacas em uso de dieta isenta de glúten: um estudo de caso-controle**. 2007. 141 Dissertação (Mestrado). PPG-Ciências Médicas: Pediatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ROSTAMI, K.; STEEGERS, E. A. P.; WONG, W. Y.; BRAAT, D. D.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. P. M. Coeliac disease and reproductive disorders: A neglected

association. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 96, n. 2, p. 146-149, 2001.

ROSTOM, A.; DUBÉ, C.; CRANNEY, A.; SALOOJEE, N.; SY, R.; GARRITTY, C.; SAMPSON, M.; ZHANG, L.; YAZDI, F.; MAMALADZE, V.; PAN, I.; MCNEIL, J.; MOHER, D.; MACK, D.; PATEL, D. Celiac disease. **Evidence report/technology assessment (Summary)**, n. 104, p. 1-6, 2004.

ROSTOM, A.; MURRAY, J. A.; KAGNOFF, M. F. American Gastroenterological Association (AGA) Institute Technical Review on the Diagnosis and Management of Celiac Disease. **Gastroenterology**, v. 131, n. 6, p. 1981-2002, 2006.

RUBIO-TAPIA, A.; KELLY, D. G.; LAHR, B. D.; DOGAN, A.; WU, T.; MURRAY, J. A. Clinical Staging and Survival in Refractory Celiac Disease: A Single Center Experience. **Gastroenterology**, v. 136, n. 1, p. 99-107, 2009.

SALINAS, R. D. **Alimentos e Nutrição introdução à bromatologia. 3ª Ed.** Artmed, 2002. ISBN 8573079916

SALMI, T. T.; COLLIN, P.; JÄRVINEN, O.; HAIMILA, K.; PARTANEN, J.; LAURILA, K.; KORPONAY-SZABO, I. R.; HUHTALA, H.; REUNALA, T.; MÄKI, M.; KAUKINEN, K. Immunoglobulin A autoantibodies against transglutaminase 2 in the small intestinal mucosa predict forthcoming coeliac disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, n. 3, p. 541-552, 2006.

SALMI, T. T.; COLLIN, P.; KORPONAY-SZABÓ, I. R.; LAURILA, K.; PARTANEN, J.; HUHTALA, H.; KIRÁLY, R.; LORAND, L.; REUNALA, T.; MÄKI, M.; KAUKINEN, K. Endomysial antibody-negative coeliac disease: Clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. **Gut**, v. 55, n. 12, p. 1746-1753, 2006.

SATEGNA GUIDETTI, C.; SOLERIO, E.; SCAGLIONE, N.; AIMO, G.; MENGOZZI, G. Duration of gluten exposure in adult coeliac disease does not correlate with the risk for autoimmune disorders. **Gut**, v. 49, n. 4, p. 502-505, 2001.

SCHUBERT-ULLRICH, P.; RUDOLF, J.; ANSARI, P.; GALLER, B.; FÄHRER, M.; MOLINELLI, A.; BAUMGARTNER, S. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: An overview. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 1, p. 69-81, 2009.

SCHUPPAN, D.; JUNKER, Y.; BARISANI, D. Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies. **Gastroenterology**, v. 137, n. 6, p. 1912-1933, 2009.

SHAHRAKI, T.; SHAHRAKI, M.; AL DULAIM, D.; ROSTAMI, K. **Histology doesn't reflect the severity of gluten sensitivity.** 13th International Coeliac Disease Symposium. Amsterdam, the Netherlands: 58 p. 2009.

SHAN, L.; MATHEWS, II; KHOSLA, C. Structural and mechanistic analysis of two prolyl endopeptidases: role of interdomain dynamics in catalysis and specificity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 10, p. 3599-604, Mar 8 2005. ISSN 0027-8424 (Print).

SHAN, L.; MOLBERG, O.; PARROT, I.; HAUSCH, F.; FILIZ, F.; GRAY, G. M.; SOLLID, L. M.; KHOSLA, C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, v. 297, n. 5590, p. 2275-9, Sep 27 2002.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G.; BELTON, P. S.; TATHAM, A. S. The structure and properties of gluten: An elastic protein from wheat grain. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 357, n. 1418, p. 133-142, 2002.

SILANO, M.; DESSI, M.; DE VINCENZI, M.; CORNELL, H. In vitro tests indicate that certain varieties of oats may be harmful to patients with coeliac disease. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 22, n. 4, p. 528-31, Apr 2007. ISSN 0815-9319 (Print).

SILANO, M.; DI BENEDETTO, R.; MAIALETTI, F.; DE VINCENZI, A.; CALCATERRA, R.; CORNELL, H. J.; DE VINCENZI, M. Avenins from different cultivars of oats elicit response by coeliac peripheral lymphocytes. **Scand J Gastroenterol**, v. 42, n. 11, p. 1302-5, Nov 2007. ISSN 0036-5521 (Print).

SKERRITT, J. H.; HILL, A. S. Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 74, n. 2, p. 257-264, 1991.

STAZI, A. V. [Coeliac disease and reproduction: possible in vivo models]. **Ann Ist Super Sanita**, v. 41, n. 4, p. 523-31, 2005. ISSN 0021-2571 (Print).

STENE, L. C.; HONEYMAN, M. C.; HOFFENBERG, E. J.; HAAS, J. E.; SOKOL, R. J.; EMERY, L.; TAKI, I.; NORRIS, J. M.; ERLICH, H. A.; EISENBARTH, G. S.; REWERS, M. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. **Am J Gastroenterol**, v. 101, n. 10, p. 2333-40, Oct 2006.

TACK, G. J.; VERBEEK, W. H. M.; SCHREURS, M. W. J.; MULDER, C. J. J. The spectrum of celiac disease: Epidemiology, clinical aspects and treatment. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 4, p. 204-213, 2010.

THOMPSON, T.; MENDEZ, E. Commercial assays to assess gluten content of gluten-free foods: why they are not created equal. **J Am Diet Assoc**, v. 108, n. 10, p. 1682-7, Oct 2008. ISSN 0002-8223 (Print)

0002-8223 (Linking).

TREVISIOL, C.; BRANDT, K. G.; SILVA, G. A.; CROVELLA, S.; VENTURA, A. High prevalence of unrecognized celiac disease in an unselected hospital population in north-eastern Brasil (Recife, Pernambuco). **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 39, n. 2, p. 214-5, Aug 2004.

TRONCONE, R.; AURICCHIO, R.; GRANATA, V. Issues related to gluten-free diet in coeliac disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 11, n. 3, p. 329-33, May 2008. ISSN 1363-1950 (Print).

TURSI, A.; BRANDIMARTE, G.; GIORGETTI, G. M.; ELISEI, W.; INCHINGOLO, C. D.; MONARDO, E.; AIELLO, F. Endoscopic and histological findings in the duodenum of adults with celiac disease before and after changing to a gluten-free diet: A 2-year prospective study. **Endoscopy**, v. 38, n. 7, p. 702-707, 2006.

TURSI, A.; GIORGETTI, G.; BRANDIMARTE, G.; ELISEI, W.; PAPA, A.; LECA, P.; AIELLO, F. Complications in Celiac Disease Under Gluten-Free Diet. 13th International Coeliac Disease Symposium, 2009. Amsterdam, the Netherlands. p.98.

VADER, L. W.; STEPNIAK, D. T.; BUNNIK, E. M.; KOOY, Y. M. C.; DE HAAN, W.; DRIJFHOUT, J. W.; VAN VEELLEN, P. A.; KONING, F. Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. **Gastroenterology**, v. 125, n. 4, p. 1105-1113, 2003.

VALDÉS, I.; GARCIA, E.; LLORENTE, M.; MENDEZ, E. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 5, p. 465-74, May 2003. ISSN 0954-691X (Print).

VAN DE WAL, Y.; KOOY, Y.; VAN VEELLEN, P.; PENA, S.; MEARIN, L.; PAPADOPOULOS, G.; KONING, F. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. **J Immunol**, v. 161, n. 4, p. 1585-8, Aug 15 1998. ISSN 0022-1767 (Print)

0022-1767 (Linking).

VAN DEN BROECK, H. C.; AMERICA, A. H. P.; SMULDERS, M. J. M.; BOSCH, D.; HAMER, R. J.; GILISSEN, L. J. W. J.; VAN DER MEER, I. M. A modified extraction protocol enables detection and quantification of celiac disease-related gluten proteins from wheat. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 10, p. 975-982, 2009.

VAN HEEL, D. A.; WEST, J. Recent advances in coeliac disease. **Gut**, v. 55, n. 7, p. 1037-46, Jul 2006.

VAN KOPPEN, E. J.; SCHWEIZER, J. J.; CSIZMADIA, C. G. D. S.; KROM, Y.; HYLKEMA, H. B.; VAN GEEL, A. M.; KOOPMAN, H. M.; VERLOOVE-VANHORICK, S. P.; MEARIN, M. L. Long-term health and quality-of-life consequences of mass screening for childhood celiac disease: A 10-year follow-up study. **Pediatrics**, v. 123, n. 4, 2009.

VARRIALE, A.; ROSSI, M.; STAIANO, M.; TERPETSCHNIG, E.; BARBIERI, B.; ROSSI, M.; D'AURIA, S. Fluorescence correlation spectroscopy assay for gliadin in food. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 12, p. 4687-4689, 2007.

VERMEERSCH, P.; GEBOES, K.; MARIËN, G.; HOFFMAN, I.; HIELE, M.; BOSSUYT, X. Diagnostic performance of IgG anti-deamidated gliadin peptide antibody assays is comparable to IgA anti-tTG in celiac disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 13-14, p. 931-935, 2010

VILAR, L.; NAVES, L. A.; GADELHA, M. Armadilhas no diagnóstico da hiperprolactinemia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, p. 347-357, 2003.

VOLTA, U.; GRANITO, A.; PARISI, C.; FABBRI, A.; FIORINI, E.; PISCAGLIA, M.; TOVOLI, F.; GRASSO, V.; MURATORI, P.; PAPPAS, G.; DE GIORGIO, R. Deamidated gliadin peptide antibodies as a routine test for celiac disease: A prospective analysis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 44, n. 3, p. 186-190, 2010.

WAHAB, P. J.; MEIJER, J. W. R.; MULDER, C. J. J. Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: Slow and incomplete recovery. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 118, n. 3, p. 459-463, 2002.

