



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

## Programa de Doctorado en Biotecnología

### ESTUDIO DE MEDIADORES HUMORALES INMUNOLÓGICOS Y FACTORES DIETÉTICOS DE RIESGO EN LA ENFERMEDAD CELIACA

---

**Tesis Doctoral**

**Presentada por:**

María Roca Llorens

**Dirigida por:**

Dra. Carmen Ribes Koninckx

Dr. Rafael Sirera Pérez

Valencia, julio 2018





UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



Dra. Carmen Ribes Koninckx, Jefe de Sección del Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital Universitari i Politècnic La Fe e Investigadora Principal del grupo de Enfermedad Celíaca e Inmunopatología Digestiva del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe de València,

Dr. Rafael Sirera Pérez, Profesor titular del departamento de Biotecnología de la Universidad Politècnica de Valencia e Investigador en el Laboratorio de Oncología Molecular del Hospital General Universitario de València,

CONSIDERAN: que la memoria titulada “Estudio de mediadores humorales inmunológicos y dietéticos de riesgo en la enfermedad celiaca” que presenta Dña. María Roca Llorens, para aspirar al grado de Doctor de La Universitat Politècnica de València, y que ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital La Fe de València, reúne las condiciones adecuadas para constituir su tesis doctoral, por lo que AUTORIZAN al interesado para su presentación.

València, Julio de 2018

Fdo: Carmen Ribes-Koninckx

Fdo: Rafael Sirera Pérez



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecerles a mis directores su tiempo, dedicación y conocimientos para la realización de esta tesis:

- A la Dra. Carmen Ribes, por permitirme trabajar estos años a su lado, por la confianza depositada en mí, por transmitirme tantos conocimientos, por su capacidad para darle un enfoque único a cada trabajo.
- Al Dr. Rafael Sirera, por aportar sus conocimientos, por su sinceridad y eficacia, por hacer de este camino algo mucho más sencillo.

A todos los niños y niñas, que junto a sus familias han participado en este proyecto.

A todos los que forman parte del Servicio de Gastroenterología del Hospital La Fe, por vuestra inestimable ayuda, gracias por tener siempre un momento para mí: Etna, Begoña, Isabel, Isabel, Fátima, Ana, Puri, Elvira, Águeda y Merche. Éster: por tu ayuda, tu cercanía y serenidad.

A M<sup>a</sup> Carmen Mena y Manuel Lombardía de la Unidad del Gluten del Centro Nacional de Biotecnología por los análisis que forma parte de esta tesis. Mari Carmen, gracias por tu profesionalidad y colaboración.

A mis apreciados compañeros de la Unidad de Enfermedad Celiaca e inmunopatología Digestiva: Miguel, por resolver mil dudas y por tu amistad incondicional. Natalia: por tu ayuda con las figuras, por disfrutar cada día de trabajar codo con codo. Quim: por aportar tanto a nuestro grupo con tu labor, por saber escuchar y dar ánimo. Sara: por tu sentido común, por darlo todo cada día, por crecer y hacernos crecer a tu lado. Paula: por ser mi compañera de congresos. Ana: ha sido todo un descubrimiento conocerte en esta última etapa.

Gracias a todo el equipo de la Unidad de Bioestadística del IISLaFe: David, Viqui y Toni, por vuestra objetividad, por vuestras aportaciones a cada trabajo.

A la Unidad de Microscopia del IISLAFE: Pilar, por ayudarme a conseguir unas imágenes que hablan solas. Inma: por el placer de haber podido trabajar a tu lado.

Thanks to all PreventCD group, it is a pleasure to work with you.

A mi familia: a mis padres, mis referentes, por vuestra magia para convertir montañas en granos de arena. A mi hermano, por comprendernos con solo mirarnos. A Carlos, por estar siempre a mi lado. A mis hijos, Carlos y Daniel, por darle sentido a todo.

A mi otra familia: Paloma, Tito, Bolo, Susi, Peio, Margot, Edu, Elisa, Elisa, Tania, Toni, Jorge, Laura, Nacho, Cristina, por tantos momentos. A mi gente: Esther, Begoña, Marta, Pili, Marga, Gabi, Ramón, Ramón, Carlos, David, Vicente, con vosotros nunca me siento sola.

Muchas gracias a todas aquellas personas que han hecho su pequeña o gran aportación a esta tesis, y sin los que, sin duda todo hubiera resultado más difícil.