WALKER-SMITH, J. A.; GUANDALINI, S.; SCHMITZ, J.; SHMERLING, D. H.; VISAKORPI, J. K. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. **Archives of Disease in Childhood**, v. 65, n. 8, p. 909-911, 1990.

WEST, J. Celiac Disease and Its Complications: A Time Traveller's Perspective. **Gastroenterology**, v. 136, n. 1, p. 32-34, 2009.

WIESER, H. The precipitating factor in coeliac disease. **Baillieres Clin Gastroenterol**, v. 9, n. 2, p. 191-207, Jun 1995. ISSN 0950-3528 (Print).

_____. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiol**, v. 24, n. 2, p. 115-9, Apr 2007. ISSN 0740-0020 (Print).

WIESER, H.; KOEHLER, P. The Biochemical Basis of Celiac Disease. **Cereal Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 1-13, 01/02/ 2008.

_____. Is the calculation of the gluten content by multiplying the prolamin content by a factor of 2 valid? **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 1, p. 9-13, 2009.

ZARKADAS, M.; CRANNEY, A.; CASE, S.; MOLLOY, M.; SWITZER, C.; GRAHAM, I. D.; BUTZNER, J. D.; RASHID, M.; WARREN, R. E.; BURROWS, V. The impact of a gluten-free diet on adults with coeliac disease: Results of a national survey. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 19, n. 1, p. 41-49, 2006.

ANEXOS

8.1. Anexo A – Amostra Discriminada

Amostra	Produto	Grupo	Adquirido	Ridaquick	Kit Transia (em ppm)
1	Caldo em pó	Tempero em pó	Supermercado	negativo	0.59
2	Caldo em pó	Tempero em pó	Supermercado	positivo	3.51
3	Caldo em pó	Tempero em pó	Supermercado	negativo	0.35
4	Far Arroz	Farinhas	Supermercado	negativo	0.33
5	Far Mandioca	Farinhas	Supermercado	positivo	8.63
6	Far Mandioca	Farinhas	Supermercado	negativo	0.29
7	Far Mandioca	Farinhas	Supermercado	negativo	0.31
8	Far Milho	Farinhas	Supermercado	positivo	8.61
9	Far Milho	Farinhas	Supermercado	negativo	2.21
10	Far Milho	Farinhas	Supermercado	negativo	0.38
11	Far Soja	Farinhas	Supermercado	positivo	641.85
12	Massa de Arroz	Massas	Supermercado	negativo	0.73
13	Pão de Queijo	Pão de queijo	Supermercado	positivo	49.24
14	Pão de Queijo	Pão de queijo	Supermercado	negativo	0.36
15	Biscoito Cuscuz	Biscoitos	Supermercado	negativo	0.42
16	Biscoito de Arroz	Biscoitos	Supermercado	negativo	0.27
17	Biscoito de Polvilho	Biscoitos	Supermercado	negativo	1.13
18	Biscoito de Polvilho	Biscoitos	Supermercado	negativo	0.41
19	Biscoito de Polvilho	Biscoitos	Supermercado	negativo	1.00
20	Biscoitos milho	Biscoitos	Supermercado	positivo	13.56
21	Broa de Polvilho	Biscoitos	Supermercado	positivo	52.28
22	Cookies de Soja	Biscoitos	Supermercado	negativo	0.62
23	Far Arroz	Farinhas	Supermercado	negativo	0.13
24	Far Milho	Farinhas	Supermercado	positivo	52.97
25	Far Milho	Farinhas	Supermercado	negativo	1.65
26	Far Milho	Farinhas	Supermercado	negativo	0.43
27	Far Rosca de arroz	Farinhas	Supermercado	negativo	0.16
28	Far Soja	Farinhas	Supermercado	positivo	55.13
29	Batata Palha	Salgadinhos	Supermercado	negativo	0.49
30	Batata Palha	Salgadinhos	Supermercado	negativo	0.31
31	Batata Palha	Salgadinhos	Supermercado	negativo	1.20
32	Salg Milho	Salgadinhos	Supermercado	negativo	0.95
33	Salg Milho	Salgadinhos	Supermercado	negativo	2.99

34	Salg Milho	Salgadinhos	Supermercado	negativo	0.99
35	Snack Batata	Salgadinhos	Supermercado	negativo	0.34
36	Snack Batata	Salgadinhos	Supermercado	negativo	0.36
37	Snack Batata	Salgadinhos	Supermercado	negativo	1.45
38	Pão Queijo Congelado	Pão de queijo	Supermercado	negativo	0.40
39	Pão Queijo Cong.	Pão de queijo	Supermercado	negativo	0.66
40	Salg Milho	Salgadinhos	Loja especializada	positivo	10.15
41	Salg Arroz/Alga	Salgadinhos	Loja especializada	negativo	5.38
42	Pão sem glúten	Outros	Loja especializada	negativo	0.47
43	Farofa de soja	Farinhas	Loja especializada	negativo	0.67
44	Massa de Arroz	Massas	Loja especializada	negativo	0.41
45	Salgadinho de Soja	Salgadinhos	Loja especializada	negativo	0.91
46	Biscoito de Amendoim	Biscoitos	Loja especializada	positivo	19.69
47	Granola dourada	Granola	Loja especializada	positivo	5.03
48	Biscoito Rozen Cebola	Biscoitos	Loja especializada	negativo	0.68
49	Farinha de Banana Verde	Farinhas	Loja especializada	negativo	0.49
50	Biscoito Beladri Sequilho	Biscoitos	Loja especializada	negativo	0.50
51	Bolacha de Arroz	Biscoitos	Loja especializada	negativo	0.73
52	Linhaça Dourada Lino Live	Granola	Loja especializada	positivo	42.21
53	Bolacha de milho	Biscoitos	Loja especializada	negativo	0.88
54	Granola Sem Glúten	Granola	Loja especializada	positivo	27.60
55	Mistura p Bolo Cenoura	Outros	Loja especializada	positivo	6.06
56	Massa de trigo Sarraceno	Massas	Loja especializada	positivo	9.68
57	Torrão de Gergelim	Barra de Cereal	Loja especializada	negativo	1.66
58	Levitá Sementes	Granola	Loja especializada	negativo	0.51
59	Barra Quinoa Real Frutas	Barra de Cereal	Loja especializada	negativo	5.68

60	Biscoito de arroz e castanhas	Biscoitos	Loja especializada	negativo	0.36
61	Torrão Linhaça, Girassol e Gergelim	Barra de Cereal	Loja especializada	negativo	0.51
62	Preparado Aminna Multiuso	Farinhas	Loja especializada	negativo	0.49
63	Cookie Baunilha Quinoa	Biscoitos	Loja especializada	positivo	17.73
64	Bolacha sem glúten	Biscoitos	Loja especializada	negativo	0.35
65	Massa de Arroz	Massas	Loja especializada	negativo	0.69
66	Granola	Granola	Loja especializada	positivo	56.51
67	Sopa Orgânica de Feijão	Sopa	Loja especializada	positivo	57.07
68	Torta de Creme de moranga	Outros	Loja especializada	negativo	0.37
69	Caldinho de milho	Sopa	Loja especializada	negativo	1.13
70	Discos de Pizza Coquetel	Outros	Loja especializada	negativo	0.56

8.2. Submission Acknowledgement

De: "Editors" <bjournal@fmrp.usp.br>
Assunto: BJMBR - Submission Acknowledgement
Data: Ter, Junho 22, 2010 7:40 pm
Para: "Álvaro Macedo Laureano" <alvaro@brasaodopampa.com.br>

Dear Dr. Álvaro Macedo Laureano:

Thank you for submitting the manuscript, "BJMBR-608 - Assessment of the gluten content in gluten-free labeled foods: comparison of two gluten detection methods" to Brazilian Journal of Medical and Biological Research. With the online journal management system that we are using, you will be able to track its progress through the editorial process by logging in to the journal web site:

Manuscript URL:

<http://submission.scielo.br/index.php/bjmb/author/submission/34550>

Username: alvarol

If you have any questions, please contact me. Thank you for considering our journal for publication of your paper.

Editors

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Brazilian Journal of Medical and Biological Research

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP

Av. Bandeirantes 3900

14049-900 Ribeirão Preto, SP, Brasil

fax/phone: 55+16-3630-2778

phone:55+16-3602-3173

E-mail: bjournal@fmrp.usp.br - bjournal@terra.com.br

On Line Version - <http://www.bjournal.com.br> - www.scielo.br/bjmb

8.3.Artigo

Assessment of the gluten content in gluten-free labeled foods: comparison of two gluten detection methods

A.M. Laureano^{1,2}; T.R. da Silveira^{1,2}

¹, Universidade Federal do Rio Grande do Sul –UFRGS, Programa de Pós-Graduação: Ciências em Gastroenterologia, Porto Alegre, RS, Brasil

² Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Laboratório Experimental de Hepatologia e Gastroenterologia

Correspondence to: Álvaro Macedo Laureano, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Centro de Pesquisa Experimental – Porto Alegre, RS, Brasil, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP:90035-903. alvarol@pop.com.br

Acknowledgements

This research was sponsored by the Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA – 07/557) and by the Programa de Fomento à Pós-Graduação - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROF-CAPES).

Key Words

Celiac; Food restriction; ELISA; Food protein; Detection

Running title: **Assessment of the gluten content in gluten-free foods**

Abstract

Objectives: This study was designed to compare the effectiveness of the R5-ELISA and immunochromatographic assays in detecting gluten in foods labeled gluten-free and to determine if the immunochromatographic method is a sensitive and reliable method for detecting gluten at safe levels for celiac patients. **Materials/Methods:** We analyzed seventy different commercially available foods that were labeled “gluten-free” including several types of flours and snacks. Gluten was extracted by ethanol precipitation and subsequently analyzed using a commercially available immunochromatographic test and R5-ELISA kit. **Results:** More than a quarter of the samples (28.6%) analyzed by ELISA contained levels of gluten greater than 5 ppm. Almost half of these (12.9%) exhibited levels that exceeded 20 ppm, the maximum gluten level recommended by the *Codex Alimentarius* for a naturally gluten free product. The immunochromatographic method is qualitative and returns a positive reading for samples that contain gluten levels greater than 5 ppm. We found 27.1% of the samples tested positive in the immunochromatographic test. There was no statistically significant difference between the results of the ELISA (detection value ≥ 5 ppm) and the immunochromatographic test (McNemar test, $p = 1.00$). Comparing the ELISA (≥ 5 ppm) and immunochromatographic test, we obtained 90% sensitivity and 98% specificity (Kappa of 0.89). **Conclusion:** We found gluten in a high proportion of the samples tested using both methods. In this study we also demonstrate that the immunochromatographic method is nearly as sensitive as the ELISA in detecting gluten levels and thus may serve as an inexpensive and rapid alternative to the R5-ELISA screening test.

Introduction

Celiac disease (CD) is a chronic inflammatory autoimmune enteropathy triggered in genetically susceptible individuals by the ingestion of food containing gluten. The symptoms and clinical manifestations of CD are highly variable among affected individuals (O'Leary, Wieneke, Healy *et al.*, 2004). The only treatment for CD is a lifelong exclusion of wheat, barley and rye from the diet. Though seemingly straightforward, dietotherapy as a remedy for CD is difficult in practice given the prevalence of wheat products in foodstuffs, the improper or non-standard labeling of gluten-free foods, and gluten cross-contamination (Schubert-Ullrich, Rudolf *et al.*, 2009).

The term “gluten” refers to a rubbery mass formed by the complex of proteins that remains after wheat flour is washed to remove starch and water soluble constituents (Wieser, 2007). This complex is composed of gliadins and glutenins, which are found at very similar proportions in most wheat varieties (Valdés, Garcia *et al.*, 2003; Hischenhuber, Crevel *et al.*, 2006). The gliadins belong to a family of proteins called prolamins and the glutenins to glutelins (Shewry, Halford *et al.*, 2002; van den Broeck, America *et al.*, 2009). The term gluten is frequently used to refer specifically to the prolamins and glutelin content of wheat, though gluten is actually less narrowly defined as the insoluble proteins in wheat. It occurs naturally in other grains, including those that are not toxic to celiacs (Kasarda, 2005). However, the term gluten has been adopted by the CD community (both patients and health care professionals) as referring to either the gluten in wheat or the proteins that activate CD (Jabri, Kasarda *et al.*, 2005).

CD affects nearly 1% of the population, varying among different ethnic groups (Green, 2007). Studies have shown a prevalence of biopsy-proven CD in 1:99 and 1:106 Finnish (Maki, Mustalahti *et al.*, 2003) and Italian (Tommasini, Not, Kiren *et al.*, 2004) schoolchildren, respectively. In adult populations in the UK and USA the seroprevalence was shown to be 1:87 (Tommasini, Not *et al.*, 2004) and 1:105 (Fasano, Berti, Gerarduzzi *et al.*, 2003), respectively. CD is not uncommon in Brazil, where the prevalence was demonstrated to be 1:52 in pediatric outpatient (Brandt e Silva, 2008) and 1:681 in blood donors (Gandolfi, Pratesi *et al.*, 2000), with a bigger prevalence within special groups, like Down Syndrome with 8-12% (Rodrigo, Garrote *et al.*, 2008) and first degree relatives with 4.8% (Almeida, Gandolfi, Modelli *et al.*, 2008).

The *Codex Alimentarius Commission* (Codex) has recommended gluten levels not exceed a maximum value of 20 ppm (mg/Kg) for naturally gluten-free foods. For foods processed to reduce the gluten content to be considered gluten free, the Codex recommends a maximum value of 200 ppm. The Codex advises that assays designed to detect gluten should have a detection limit of at least 10 ppm gluten (Codex, 2008) and recommends using the R5-ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). The immunochromatographic test for gluten detection has a limit of detection (LOD) for gluten of 5 ppm.

The immunochromatographic assay is portable, easy to handle, and does not require specialized equipment. This assay gives reliable results in a short time (between 5-15 min) (Schubert-Ullrich, Rudolf *et al.*, 2009) and results are expressed qualitatively (positive or negative) with an LOD of 5 ppm gluten. Given the advantages of the immunochromatographic assay, we believe the immunochromatographic assay might offer an alternative to the R5-ELISA in determining gluten levels in foodstuffs.

The aims of this study are to compare the results obtained with immunochromatographic assay to those of the R5-ELISA and to evaluate the status of gluten

in a variety of different gluten-free labeled foodstuffs. To determine the sensitivity and specificity of the immunochromatographic test, we used the R5-ELISA as a reference.

Methods

Selection of samples for gluten testing

Products tested were labeled as “gluten-free” or contained naturally gluten-free ingredients and were chosen because dietitians frequently recommend these products to people with CD. Different brands of the same gluten-free items were tested. Products were obtained between the years 2008-2009 from supermarkets and nutritional supplement stores located in Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Foods containing chocolate were not included in this study because the polyphenol present in chocolate complicates sample testing.

Analysis of gluten in samples

Samples were first dehydrated and ground to a fine powder that was subsequently passed through a 600µm filter to ensure uniform sample size. Gluten was extracted using 60% ethanol. Briefly, 1 g of sample was dissolved in 10 ml of aqueous 60% ethanol, homogenized and centrifuged. Pelleted material was collected and analyzed for the presence of gluten.

The detection and quantification of gluten was performed using the commercially available R5-ELISA kit Transia[®]Plate Prolamins (Ingenasa, Madrid, Spain) and the Rida[®]Quick Gliadin (R-Biopharm Inc., US) immunochromatographic test. The R5-ELISA method is a double antibody based sandwich ELISA performed in multiwell plates whereas the immunochromatographic test is a lateral flow assay that involves moving sample along a test strip.

The R5-ELISA assay was performed according to the protocol established by the Prolamin Working Group (Valdés, Garcia *et al.*, 2003). Briefly, samples are diluted and incubated for 1 h in separate wells on the R5-ELISA multiwell plate. The peroxidase-conjugated secondary antibody is then added to each well and incubated for 1 h. After washing the wells, the enzymatic substrate tetramethylbenzidine is added to each well. The reaction is stopped by the addition of 2.5 M sulphuric acid, which results in the development of a yellow color. The intensity of the color signal was read at a wavelength of 450 nm using a Zenith 200rt microplate reader (Anthos-Labtec, Cambridge, UK). The assays used in this analysis specifically detect the prolamin content of gluten. According to the manufacturer's specifications, the sensitivity of the test is 1.5 ppm of gliadin. Results from the R5-ELISA were ready in 3 h.

In the immunochromatographic test, the supernatant was first diluted in dilution buffer 1:11. The dipstick was subsequently placed inside the diluted sample and read after 5 min. The results from this assay are read directly from the dipstick. Two bands are observed on the dipstick when gluten is detected, whereas only a single band is observed when gluten is not detected. If no band is visible, the result is invalid. The results of immunochromatographic test were available within 5-15 min.

Statistical evaluation

For this study, seventy different products were selected for gluten testing. Table 1 shows the sample characterization. The number of samples tested in this study was determined based on similar studies performed in Brazil (Abreu, Barbosa *et al.*, 2006; Hirayama e Sdepanian, 2007). We estimated a confidence interval of 95% and margin of error 7%. The results of immunochromatographic test were compared to those obtained in R5-ELISA using a McNemar test. All data were analyzed using the software SPSS 13.0.

Discussion

The readouts of the two gluten detection assays compared in this analysis are different. In the case of the R5-ELISA, the results are quantitative whereas with the immunochromatographic the results are qualitative. For the immunochromatographic test, if gluten is present in amounts greater than 5 ppm, the test gives a positive reading.

We chose two different cutoff values of the R5-ELISA to use as categorical variables in comparing results from the two assays: 5 ppm, the LOD of the immunochromatographic test, and 20 ppm, the recommended Codex standard for gluten-free foods. Comparing the results of the immunochromatographic and the R5-ELISA at the 5 ppm cutoff allows us to determine the sensitivity and specificity of the immunochromatographic test. Comparing results at the 20 ppm cutoff allows us to determine the suitability of the method for identifying foods that meet the recommended criteria of the Codex.

Evaluation of gluten content in foods labeled as “gluten-free”

Table 2 shows the results of the analysis from the R5-ELISA assay and the immunochromatographic test. Results from the R5-ELISA assay indicate that nine samples (12.9%) had gluten levels higher than 20 ppm, the value recommended by the Codex for a naturally gluten-free food. Twenty samples (28.6%) tested with gluten levels greater than 5 ppm (data shown in figure 1). The results of the immunochromatographic test were positive in nineteen samples (27.1%). There were no significant differences between results of R5-ELISA and those of immunochromatographic test ($p = 1.00$). The samples with gluten levels higher than 20 ppm are shown in table 1.

Table 2. Analysis of gluten content in foods labeled “gluten-free”

Figure 1: Distribution of gluten concentrations of the samples analyzed by R5-ELISA. In this figure the value recommended by the Codex for a food produced with naturally gluten-free ingredients to be considered gluten-free (20 ppm) and the LOD of immunochromatographic method (5 ppm) are highlighted. A sample with value over 200 ppm was omitted (sample n° 11-soy flour).

Evaluation of the sensitivity and specificity of the immunochromatographic test

The analysis shows a sensitivity and specificity of 100 % (CI 95%:71-100%) and 83% (CI 95%: 72.7-100%) respectively for the immunochromatographic test when compared to the results from the R5-ELISA at the detection value of 20 ppm. Evaluating the sensitivity and specificity of the immunochromatographic test compared to the R5-ELISA assay using a detection value of 5 ppm, we find a sensitivity and specificity of 90% (CI 95%:70.7-98.3) and 98% (CI 95%: 90.5-99.9%) respectively with a predictive negative value of 100% and a Kappa coefficient 0.89. This demonstrates very good agreement between methods (see table 3) (Landis e Koch, 1977; Altman, 1991).

Table 3. Comparison of the two assays

Discussion

A disturbing percentage of foods labeled as gluten-free were determined to have gluten levels in excess of 20 ppm, the maximum value recommended by the Codex. Like many countries, Brazil has laws that ask food manufacturers to warn consumers about the presence of gluten in their products (Brasil, 2003). Standards for gluten levels in foods have not yet been adopted and currently no monitoring system exists for systematically evaluating

the gluten content in foods. Warnings on food labels are based on the ingredient list. No standardized scientific analysis is performed to ensure that the information on the labels is accurate.