## RESUMEN

Diferentes factores genéticos y ambientales influyen en el desarrollo de la enfermedad celíaca (EC). La evidencia clínica muestra que la lactancia materna prolongada se ha asociado a una incidencia decreciente de EC en niños. Partiendo de la hipótesis de que péptidos del gluten y/o anticuerpos anti-gliadina (AAG) presentes en leche materna (LM) podrían ayudar a prevenir o modular el desarrollo de la EC, nos planteamos estudiar la presencia de AAG y péptidos de gliadina en LM en un grupo de madres con diagnóstico de EC que siguen una dieta sin gluten (DSG) y en un grupo de madres no celiacas con dieta normal (DN), y comparar los niveles de anticuerpos y péptidos de gliadina de ambos grupos de madres, con el fin último de poder establecer una posible relación con el desarrollo de EC en su descendencia. El objetivo secundario fue analizar la respuesta inmune precoz en niños que recibieron LM y con diagnóstico de EC, profundizando en la serología, histología, así como la aparición de depósitos intestinales de anticuerpos anti-transglutaminasa tisular (anti-TG2). Tras desarrollar un método para detectar AAG en LM, encontramos AAG presentes tanto en la LM de madres EC tras una DSG, como en madres que siguen una DN, por lo que la dieta no sería un factor clave que influya en la presencia de AAG en LM. Se encontró una marcada tendencia hacia una disminución gradual en el contenido de IgA total en la LM de madres con EC a lo largo de los meses, mientras que permanecía estable en las madres no EC. Esta disminución de las concentraciones de IgA en la LM podría reducir la protección de la mucosa del lactante, contribuyendo a la disbiosis y la respuesta proinflamatoria, ambos factores podrían eventualmente favorecer la pérdida de tolerancia al gluten. En cuanto a la detección de péptidos de gluten en LM, la alta variabilidad en los resultados obtenidos en los análisis, indica la presencia de interferentes en las muestras de LM que estarían alterando la cuantificación de los mismos, siendo necesario investigaciones adicionales para conocer o identificar los componentes que están interfiriendo en el análisis. Por último, confirmamos que los depósitos intestinales de anti-TG2 son un evento precoz en el desarrollo de la respuesta inmunológica responsable de la EC, pudiendo preceder a la aparición de anticuerpos anti-TG2, incluso en lactantes pequeños.

## RESUM

Diferents factors genètics i ambientals influeixen en el desenvolupament de la malaltia celíaca (MC). L'evidència clínica mostra que la lactància materna prolongada s'ha associat a una incidència decreixent de MC en xiquets. Partint de la hipòtesi que pèptids del gluten i/o anticossos anti-gliadina (AAG) presents en llet materna (LM) podrien ajudar a previndre o modular el desenvolupament de la MC, ens plantegem estudiar la presència d'AAG i pèptids de gliadina en LM en un grup de mares amb diagnòstic de MC que segueixen una dieta sense gluten (DSG) i en un grup de mares no celíaques amb dieta normal (DN), i comparar els nivells d'anticossos i pèptids de gliadina d'ambdós grups de mares, amb el fi últim de poder establir una possible relació amb el desenvolupament de MC en la seua descendència. L'objectiu secundari va ser analitzar la resposta immune precoç en xiquets que van rebre LM i amb diagnòstic de MC, aprofundint en la serologia, histologia, així com l'aparició de depòsits d'intestinals d'anticossos anti-transglutaminasa tissular (anti-TG2). Després de desenvolupar un mètode per a detectar AAG en LM, trobem AAG presents tant en la LM de mares MC després d'una DSG, com en mares que segueixen una DN, per la qual cosa la dieta no seria un factor clau que influeix en la presència d'AAG en LM. Es va trobar una marcada tendència cap a una disminució gradual en el contingut d'IgA total en la LM de mares amb MC al llarg dels mesos, mentre que romaní estable en les mares no MC. Esta disminució de les concentracions d'IgA en la LM podria reduir la protecció de la mucosa del lactant, contribuint a la disbiosis i la resposta proinflamatòria, ambdós factors podrien eventualment afavorir la pèrdua de tolerància al gluten. En quant a la detecció de pèptids de gluten en LM, l'alta variabilitat en els resultats obtinguts en les anàlisis, indica de presència d'interferents en les mostres de LM que estarien alterant la quantificació dels mateixos, per la qual cosa es necessita més investigació sobre este tema, estudiant els components que estan interferint en l'anàlisi. Finalment, confirmem que els depòsits intestinals d'anti-TG2 són un esdeveniment precoç en el desenvolupament de la resposta immunològica responsable de la MC, podent precedir a l'aparició d'anticossos anti-TG2, inclús en lactants xicotets.

## **ABSTRACT**

Different genetic and environmental factors influence the development of celiac disease (CD). Clinical evidence shows that prolonged breastfeeding has been associated with a decreasing incidence of CD in children. Based on the hypothesis that gluten peptides and / or anti-gliadin antibodies (AGA) present in breast milk (BM) could help prevent or modulate the development of CD, our aim is to study the presence of AGA and gliadin peptides in BM from a group of CD mothers who follow a gluten-free diet (GFD) and from a group of non-coeliac mothers on a normal diet (ND), and to compare the levels of antibodies and gliadin peptides from both groups of mothers, with the ultimate goal of establishing a potential relationship with the development of CD in their offspring. The secondary objective is to analyse the early immune response in children who received BM and with a diagnosis of CD, deepening into the serology, histology, as well as the appearance of intestinal deposits of anti-tissue transglutaminase (anti-TG2) antibodies. After developing a method to detect AGA in BM, we found AGA present both in BM of CD mothers on a longstanding GFD, and in mothers who follow a ND, so that gluten exclusion would not be a key factor that influences the presence of AGA in BM. A marked tendency towards a gradual decrease in the total IgA content in the BM of CD mothers was found over the months, while it remained stable in non-CD mothers. This decrease in IgA concentrations in the BM could reduce the protection at the intestinal mucosal level by contributing to dysbiosis and to a proinflammatory response; both factors could eventually favour losing tolerance to gluten. Regarding the detection of gluten peptides in BM, the high variability in the results obtained in the analyses, indicates the presence of interferences in BM samples that would be altering the quantification of the same, reason why more research is needed on this topic, studying the components that are interfering in the analysis. Finally, we confirmed that intestinal anti-TG2 deposits are an early event in the CD development preceding serum anti-TG2 antibodies detection, even in very young infants.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Iceberg de la enfermedad celiaca. EC: enfermedad celiaca.

**Figura 2.** Esquema de la etiopatogenia de la enfermedad celiaca.

**Figura 3.** Esquema de la composición de los cereales de la familia *Triticeae*.

**Figura 4.** Esquema de la inmunopatogenia de la EC (Imagen adaptada de Sollid & Lundin, 2009).

**Figura 5.** Círculo enteromamario.

**Figura 6.** Absorbancia relativa de diferentes tipos de bloqueos para los ensayos AAG-IgA.

**Figura 7.** Absorbancia de tres muestras diferentes de suero de LM (s1, s2 y s3) con incremento de las concentraciones de anti-IgA humana para el ensayo AAG-IgA.

**Figura 8.** Absorbancia de tres muestras de suero de LM (s1, s4 y s5) con incremento de las concentraciones de anti-Secretory Component (IgA) antibody concentrations en el ensayo S-AAG.

**Figura 9.** Absorbancia de muestra de suero de LM incubada con diferentes concentraciones de gliadina, y después analizada para AAG-IgA and S-AAG.

**Figura 10.** Gráfico de efectos (Effects plot) del modelo de regresión lineal mixto que muestra la evolución de IgA total en LM en el tiempo, de madres con DN (izquierda) y DSG (derecha) durante los primeros 6 meses de lactancia. Las áreas sombreadas representan intervalos de confianza del 95% para la tendencia lineal.

**Figura 11.** Diagrama de efectos del modelo de regresión lineal mixto que muestra la evolución de AAG-IgA en LM en el tiempo, en madres con DN (izquierda) y DSG (derecha) durante los primeros 6 meses de lactancia. Las áreas sombreadas representan intervalos de confianza del 95% para la tendencia lineal.

**Figura 12.** Variabilidad de la concentración de AAG-IgA en LM en muestras de madres con DSG (n=112) y DN (n=106). Cada caja representa datos de una madre. Las líneas discontinuas representan el primer cuartil, la mediana y el tercer cuartil (todas las muestras del estudio).

**Figura 13.** Diagrama de dispersión que muestra la asociación entre los valores AAG-IgA e IgA Total. Se ha agregado una tendencia lineal estimada con modelado lineal al gráfico.

**Figura 14.** Diagrama de cajas que muestra los niveles de IgA total (g/l) en la LM de madres de niños que desarrollaron o no EC. El de P-valor se calculó usando un modelo mixto lineal con IgA total como variable de respuesta y desarrollo de EC como predictor.