The R5 antibody, developed by Valdes *et al* (Valdés, Garcia *et al.*, 2003), recognizes the pentapeptide motif QQPFP of prolamins. This motif is thought to be responsible for inducing the abnormal immune response of celiac patients to wheat (Osman, Uhlig, Valdes *et al.*, 2001; Valdés, Garcia *et al.*, 2003; Kahlenberg, Sanchez, Lachmann *et al.*, 2006). This antibody does not recognize prolamins that are not toxic to celiacs, for instance prolamins found in oat, rice and maize, reducing the risk of identifying false positives in gluten detection assays that utilize this antibody (Mendez, Vela *et al.*, 2005). The R5-ELISA assay is a quantitative method with a sensitivity of 3 ppm of gluten.

In recent years, other methods for gluten detection have been developed, such as mass spectrometry and DNA analysis (Wieser e Koehler, 2008). These methods were not discussed in this paper, however, as our objective was to test a simple and less complicated assay for gluten detection.

According to Valdés *et al*, gluten extraction should be performed using the Mendez cocktail, a solution containing the reducing agent 2-mercaptoethanol and guanidine hydrochloride (Valdés, Garcia *et al.*, 2003). Both reagents can cause skin or respiratory irritation and with chronic exposure they can be hazardous to the central nervous system. Because the aim of this study was to test a method that is simple and inexpensive, we chose to use the ethanol extraction procedure. For non-processed foodstuffs, extracting gluten using the cocktail yielded results only slightly higher than ethanol extraction, with an average 1.1-fold increase in the quantification of gluten. In foods heated to temperatures over 80°C, gluten concentrations extracted using the cocktail were 3-fold higher than gluten concentrations obtained after ethanol extraction (Garcia, Llorente *et al.*, 2005). Though ethanol extraction is not as efficient as the cocktail in extracting gluten and may have led to underestimating the gluten content in processed foods, it likely reduces the risk of identifying false positives.

Celiacs must remain on a lifelong gluten-free diet. It is important that steps are taken to ensure celiac patients do not ingest gluten-contaminated food. Standards recommending safe limits for gluten levels in food must be instituted and the gluten levels of commercially available products should be monitored. In the present study, we have found that the immunochromatographic test is a sensitive and reliable method for detecting gluten in foods. The immunochromatographic test offers several advantages over the ELISA including the fact that it does not require the specialized equipment used in the R5-ELISA assay. The immunochromatographic test could be a powerful tool for gluten testing of products to ensure that they are safe for people with CD.

As this is a preliminary study we realize that the number of samples analyzed was limited. We intend to follow up on this initial investigation and analyze more samples to better determine the percentage of improperly labeled gluten-free foods.

Conclusions

Using both the R5-ELISA assay and the immunochromatographic dipsticks, we detected gluten in foods labeled “gluten-free”. The results from this preliminary study demonstrate that a high proportion of foods denoted as gluten-free in fact contain levels of gluten greater than the maximum limit recommended by the Codex. Our results further suggest that the immunochromatographic test is a sensitive and reliable method for detecting gluten. Given the ease with which the immunochromatographic test can be administered and the speed with which results can be obtained, the immunochromatographic test could prove a useful screening tool for gluten content in food products and the validation of product labels.

Acknowledgements

The results of this paper were formally communicated to the responsible entities by the Grupo de Pesquisa e Pós-graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA)

References

ABREU, R. W. D.; BARBOSA, S. F. C.; TORRE, J. C. D. M. D.; LICHTIG, J.; ZENEBON, O. Detecção de glúten em alimentos por meio de ELISA. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 3, n. 65, p. 176-80, 14/07/2007 2006. ISSN 0073-9855.

AL-TOMA, A.; VERBEEK, W. H. M.; HADITHI, M.; VON BLOMBERG, B. M. E.; MULDER, C. J. J. Survival in refractory coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma: Retrospective evaluation of single-centre experience. **Gut**, v. 56, n. 10, p. 1373-1378, 2007.

ALMEIDA, P. L. D.; GANDOLFI, L.; MODELLI, I. C.; MARTINS, R. D. C.; ALMEIDA, R. C. D.; PRATESI, R. Prevalence of celiac disease among first degree relatives of Brazilian celiac patients. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 45, p. 69-72, 2008.

ALTMAN, D. G. **Practical Statistics for Medical Research. 1st Ed.**, p. 611, 1991.

ANDERSON, R. P.; DEGANNO, P.; GODKIN, A. J.; JEWELL, D. P.; HILL, A. V. S. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. **Nature Medicine**, v. 6, n. 3, p. 337-342, 2000.

AOAC. **Gliadin as a Measure of Gluten in Foods. Colorimetric Monoclonal Antibody Enzyme Immunoassay Method. First Action 1991. Final Action 2001**, 2005.

ARENTZ-HANSEN, H.; FLECKENSTEIN, B.; MOLBERG, O.; SCOTT, H.; KONING, F.; JUNG, G.; ROEPSTORFF, P.; LUNDIN, K. E.; SOLLID, L. M. The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. **PLoS Med**, v. 1, n. 1, p. e1, Oct 2004. ISSN 1549-1676 (Electronic).

BALDASSARRE, M.; LANEVE, A. M.; GROSSO, R.; LAFORGIA, N. Celiac disease: pathogenesis and novel therapeutic strategies. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 8, n. 3, p. 152-8, Sep 2008. ISSN 1871-5303 (Print).

BETHUNE, M. T.; BORDA, J. T.; RIBKA, E.; LIU, M. X.; PHILLIPPI-FALKENSTEIN, K.; JANDACEK, R. J.; DOXIADIS, G. G. M.; GRAY, G. M.; KHOSIA, C.; SESTAK, K. A non-human primate model for gluten sensitivity. **PLoS ONE**, v. 3, n. 2, 2008.

BHALLA, P. L. Genetic engineering of wheat--current challenges and opportunities. **Trends Biotechnol**, v. 24, n. 7, p. 305-11, Jul 2006. ISSN 0167-7799 (Print).

BODE, S.; GUDMAND-HOYER, E. Symptoms and haematologic features in consecutive adult coeliac patients. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 31, n. 1, p. 54-60, 1996.

BONAMICO, M.; NENNA, R.; LUPARIA, R. P. L.; PERRICONE, C.; MONTUORI, M.; LUCANTONI, F.; CASTRONOVO, A.; MURA, S.; TURCHETTI, A.; STRAPPINI, P.; TIBERITI, C. Radioimmunological detection of anti-transglutaminase autoantibodies in human saliva: A useful test to monitor coeliac disease follow-up. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 28, n. 3, p. 364-370, 2008.

BRANDT, K. G.; SILVA, G. A. [Seroprevalence of celiac disease at a general pediatric outpatient clinic]. **Arq Gastroenterol**, v. 45, n. 3, p. 239-42, Jul-Sep 2008. ISSN 1678-4219 (Electronic) 0004-2803 (Linking).

BRASIL. **Lei nº 8543, de 23 de dezembro de 1992. Determina a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten.** Diário Oficial da União: Brasília 1992.

_____. **Resolução RDC ANVISA/MS nº. 259. Regulamento Técnico para Rotulagem de alimentos e bebidas embalados que contenham glúten.** Brasília, DF: Diário Oficial da União 2002.

_____. **Lei nº 10.674 de 16 de Maio de 2003. Obriga a que todos produtos alimentícios informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva de controle da doença celíaca.** Diário Oficial da União. 19 de maio de 2003 2003.

BUTCH, A. W.; TANG, M. E.; STANDAGE, J. C. Dilution protocols for detection of hook effects/prozone phenomenon [3] (multiple letters). **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 1719-1721, 2000.

BUTTERWORTH, J. R.; BANFIELD, L. M.; IQBAL, T. H.; COOPER, B. T. Factors relating to compliance with a gluten-free diet in patients with coeliac disease: Comparison of white Caucasian and South Asian patients. **Clinical Nutrition**, v. 23, n. 5, p. 1127-1134, 2004.

CAMPOS, J. V. A biópsia peroral do intestino delgado na criança. Bases para o estudo da mucosa entérica. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 7, p. 107-110, 1970.

CASSOL, C. A.; PELLEGRIN, C. P. D. perfil dos portadores de doença celíaca associados na ACELBRA/SC. **Jornal Sem Glúten + Saúde**, v. A7, n. Maio 28, 2006.

CATALDO, F.; LIO, D.; MARINO, V.; PICARELLI, A.; VENTURA, A.; CORAZZA, G. R. IgG(1) antiendomysium and IgG antitissue transglutaminase (anti-tTG) antibodies in coeliac patients with selective IgA deficiency. **Gut**, v. 47, n. 3, p. 366-369, 2000.

CATASSI, C.; FABIANI, E.; IACONO, G.; D'AGATE, C.; FRANCAVILLA, R.; BIAGI,

F.; VOLTA, U.; ACCOMANDO, S.; PICARELLI, A.; DE VITIS, I.; PIANELLI, G.; GESUITA, R.; CARLE, F.; MANDOLESI, A.; BEARZI, I.; FASANO, A. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. **Am J Clin Nutr**, v. 85, n. 1, p. 160-6, Jan 2007. ISSN 0002-9165 (Print).

CICLITIRA, P. J.; ELLIS, H. J.; LUNDIN, K. E. A. Gluten-free diet - What is toxic? **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 19, n. 3 SPEC. ISS., p. 359-371, 2005.

CODEX, C. A. C. O. T. J. F. A. A. O. A. T. W. H. O. O. T. U. N. **Codex Standard for Foods for Special Dietary use for Persons Intolerant to Gluten**. Rome, Italy 2008.

CORAZZA, G. R.; VALENTINI, R. A.; ANDREANI, M. L.; D'ANCHINO, M.; LEVA, M. T.; GINALDI, L.; DE FEUDIS, L.; QUAGLINO, D.; GASBARRINI, G. Subclinical coeliac disease is a frequent cause of iron-deficiency anaemia. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 30, n. 2, p. 153-156, 1995.

CORRAO, G.; CORAZZA, G. R.; BAGNARDI, V.; BRUSCO, G.; CIACCI, C.; COTTONE, M.; SATEGNA GUIDETTI, C.; USAI, P.; CESARI, P.; PELLI, M. A.; LOPERFIDO, S.; VOLTA, U.; CALABRÀ³, A.; CERTO, M. Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: A cohort study. **Lancet**, v. 358, n. 9279, p. 356-361, 2001.