**Figura 15.** Diagrama de cajas que muestra los niveles de AAG-IgA (UA) en la LM de madres de niños que desarrollaron o no EC. El P-valor se calculó usando un modelo lineal mixto con AAG-IgA como variable de respuesta y desarrollo de EC como predictor.

**Figura 16.** Análisis de gluten en muestras de leche humana (A y B) mediante R5 Western blot. A=67 ng/ml, B=22 ng/ml, Gli=5ng de gliadinas, A+Gli=muestra A+5 ng de gliadinas,  $\emptyset$ =carril vacío.

**Figura 17.** Sección de mucosa intestinal con ausencia de depósitos anti-TG2 IgA. (A) Corte bajo luz de longitud de onda de 495nm para la detección de IgA. (B) Corte bajo luz de longitud de onda de 552 nm para la detección de la TG2. (C) Colocalización entre ambas imágenes.

**Figura 18.** Sección de mucosa intestinal en la que se observan depósitos anti-TG2 IgA con tinción débil y distribución parcheada. (A) Corte bajo luz de longitud de onda de 495 nm para la detección de IgA. (B) Corte bajo luz de longitud de onda de 552 nm para la detección de la TG2. (C). Colocalización entre ambas imágenes, se observan depósitos de anti-TG2 en amarillo, por debajo de la membrana basal del epitelio vellositario, alrededor de las criptas y los vasos. (20x).

**Figura 19.** Sección de mucosa intestinal en la que se observan depósitos anti-TG2 IgA positivos. (A) Corte bajo luz de longitud de onda de 495 nm para la detección de IgA anti-TG2. (B) Corte bajo luz de longitud de onda de 552 nm para la detección de la

TG2. (C). Colocalización entre ambas imágenes, se observan, depósitos de anti-TG2 en amarillo, por debajo de la membrana basal del epitelio vellositario, alrededor de las criptas y los vasos. (20x).

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Situaciones en las que investigar la EC según las guías diagnósticas de la ESPGHAN 2012.

**Tabla 2.** Sensibilidad, especificidad, Likelihood ratios y Odds ratio diagnóstico para AAE, anti-TG2, AAG y anti-PDG en niños.

**Tabla 3:** Clasificación de Marsh-Oberhuber.

**Tabla 4.** Cronograma de intervenciones, determinaciones y recogida de muestras realizadas en los niños de cohorte del PreventCD.

**Tabla 5:** Edad y resultados (UA) de AAG de 2 grupos de mujeres.

**Tabla 6:** Características de 83 madres con y sin enfermedad celíaca (EC) de Valencia, Reus, Madrid, Nápoles y Leiden. Los p-valores se han obtenido a partir de los modelos mixtos lineales ajustados para evaluar las diferencias entre madres EC y no EC.

**Tabla 7.** Niveles de gliadinas obtenidos mediante análisis por ELISA-R5 sándwich y competitivo en 30 muestras de LM de madres con DN. Los valores corresponden a la media de las diluciones 1:8 y 1:16 de la muestra y se expresan como ng/ml de gliadinas.

**Tabla 8.** Análisis de una muestra de LM sin enriquecer y enriquecida con 140 ng/ml de gliadinas por ELISA-R5 competitivo y sándwich. Concentración de gliadina [ng/ml].

**Tabla 9.** Niveles de gliadinas (media±DS ng/ml), obtenidos mediante análisis por ELISA-R5 competitivo y sándwich en muestras de LM: entera/ fracción de suero y enriquecida/no enriquecida con 160 ng/ml de gliadinas, de madres celíacas y no celíacas.

**Tabla 10.** Niveles de gliadinas obtenidos mediante análisis por Gluten-Tec® ELISA en muestras de LM con y sin adición de gliadinas (ng/ml).

**Tabla 11.** Características clínicas y de laboratorio de los 9 niños EC.

## **SIMBOLOS, ABREVIATURAS Y SIGLAS**

AAE: Anticuerpos Antiendomiso.

AAG: Anticuerpos antigliadina.

Anti-PDG: Anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina.

Anti-TG2: Anticuerpos antitransglutaminasa tipo 2.

ATG2: Anticuerpos antitransglutaminasa tipo 2

BI: Biopsia intestinal.

DN: Dieta normal.

DSG: Dieta sin gluten.

EC: Enfermedad Celiaca.

ESPGHAN: European Society for Paediatric, Gastroenterology, Hepatology and Nutrition.

GWAS: Genome Wide Association Studies.

HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos.

HMW-GS: Gluteninas de alto peso molecular.