CROVELLA, S.; BRANDAO, L.; GUIMARAES, R.; DE LIMA FILHO, J. L.; ARRAES, L. C.; VENTURA, A.; NOT, T. Speeding up coeliac disease diagnosis in the developing countries. **Digestive and Liver Disease**, v. 39, n. 10, p. 900-902, 2007.

CROWE, S. Abstracts of Digestive Disease Week and the 108th Annual Meeting of the American Gastroenterological Association Institute, May 19-24, 2007, Washington, DC, USA. **Gastroenterology**, v. 132, n. 4 Suppl 2, 2007.

DAHINDEN, I.; VON BÜREN, M.; LÜTHY, J. A quantitative competitive PCR system to detect contamination of wheat, barley or rye in gluten-free food for coeliac patients. **European Food Research and Technology**, v. 212, n. 2, p. 228-233, 2001.

DEBNATH, J.; MARTIN, A.; GOWDA, L. R. A polymerase chain reaction directed to detect wheat glutenin: Implications for gluten-free labelling. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 782-787, 2009.

DEBNATH, S. C.; RICARD, E. ISSR, anthocyanin content and antioxidant activity analyses to characterize strawberry genotypes. **Journal of Applied Horticulture**, v. 11, n. 2, p. 83-89, 2009.

DEWAR, D.; PEREIRA, S. P.; CICLITIRA, P. J. The pathogenesis of coeliac disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 1, p. 17-24, 2004.

DI NIRO, R.; D'ANGELO, S.; MARZARI, R.; SANTORO, C.; SBLATTERO, D.

Autoantibody Profiling of Celiac Disease by Antigen Microarrays. 13th International Coeliac Disease Symposium, 2009. Amsterdam, the Netherlands. April, 6-8. p.54.

DI SABATINO, A.; CORAZZA, G. R. Coeliac disease. **Lancet**, v. 373, n. 9673, p. 1480-93, Apr 25 2009. ISSN 1474-547X (Electronic).

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. **Nature Medicine**, v. 3, n. 7, p. 797-801, 1997.

DINIZ-SANTOS, D.; ADAN, L.; ANDRADE, C. D.; GALVÃO, Y.; JATOBÁ, I.; MOREIRA, A.; PAES, I.; FREITAS, L.; SILVA, L. Prevalence and Clinical Features of Unrecognized Celiac Disease in Young Brazilian Patients with Type 1 Diabetes Mellitus. 13th International Coeliac Disease Symposium, 2009. Amsterdam, the Netherlands. April 6-8. p.92.

DRAGO, S.; EL ASMAR, R.; DI PIERRO, M.; CLEMENTE, M. G.; TRIPATHI, A.; SAPONE, A.; THAKAR, M.; IACONO, G.; CARROCCIO, A.; D'AGATE, C.; NOT, T.; ZAMPINI, L.; CATASSI, C.; FASANO, A. Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 41, n. 4, p. 408-419, 2006.

EC, T. C. O. T. E. C.-. **COMMISSION REGULATION (EC) No 41/2009 of 20 January 2009 concerning the composition and labelling of foodstuffs suitable for people intolerant to gluten.** <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:016:0003:0005:EN:PDF> 2009.

ERRICHELLO, S.; ESPOSITO, O.; DI MASE, R.; CAMARCA, M. E.; NATALE, C.; LIMONGELLI, M. G.; MARANO, C.; CORUZZO, A.; LOMBARDO, M.; STRISCIUGLIO, P.; GRECO, L. Celiac disease: Predictors of compliance with a gluten-free diet in adolescents and young adults. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 50, n. 1, p. 54-60, 2010.

FASANO, A. **Surpresas da Doença Celíaca.** Scientific American Brasil: Duetto Editorial 2009.

FASANO, A.; BERTI, I.; GERARDUZZI, T.; NOT, T.; COLLETTI, R. B.; DRAGO, S.; ELITSUR, Y.; GREEN, P. H.; GUANDALINI, S.; HILL, I. D.; PIETZAK, M.; VENTURA, A.; THORPE, M.; KRYSZAK, D.; FORNAROLI, F.; WASSERMAN, S. S.; MURRAY, J. A.; HORVATH, K. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. **Arch Intern Med**, v. 163, n. 3, p. 286-92, Feb 10 2003. ISSN 0003-9926 (Print).

FASANO, A.; TRONCONE, R. Frontiers in celiac disease. In: BRANSKI, D. (Ed.). **Pediatric and adolescent Medicine**. 1. Basel: S. Karger AG, v.12, 2008. p.222. ISBN 978-3-8055-8526-2

FDA, F. A. D. A. **72 FR 2795 January 23, 2007: Food Labeling; Gluten-Free**

Labeling of Foods.

<http://www.fda.gov/Food/LabelingNutrition/FoodAllergensLabeling/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/ucm077926.htm> 2007.

GADEWAR, S.; FASANO, A. Celiac disease: Is the atypical really typical? Summary of the recent National Institutes of Health Consensus Conference and latest advances. **Current Gastroenterology Reports**, v. 7, n. 6, p. 455-461, 2005.

GANDOLFI, L.; PRATESI, R.; CORDOBA, J. C. M.; TAUILL, P. L.; GASPARIN, M.; CATASSI, C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. **American Journal of Gastroenterology**, v. 95, n. 3, p. 689-692, 2000.

GARCIA, E.; LLORENTE, M.; HERNANDO, A.; KIEFFER, R.; WIESER, H.; MENDEZ, E. Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, n. 5, p. 529-39, May 2005. ISSN 0954-691X (Print).

GRECO, L.; ROMINO, R.; COTO, I.; DI COSMO, N.; PERCOPO, S.; MAGLIO, M.; PAPARO, F.; GASPERI, V.; LIMONGELLI, M. G.; COTICHINI, R.; D'AGATE, C.; TINTO, N.; SACCHETTI, L.; TOSI, R.; STAZI, M. A. The first large population based twin study of coeliac disease. **Gut**, v. 50, n. 5, p. 624-8, May 2002.

GREEN, P. H. R. Where are all those patients with celiac disease? **American Journal of Gastroenterology**, v. 102, n. 7, p. 1461-1463, 2007.

GREEN, P. H. R.; JABRI, B. Coeliac disease. **Lancet**, v. 362, n. 9381, p. 383-391, 2003.

_____. **Celiac disease**. Annual Review of Medicine. 57: 207-221 p. 2006.

GUANDALINI, S. Historical perspective of celiac disease. **Frontiers in Celiac Disease**, v. 12, p. 1-11, 2008.

HALL, N. J.; RUBIN, G.; CHARNOCK, A. Systematic review: Adherence to a gluten-free diet in adult patients with coeliac disease. **Aliment Pharmacol Ther**, May 26 2009. ISSN 1365-2036 (Electronic).

HALLERT, C.; SANDLUND, O.; BROQVIST, M. Perceptions of health-related quality of life of men and women living with coeliac disease. **Scandinavian Journal of Caring Sciences**, v. 17, n. 3, p. 301-307, 2003.

HERNANDO, A.; MUJICO, J. R.; MENA, M. C.; LOMBARDIA, M.; MENDEZ, E. Measurement of wheat gluten and barley hordeins in contaminated oats from Europe, the United States and Canada by Sandwich R5 ELISA. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 20, n. 6, p. 545-54, Jun 2008. ISSN 0954-691X (Print).

HERNANDO, A.; VALDES, I.; MENDEZ, E. New strategy for the determination of gliadins in maize- or rice-based foods matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: fractionation of gliadins from maize or rice

prolamins by acidic treatment. **J Mass Spectrom**, v. 38, n. 8, p. 862-71, Aug 2003. ISSN 1076-5174 (Print)
1076-5174 (Linking).

HERRMAN, H.; METELKO, Z.; SZABO, S.; RAJKUMAR, S.; KUMAR, S.; VAN HECK, G.; DE VRIES, J.; ARROYO, S.; KABANOV; LOMACHENKOV; BURKOVSKY; SUKWATANA, S.; MEESAPYA, K.; SKEVINGTON, S.; PATRICK, D.; MARTIN, M.; MUTAMBIRWA, J.; SARTORIUS, N.; ORLEY, J.; KUYKEN, W. Study protocol for the World Health Organization project to develop a Quality of Life assessment (WHOQOL). **Quality of Life Research**, v. 2, n. 2, p. 153-159, 1993.

HILL, I. D. What are the sensitivity and specificity of serologic tests for celiac disease? Do sensitivity and specificity vary in different populations? **Gastroenterology**, v. 128, n. 4, Supplement 1, p. S25-S32, 2005.

HIRAYAMA, K. B.; SDEPANIAN, V. L. **[Assessment of gluten in homemade foods prepared by celiac disease patients and/or their caretakers]**. 2007. 79 Thesis (Master). Universidade Federal de São Paulo - Brasil
São Paulo.

HISCHENHUBER, C.; CREVEL, R.; JARRY, B.; MAKI, M.; MONERET-VAUTRIN, D. A.; ROMANO, A.; TRONCONE, R.; WARD, R. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 23, n. 5, p. 559-75, Mar 1 2006. ISSN 0269-2813 (Print).

HÖGBERG, L.; LAURIN, P.; FÄLTH-MAGNUSSON, K.; GRANT, C.; GRODZINSKY, E.; JANSSON, G.; ASCHER, H.; BROWALDH, L.; HAMMERSJÖ, J. A.; LINDBERG, E.; MYRDAL, U.; STENHAMMAR, L. Oats to children with newly diagnosed coeliac disease: A randomised double blind study. **Gut**, v. 53, n. 5, p. 649-654, 2004.

HOOFNAGLE, A. N.; WENER, M. H. The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 347, n. 1-2, p. 3-11, 2009.

IMMER, U.; HAAS-LAUTERBACH, S. The question of extraction procedures. **Proceedings of the 19th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity**, p. 45-52, 2005.

JABRI, B.; KASARDA, D. D.; GREEN, P. H. R. Innate and adaptive immunity: The Yin and Yang of celiac disease. **Immunological Reviews**, v. 206, p. 219-231, 2005.

JANATUINEN, E. K.; KEMPPAINEN, T. A.; JULKUNEN, R. J. K.; KOSMA, V. M.; MÄKI, M.; HEIKKINEN, M.; UUSITUPA, M. I. J. No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. **Gut**, v. 50, n. 3, p. 332-335, 2002.