IC: Intervalo de confianza.

IgA: Inmunoglobulina A.

IgG: Inmunoglobulina G.

LIE: Linfocitos Intraepiteliales.

LM: Leche materna.

LMW-GS: Gluteninas de bajo peso molecular.

ND: Datos no disponibles.

ppm: Partes por millón.

MHC: Complejo principal de histocompatibilidad.

SD: Desviación estándar.

sIgA: IgA secretora.

SNPs: Polimorfismos de un único nucleótido.

TGt: Transglutaminasa Tisular.

VR: Valor de referencia.



## ÍNDICE

1	Introducción .....	22
1.1	Definición de Enfermedad Celíaca.....	22
1.2	Epidemiología de la enfermedad celíaca .....	22
1.3	Teorías etiopatogénicas.....	24
1.3.1	Factores ambientales .....	24
1.3.2	Factores genéticos .....	31
1.3.3	Factores inmunológicos.....	34
1.4	Diagnóstico.....	37
1.4.1	Manifestaciones clínicas .....	38
1.4.2	HLA .....	39
1.4.3	Marcadores serológicos.....	40
1.4.4	Biopsia intestinal: histología.....	42
1.4.5	Biopsia intestinal: depósitos de anticuerpos anti transglutaminasa tisular .....	45
1.5	Tratamiento .....	48
2	Hipótesis y objetivos .....	52
2.1	Hipótesis.....	52
2.2	Objetivos .....	54
3	Estudio de anticuerpos anti-gliadina en leche materna .....	58
3.1	Antecedentes y justificación.....	58
3.2	Sujetos .....	60
3.2.1	Población general.....	60
3.2.2	Cohorte Prevent CD .....	61
3.3	Material.....	64
3.3.1	Muestras de leche materna .....	64
3.3.2	Registro dietético.....	65
3.3.3	Base de datos ProMISe.....	65

3.4	Metodología.....	66
3.4.1	Desarrollo del método para la determinación de anticuerpos anti gliadina en leche materna.....	66
3.4.2	Método de análisis de anticuerpos anti-gliadina en muestras de leche materna.....	70
3.4.3	Cuantificación de inmunoglobulina de clase A en leche materna.....	71
3.4.4	Análisis estadístico.....	71
3.5	Resultados y discusión.....	71
3.5.1	Método desarrollado para el análisis de anticuerpos anti-gliadina en leche materna.....	71
3.5.2	Determinación de inmunoglobulinas de clase A y anticuerpos anti-gliadina en leche materna.....	76
3.5.3	Discusión.....	83
4	Estudio de la presencia de gluten en leche materna.....	88
4.1	Antecedentes y justificación.....	88
4.2	Sujetos.....	89
4.2.1	Población general.....	89
4.2.2	Subpoblación de madres de niños de la cohorte de PreventCD.....	89
4.3	Material.....	90
4.3.1	Muestras de leche materna.....	90
4.3.2	Registro dietético.....	90
4.3.3	Base de datos ProMISe.....	90
4.4	Metodología.....	90
4.4.1	ELISA-R5 competitivo y sándwich.....	90
4.4.2	Gluten-Tec® ELISA.....	92
4.4.3	R5 western blot.....	92
4.4.4	Técnicas proteómicas.....	93
4.5	Resultados y discusión.....	95
4.5.1	ELISA R5 sándwich y competitivo.....	95

4.5.2	Gluten-Tec® ELISA .....	99
4.5.3	Western Blot R5 .....	100
4.5.4	Técnicas proteómicas.....	101
4.5.5	Discusión.....	102
5	Estudio serológico e inmunológico en niños con un diagnóstico precoz de EC..	106
5.1	Antecedentes y justificación.....	106
5.2	Sujetos .....	106
5.3	Material.....	106
5.3.1	Muestras de sangre.....	106
5.3.2	Biopsias intestinales .....	107
5.3.3	Base de datos ProMISe.....	107
5.4	Metodología.....	107
5.4.1	Tipaje HLA.....	107
5.4.2	Anticuerpos anti-TG2 y anticuerpos AAG séricos .....	107
5.4.3	Evaluación histológica de la biopsia .....	108
5.4.4	Depósitos intestinales de anti-TG2 .....	108
5.5	Resultados y discusión .....	110
5.5.1	Características de la muestra .....	110
5.5.2	Evaluación de resultados histológicos y de determinación de depósitos TG2-IgA en las biopsias intestinales.....	111
5.5.3	Discusión.....	113
6	Conclusiones .....	116
7	Bibliografía.....	118
8	Anexos .....	138