JANATUINEN, E. K.; PIKKARAINEN, P. H.; KEMPPAINEN, T. A.; KOSMA, V. M.; JARVINEN, R. M.; UUSITUPA, M. I.; JULKUNEN, R. J. A comparison of diets with and without oats in adults with celiac disease. **N Engl J Med**, v. 333, n. 16, p. 1033-7, Oct 19 1995. ISSN 0028-4793 (Print).

KAHLENBERG, F.; SANCHEZ, D.; LACHMANN, I.; TUCKOVA, L.; TLASKALOVA, H.; MÃ©ONDEZ, E.; MOTHESE, T. Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides. **European Food Research and Technology**, v. 222, n. 1-2, p. 78-82, 2006.

KASARDA, D. D. **The Grain**. Greenbelt: Department of health and human services food and drug administration center for food safety and applied nutrition: 85-90 p. 2005.

KAUKINEN, K.; COLLIN, P.; LAURILA, K.; KAARTINEN, T.; PARTANEN, J.; MÃ¤KI, M. Resurrection of gliadin antibodies in coeliac disease. Deamidated gliadin peptide antibody test provides additional diagnostic benefit. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 42, n. 12, p. 1428-1433, 2007.

KEECH, C. L.; DROMEY, J.; CHEN, Z. Immune tolerance induced by peptide immunotherapy in an HLA-DQ2-dependent mouse model of gluten immunity. **Gastroenterology**, v. 136, p. A-57, 2009.

KELLY, C. P.; LEON, F.; GREEN, P. H. R.; LEFFLER, D. A.; FEDORAK, R.; COLATRELLA, A.; LEON, F.; JIANG, J.; DI MARINO, A.; MURRAY, J. A. **Larazotide acetate reduces the immunological response and the clinical sequelae of gluten exposure in celiac disease**. Proceedings of the 13th International Coeliac Disease Symposium. Amsterdam, the Netherlands 2009.

KEMPPAINEN, T.; KRÖGER, H.; JANATUINEN, E.; ARNALA, I.; KOSMA, V. M.; PIKKARAINEN, P.; JULKUNEN, R.; JURVELIN, J.; ALHAVA, E.; UUSITUPA, M. Osteoporosis in adult patients with celiac disease. **Bone**, v. 24, n. 3, p. 249-255, 1999.

KILMARTIN, C.; WIESER, H.; ABUZAKOUK, M.; KELLY, J.; JACKSON, J.; FEIGHERY, C. Intestinal T cell responses to cereal proteins in celiac disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, n. 1, p. 202-209, 2006.

LAMMERS, K. M.; LU, R.; BROWNLEY, J.; LU, B.; GERARD, C.; THOMAS, K.; RALLABHANDI, P.; SHEA-DONOHUE, T.; TAMIZ, A.; ALKAN, S.; NETZEL-ARNETT, S.; ANTALIS, T.; VOGEL, S. N.; FASANO, A. Gliadin Induces an Increase in Intestinal Permeability and Zonulin Release by Binding to the Chemokine Receptor CXCR3. **Gastroenterology**, v. 135, n. 1, 2008.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LEBENTHAL, E.; SHTEYER, E.; BRANSKI, D. The Changing Clinical Presentation of Celiac Disease. In: FASANO, A.; TRONCONE, R., *et al* (Ed.). **Frontiers in Celiac Disease**. Basel: S. Karger AG, v.12, 2008. p.19-22. ISBN 978-3-8055-8526-2

LEE, A.; NEWMAN, J. M. Celiac diet: Its impact on quality of life. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 103, n. 11, p. 1533-1535, 2003.

LEE, S. K.; LO, W.; MEMEO, L.; ROTTERDAM, H.; GREEN, P. H. R. Duodenal histology in patients with celiac disease after treatment with a gluten-free diet. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 57, n. 2, p. 187-191, 2003.

LI, M.; YU, L.; TIBERTI, C.; BONAMICO, M.; TAKI, I.; MIAO, D.; MURRAY, J. A.; REWERS, M. J.; HOFFENBERG, E. J.; AGARDH, D.; MUELLER, P.; STERN, M.; BONIFACIO, E.; LIU, E. A report on the international transglutaminase autoantibody workshop for celiac disease. **American Journal of Gastroenterology**, v. 104, n. 1, p. 154-163, 2009.

LOSOWSKY, M. S. A history of coeliac disease. **Digestive Diseases**, v. 26, n. 2, p. 112-120, 2008.

LUNDIN, K. E.; NILSEN, E. M.; SCOTT, H. G.; LOBERG, E. M.; GJOEN, A.; BRATLIE, J.; SKAR, V.; MENDEZ, E.; LOVIK, A.; KETT, K. Oats induced villous atrophy in coeliac disease. **Gut**, v. 52, n. 11, p. 1649-52, Nov 2003. ISSN 0017-5749 (Print).

MAKI, M.; MUSTALAHTI, K.; KOKKONEN, J.; KULMALA, P.; HAAPALAHTI, M.; KARTTUNEN, T.; ILONEN, J.; LAURILA, K.; DAHLBOM, I.; HANSSON, T.; HOPFL, P.; KNIP, M. Prevalence of Celiac disease among children in Finland. **N Engl J Med**, v. 348, n. 25, p. 2517-24, Jun 19 2003. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking).

MARSH, M. N. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). **Gastroenterology**, v. 102, n. 1, p. 330-54, Jan 1992. ISSN 0016-5085 (Print).

MATYSIAK-BUDNIK, T.; CANDALH, C.; CELLIER, C.; DUGAVE, C.; NAMANE, A.; VIDAL-MARTINEZ, T.; CERF-BENSUSSAN, N.; HEYMAN, M. Limited efficiency of prolyl-endopeptidase in the detoxification of gliadin peptides in celiac disease. **Gastroenterology**, v. 129, n. 3, p. 786-96, Sep 2005. ISSN 0016-5085 (Print).

MEARIN, M. L. Celiac Disease Among Children and Adolescents. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 37, n. 3, p. 86-105, 2007.

MEEUWISSE, G. W. Round table discussion. Diagnostic criteria in coeliac disease. **Acta Paediatrica Scandinavica**, v. 59, p. 461-3, 1970.

MELO, S.; FERNANDES, M.; PERES, L.; TRONCON, L.; GALVÃO, L. Prevalence and Demographic Characteristics of Celiac Disease Among Blood Donors in Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 51, n. 5, p. 1020-1025, 2006.

MENDEZ, E.; VELA, C.; IMMER, U.; JANSSEN, F. W. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 17, n. 10, p. 1053-63,

Oct 2005. ISSN 0954-691X (Print).

MOLBERG, O.; MCADAM, S. N.; KORNER, R.; QUARSTEN, H.; KRISTIANSEN, C.; MADSEN, L.; FUGGER, L.; SCOTT, H.; NOREN, O.; ROEPSTORFF, P.; LUNDIN, K. E.; SJOSTROM, H.; SOLLID, L. M. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. **Nat Med**, v. 4, n. 6, p. 713-7, Jun 1998. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking).

MORA, S.; BARERA, G.; BECCIO, S.; MENNI, L.; PROVERBIO, M. C.; BIANCHI, C.; CHIUMELLO, G. A prospective, longitudinal study of the long-term effect of treatment on bone density in children with celiac disease. **Journal of Pediatrics**, v. 139, n. 4, p. 516-521, 2001.

MORIARTY, K. J.; LOFT, D.; MARSH, M. N.; BROOKS, S. T.; GORDON, D.; GARNER, G. V. Holy communion wafers and celiac disease. **N Engl J Med**, v. 321, n. 5, p. 332, Aug 3 1989. ISSN 0028-4793 (Print).

MUSTALAHTI, K.; LOHINIEMI, S.; COLLIN, P.; VUOLTEENAHO, N.; LAIPPALA, P.; MÄKI, M. Gluten-free diet and quality of life in patients with screen-detected celiac disease. **Effective clinical practice : ECP**, v. 5, n. 3, p. 105-113, 2002.

NEW ZEALAND AND AUSTRALIA. **Food Standards Code. STANDARD 1.2.8 NUTRITION INFORMATION REQUIREMENTS.** CODE, A. N. Z. F. S. C.-T. <http://www.foodstandards.gov.au/foodstandards/foodstandardscode/>: Gluten-Free Certification Organization. 2010 2010.

NISIHARA, R. M.; KOTZE, L. M. S.; UTIYAMA, S. R. R.; OLIVEIRA, N. P.; FIEDLER, P. T.; MESSIAS-REASON, I. T. Celiac disease in children and adolescents with Down syndrome. **Jornal de Pediatria**, v. 81, n. 5, p. 373-376, 2005.

NISTICO, L.; FAGNANI, C.; COTO, I.; PERCOPO, S.; COTICHINI, R.; LIMONGELLI, M. G.; PAPARO, F.; D'ALFONSO, S.; GIORDANO, M.; SFERLAZZAS, C.; MAGAZZU, G.; MOMIGLIANO-RICHIARDI, P.; GRECO, L.; STAZI, M. A. Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. **Gut**, v. 55, n. 6, p. 803-8, Jun 2006.

NUSIER, M.; BRODTKORB, H.; REIN, S.; ODEH, A.; RADAIDEH, A.; KLUNGLAND, H. Serological screening for celiac disease in schoolchildren in Jordan. Is height and weight affected when seropositive? **Italian Journal of Pediatrics**, v. 36, n. 1, p. 16, 2010.

O'LEARY, C.; WIENEKE, P.; HEALY, M.; CRONIN, C.; O'REGAN, P.; SHANAHAN, F. Celiac disease and the transition from childhood to adulthood: A 28-year follow-up. **American Journal of Gastroenterology**, v. 99, n. 12, p. 2437-2441, 2004.

OLIVEIRA, R. P.; SDEPANIAN, V. L.; BARRETO, J. A.; CORTEZ, A. J. P.; CARVALHO, F. O.; BORDIN, J. O.; DE CAMARGO SOARES, M. A.; DA SILVA PATRÍCIO, F. R.; KAWAKAMI, E.; DE MORAIS, M. B.; FAGUNDES-NETO, U. High

prevalence of celiac disease in Brazilian blood donor volunteers based on screening by IgA antitissue transglutaminase antibody. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 19, n. 1, p. 43-49, 2007.

OSMAN, A. A.; UHLIG, H. H.; VALDES, I.; AMIN, M.; MÉNDEZ, E.; MOTHE, T. A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 13, n. 10, p. 1189-1193, 2001.

PATERSON, B. M.; TURNER, J. R. Inhibitors of Intestinal Barrier Dysfunction. In: FASANO, A.; TRONCONE, R., *et al* (Ed.). **Frontiers in celiac disease**. 1. Basel: S. Karger AG, v.12, 2008. p.157-171. ISBN 978-3-8055-8526-2

PEÑA, A. S.; GARROTE, J. A.; CRUSIUS, J. B. A. Advances in the immunogenetics of coeliac disease. Clues for understanding the pathogenesis and disease heterogeneity. **Scandinavian Journal of Gastroenterology, Supplement**, v. 33, n. 225 SUPPL., p. 56-58, 1998.

PEREIRA, M. A. G.; ORTIZ-AGOSTINHO, C. L.; NISHITOKUKADO, I.; SATO, M. N.; DAMIÃO, A. O. M. C.; ALENCAR, M. L.; ABRANTES-LEMOS, C. P.; CANAŠADO, E. L. R.; DE BRITO, T.; IOSHII, S. O.; VALARINI, S. B. M.; SIPAHI, A. M. Prevalence of celiac disease in an urban area of Brazil with predominantly European ancestry. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 40, p. 6546-6550, 2006.

PLOT, L.; AMITAL, H. Infectious associations of Celiac disease. **Autoimmunity Reviews**, v. 8, n. 4, p. 316-319, 2009.

PRATESI, R.; GANDOLFI, L.; GARCIA, G. S.; MODELLI, I. C.; LOPES DE ALMEIDA, P.; BOCCA, L. A.; CATASSI, C. Prevalence of Coeliac Disease: Unexplained Age-related Variation in the Same Population. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 38, n. 7, p. 747-750, 07 2003.

R-BIOPHARM. The R5 antibody contained in the RIDASCREEN® Gliadin product line shows no cross-reactivity to soy based products. 01/2010 2010. Disponível em: < http://www.r-biopharm.com/Gliadin_no%20cross-reactivity_1-2010.pdf >. Acesso em: 25/05/2010 14:00.

ROBINS, G.; HOWDLE, P. D. Advances in celiac disease. **Curr Opin Gastroenterol**, v. 21, n. 2, p. 152-61, Mar 2005.

RODRIGO, L.; GARROTE, J. A.; VIVAS, S. [Celiac disease]. **Med Clin (Barc)**, v. 131, n. 7, p. 264-70, Sep 6 2008. ISSN 0025-7753 (Print).

RODRIGUES, L.; SILVEIRA, T. R. D.; FLECK, M. P. D. A. **Avaliação da qualidade de vida de crianças celíacas em uso de dieta isenta de glúten: um estudo de caso-controle**. 2007. 141 Dissertação (Mestrado). PPG-Ciências Médicas: Pediatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ROSTAMI, K.; STEEGERS, E. A. P.; WONG, W. Y.; BRAAT, D. D.; STEEGERS-

THEUNISSEN, R. P. M. Coeliac disease and reproductive disorders: A neglected association. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 96, n. 2, p. 146-149, 2001.

ROSTOM, A.; DUBÉ, C.; CRANNEY, A.; SALOOJEE, N.; SY, R.; GARRITTY, C.; SAMPSON, M.; ZHANG, L.; YAZDI, F.; MAMALADZE, V.; PAN, I.; MCNEIL, J.; MOHER, D.; MACK, D.; PATEL, D. Celiac disease. **Evidence report/technology assessment (Summary)**, n. 104, p. 1-6, 2004.

ROSTOM, A.; MURRAY, J. A.; KAGNOFF, M. F. American Gastroenterological Association (AGA) Institute Technical Review on the Diagnosis and Management of Celiac Disease. **Gastroenterology**, v. 131, n. 6, p. 1981-2002, 2006.

RUBIO-TAPIA, A.; KELLY, D. G.; LAHR, B. D.; DOGAN, A.; WU, T.; MURRAY, J. A. Clinical Staging and Survival in Refractory Celiac Disease: A Single Center Experience. **Gastroenterology**, v. 136, n. 1, p. 99-107, 2009.

SALINAS, R. D. **Alimentos e Nutrição introdução à bromatologia. 3ª Ed.** Artmed, 2002. ISBN 8573079916

SALMI, T. T.; COLLIN, P.; JÄRVINEN, O.; HAIMILA, K.; PARTANEN, J.; LAURILA, K.; KORPONAY-SZABO, I. R.; HUHTALA, H.; REUNALA, T.; MÄKI, M.; KAUKINEN, K. Immunoglobulin A autoantibodies against transglutaminase 2 in the small intestinal mucosa predict forthcoming coeliac disease. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v. 24, n. 3, p. 541-552, 2006.

SALMI, T. T.; COLLIN, P.; KORPONAY-SZABÓ, I. R.; LAURILA, K.; PARTANEN, J.; HUHTALA, H.; KIRÁLY, R.; LORAND, L.; REUNALA, T.; MÄKI, M.; KAUKINEN, K. Endomysial antibody-negative coeliac disease: Clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. **Gut**, v. 55, n. 12, p. 1746-1753, 2006.

SATEGNA GUIDETTI, C.; SOLERIO, E.; SCAGLIONE, N.; AIMO, G.; MENGOZZI, G. Duration of gluten exposure in adult coeliac disease does not correlate with the risk for autoimmune disorders. **Gut**, v. 49, n. 4, p. 502-505, 2001.

SCHUBERT-ULLRICH, P.; RUDOLF, J.; ANSARI, P.; GALLER, B.; FÄHRER, M.; MOLINELLI, A.; BAUMGARTNER, S. Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: An overview. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 395, n. 1, p. 69-81, 2009.

SCHUPPAN, D.; JUNKER, Y.; BARISANI, D. Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies. **Gastroenterology**, v. 137, n. 6, p. 1912-1933, 2009.

SHAHRAKI, T.; SHAHRAKI, M.; AL DULAIM, D.; ROSTAMI, K. **Histology doesn't reflect the severity of gluten sensitivity.** 13th International Coeliac Disease Symposium. Amsterdam, the Netherlands: 58 p. 2009.

SHAN, L.; MATHEWS, II; KHOSLA, C. Structural and mechanistic analysis of two prolyl endopeptidases: role of interdomain dynamics in catalysis and specificity. **Proc**

Natl Acad Sci U S A, v. 102, n. 10, p. 3599-604, Mar 8 2005. ISSN 0027-8424 (Print).

SHAN, L.; MOLBERG, O.; PARROT, I.; HAUSCH, F.; FILIZ, F.; GRAY, G. M.; SOLLID, L. M.; KHOSLA, C. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. **Science**, v. 297, n. 5590, p. 2275-9, Sep 27 2002.

SHEWRY, P. R.; HALFORD, N. G.; BELTON, P. S.; TATHAM, A. S. The structure and properties of gluten: An elastic protein from wheat grain. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 357, n. 1418, p. 133-142, 2002.

SILANO, M.; DESSI, M.; DE VINCENZI, M.; CORNELL, H. In vitro tests indicate that certain varieties of oats may be harmful to patients with coeliac disease. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 22, n. 4, p. 528-31, Apr 2007. ISSN 0815-9319 (Print).

SILANO, M.; DI BENEDETTO, R.; MAIALETTI, F.; DE VINCENZI, A.; CALCATERRA, R.; CORNELL, H. J.; DE VINCENZI, M. Avenins from different cultivars of oats elicit response by coeliac peripheral lymphocytes. **Scand J Gastroenterol**, v. 42, n. 11, p. 1302-5, Nov 2007. ISSN 0036-5521 (Print).

SKERRITT, J. H.; HILL, A. S. Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, v. 74, n. 2, p. 257-264, 1991.

STAZI, A. V. [Coeliac disease and reproduction: possible in vivo models]. **Ann Ist Super Sanita**, v. 41, n. 4, p. 523-31, 2005. ISSN 0021-2571 (Print).

STENE, L. C.; HONEYMAN, M. C.; HOFFENBERG, E. J.; HAAS, J. E.; SOKOL, R. J.; EMERY, L.; TAKI, I.; NORRIS, J. M.; ERLICH, H. A.; EISENBARTH, G. S.; REWERS, M. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. **Am J Gastroenterol**, v. 101, n. 10, p. 2333-40, Oct 2006.

TACK, G. J.; VERBEEK, W. H. M.; SCHREURS, M. W. J.; MULDER, C. J. J. The spectrum of celiac disease: Epidemiology, clinical aspects and treatment. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 7, n. 4, p. 204-213, 2010.

THOMPSON, T.; MENDEZ, E. Commercial assays to assess gluten content of gluten-free foods: why they are not created equal. **J Am Diet Assoc**, v. 108, n. 10, p. 1682-7, Oct 2008. ISSN 0002-8223 (Print)
0002-8223 (Linking).

TOMMASINI, A.; NOT, T.; KIREN, V.; BALDAS, V.; SANTON, D.; TREVISIOL, C.; BERTI, I.; NERI, E.; GERARDUZZI, T.; BRUNO, I.; LENHARDT, A.; ZAMUNER, E.; SPANO, A.; CROVELLA, S.; MARTELLOSI, S.; TORRE, G.; SBLATTERO, D.; MARZARI, R.; BRADBURY, A.; TAMBURLINI, G.; VENTURA, A. Mass screening for coeliac disease using antihuman transglutaminase antibody assay. **Arch Dis Child**, v. 89, n. 6, p. 512-5, Jun 2004. ISSN 1468-2044 (Electronic)

0003-9888 (Linking).

TREVISIOL, C.; BRANDT, K. G.; SILVA, G. A.; CROVELLA, S.; VENTURA, A. High prevalence of unrecognized celiac disease in an unselected hospital population in north-eastern Brasil (Recife, Pernambuco). **J Pediatr Gastroenterol Nutr**, v. 39, n. 2, p. 214-5, Aug 2004.

TRONCONE, R.; AURICCHIO, R.; GRANATA, V. Issues related to gluten-free diet in coeliac disease. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v. 11, n. 3, p. 329-33, May 2008. ISSN 1363-1950 (Print).

TURSI, A.; BRANDIMARTE, G.; GIORGETTI, G. M.; ELISEI, W.; INCHINGOLO, C. D.; MONARDO, E.; AIELLO, F. Endoscopic and histological findings in the duodenum of adults with celiac disease before and after changing to a gluten-free diet: A 2-year prospective study. **Endoscopy**, v. 38, n. 7, p. 702-707, 2006.

TURSI, A.; GIORGETTI, G.; BRANDIMARTE, G.; ELISEI, W.; PAPA, A.; LECA, P.; AIELLO, F. Complications in Celiac Disease Under Gluten-Free Diet. 13th International Coeliac Disease Symposium, 2009. Amsterdam, the Netherlands. p.98.

VADER, L. W.; STEPNIAK, D. T.; BUNNIK, E. M.; KOOY, Y. M. C.; DE HAAN, W.; DRIJFHOUT, J. W.; VAN VEELLEN, P. A.; KONING, F. Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. **Gastroenterology**, v. 125, n. 4, p. 1105-1113, 2003.

VALDÉS, I.; GARCIA, E.; LLORENTE, M.; MENDEZ, E. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. **Eur J Gastroenterol Hepatol**, v. 15, n. 5, p. 465-74, May 2003. ISSN 0954-691X (Print).

VAN DE WAL, Y.; KOOY, Y.; VAN VEELLEN, P.; PENA, S.; MEARIN, L.; PAPADOPOULOS, G.; KONING, F. Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. **J Immunol**, v. 161, n. 4, p. 1585-8, Aug 15 1998. ISSN 0022-1767 (Print)
0022-1767 (Linking).

VAN DEN BROECK, H. C.; AMERICA, A. H. P.; SMULDERS, M. J. M.; BOSCH, D.; HAMER, R. J.; GILISSEN, L. J. W. J.; VAN DER MEER, I. M. A modified extraction protocol enables detection and quantification of celiac disease-related gluten proteins from wheat. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 10, p. 975-982, 2009.

VAN HEEL, D. A.; WEST, J. Recent advances in coeliac disease. **Gut**, v. 55, n. 7, p. 1037-46, Jul 2006.

VAN KOPPEN, E. J.; SCHWEIZER, J. J.; CSIZMADIA, C. G. D. S.; KROM, Y.; HYLKEMA, H. B.; VAN GEEL, A. M.; KOOPMAN, H. M.; VERLOOVE-VANHORICK, S. P.; MEARIN, M. L. Long-term health and quality-of-life consequences of mass screening for childhood celiac disease: A 10-year follow-up study. **Pediatrics**, v. 123, n. 4, 2009.

VARRIALE, A.; ROSSI, M.; STAIANO, M.; TERPETSCHNIG, E.; BARBIERI, B.; ROSSI, M.; D'AURIA, S. Fluorescence correlation spectroscopy assay for gliadin in food. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 12, p. 4687-4689, 2007.

VERMEERSCH, P.; GEBOES, K.; MARIËN, G.; HOFFMAN, I.; HIELE, M.; BOSSUYT, X. Diagnostic performance of IgG anti-deamidated gliadin peptide antibody assays is comparable to IgA anti-tTG in celiac disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 411, n. 13-14, p. 931-935, 2010.

VILAR, L.; NAVES, L. A.; GADELHA, M. Armadilhas no diagnóstico da hiperprolactinemia. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, p. 347-357, 2003.

VOLTA, U.; GRANITO, A.; PARISI, C.; FABBRI, A.; FIORINI, E.; PISCAGLIA, M.; TOVOLI, F.; GRASSO, V.; MURATORI, P.; PAPPAS, G.; DE GIORGIO, R. Deamidated gliadin peptide antibodies as a routine test for celiac disease: A prospective analysis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 44, n. 3, p. 186-190, 2010.

WAHAB, P. J.; MEIJER, J. W. R.; MULDER, C. J. J. Histologic follow-up of people with celiac disease on a gluten-free diet: Slow and incomplete recovery. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 118, n. 3, p. 459-463, 2002.

WALKER-SMITH, J. A.; GUANDALINI, S.; SCHMITZ, J.; SHMERLING, D. H.; VISAKORPI, J. K. Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. **Archives of Disease in Childhood**, v. 65, n. 8, p. 909-911, 1990.

WEST, J. Celiac Disease and Its Complications: A Time Traveller's Perspective. **Gastroenterology**, v. 136, n. 1, p. 32-34, 2009.

WIESER, H. The precipitating factor in coeliac disease. **Baillieres Clin Gastroenterol**, v. 9, n. 2, p. 191-207, Jun 1995. ISSN 0950-3528 (Print).

_____. Chemistry of gluten proteins. **Food Microbiol**, v. 24, n. 2, p. 115-9, Apr 2007. ISSN 0740-0020 (Print).

WIESER, H.; KOEHLER, P. The Biochemical Basis of Celiac Disease. **Cereal Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 1-13, 01/02/ 2008.

_____. Is the calculation of the gluten content by multiplying the prolamin content by a factor of 2 valid? **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 1, p. 9-13, 2009.

ZARKADAS, M.; CRANNEY, A.; CASE, S.; MOLLOY, M.; SWITZER, C.; GRAHAM, I. D.; BUTZNER, J. D.; RASHID, M.; WARREN, R. E.; BURROWS, V. The impact of a gluten-free diet on adults with coeliac disease: Results of a national survey. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 19, n. 1, p. 41-49, 2006.

Figures and Tables

Table 1. Types of foodstuffs analyzed and samples with gluten levels over 20 ppm analyzed by R5-ELISA.

Variables	n=70	Samples >20 ppm
Kind of food	n of samples	n (gluten level)
Chicken Seasoning powder	3	-
Flour		
• Corn	6	1 (52,97)
• Rice	4	-
• Manioc	3	-
• Soy	3	2 (55.15; >200)
• Banana	1	-
Pasta		
• Rice	3	-
• Buckwheat	1	-
Cheese breads		
• Powder	2	1 (49.24)
• Frozen	2	-
Cookies		
• Corn		
• Rice	5	-
• Tapioca flour	4	-
• (polvilho)	4	1 (52.28)
• Peanut	1	-
• Soy	1	-
• Quinoa	1	-
Snacks		
• Corn	4	-
• Potato chips	3	-
• Potato Snack	3	-
• Rice	1	-
• Soy	1	-
Breads		
• Corn	1	-
• Manioc	1	-
Cereal Bar	3	-
Granola	5	3 (27.60; 42.21; 56.51; 57.07)
Soup powder		
• Beans	1	1 (57.70)
• Corn	1	-

Pizza dough

2

-

Table 2. Analysis of gluten content in foods labeled “gluten-free”

Methods	Positive	Negative
	n (%)	n (%)
Immunochromatographic	19 (27,1)	51 (72,9)
ELISA > 20 ppm	9 (12,9)	61 (87,1)
ELISA > 5 ppm	20 (28,6)	50 (71,4)

Table 3. Comparison of the two assays

	S	E	VPP	VPN	Kappa
Comparison					
Immunochromatographic x R5-ELISA>20ppm	100	83.6	47.4	100	0.57
Immunochromatographic x R5-ELISA>5ppm	90	98	94.7	96.1	0.89

We compared the immunochromatographic test with two cutoffs of R5-ELISA, 5 ppm of gluten (limit of detection of the immunochromatographic test) and 20 ppm of gluten (limit tolerated by the Codex Alimentarius Commission)

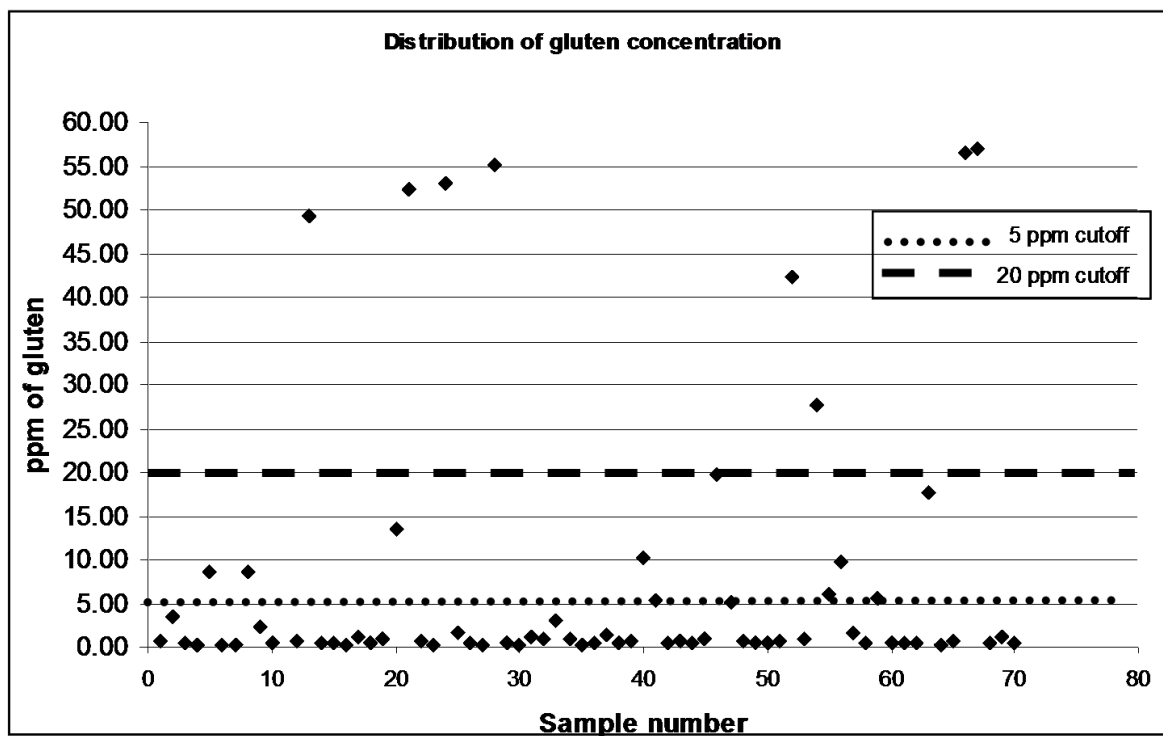


Figure 1: Distribution of gluten concentrations of the samples analyzed by R5-ELISA. In this figure the value recommended by the Codex for a food produced with naturally gluten-free ingredients to be considered gluten-free (20 ppm) and the LOD of immunochromatographic method (5 ppm) are highlighted. A sample with value over 200 ppm was omitted (sample n° 11-soy flour).