# *1. INTRODUCCIÓN*

---

# **1 Introducción**

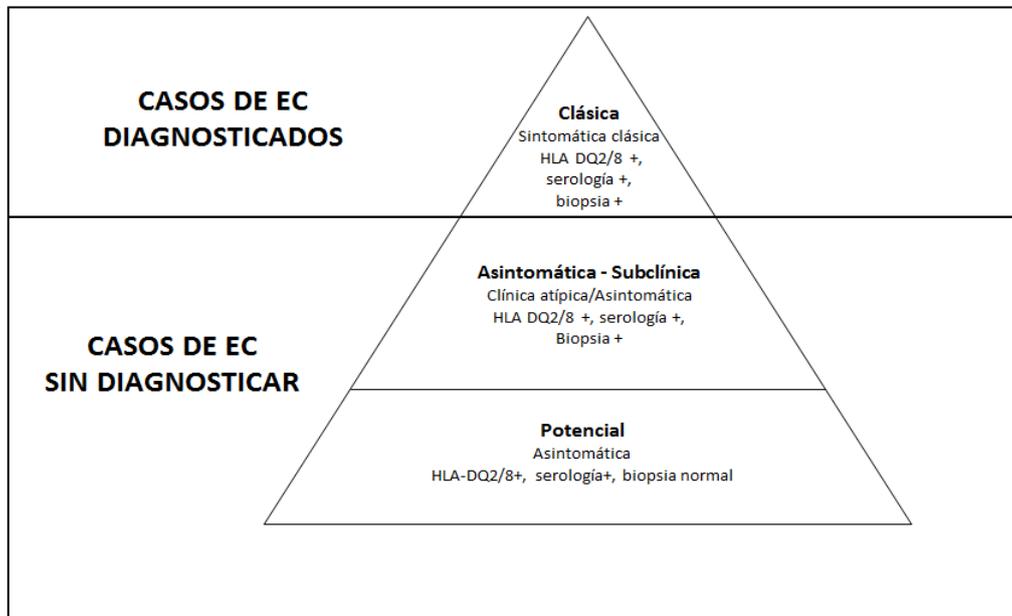
## **1.1 Definición de Enfermedad Celíaca**

La enfermedad celiaca (EC) es una alteración sistémica de carácter autoinmune desencadenada por el consumo de gluten y prolaminas relacionadas, en individuos genéticamente susceptibles. Se caracteriza por la presencia de una combinación variable de manifestaciones clínicas dependientes del gluten, anticuerpos específicos de EC, haplotipos HLA DQ2 y/o DQ8 y enteropatía (Husby et al., 2012). Los anticuerpos específicos son los anticuerpos antitransglutaminasa tisular (anti-TG2), los anticuerpos antiendomiso (AAE) y los anticuerpos frente a péptidos deamidados de gliadina (anti-PDG). Una dieta estricta sin gluten (procedente de cebada, centeno y trigo), conduce a la desaparición de los síntomas clínicos, negativización de los anticuerpos y normalización de la mucosa intestinal. Aunque se ha puesto en entredicho la toxicidad de la avena, actualmente no se dispone de estudios concluyentes sobre su efecto a largo plazo (Comino et al., 2015; La Vieille et al., 2016).

## **1.2 Epidemiología de la enfermedad celíaca**

Hasta hace unos años la EC era considerada una enfermedad poco frecuente, que se manifestaba con un cuadro de malabsorción intestinal y que afectaba, fundamentalmente, a niños de origen caucásico. La información disponible sobre la epidemiología se ha modificado gracias al desarrollo de métodos serológicos sensibles y específicos, al conocimiento de distintas formas clínicas extradigestivas de presentación de la EC y al estudio de procesos o grupos de riesgo. Actualmente, la EC se considera una enfermedad frecuente de distribución mundial, que afecta a niños y adultos, tanto con manifestación clínica digestiva clásica como con formas subclínicas de presentación, pudiendo incluso cursar sin síntomas aparentes (forma asintomática) (Riestra Menéndez, 2011). Esta situación fue representada mediante la imagen del iceberg (Figura 1) (Logan, 1992; Catassi et al., 1994), donde el iceberg completo representa la prevalencia real de la EC. La parte visible correspondería a los casos diagnosticados que cursan con sintomatología digestiva clásica, marcadores serológicos positivos y atrofia vellositaria. Sin embargo, por cada caso diagnosticado, se estima que existen un promedio de 5-10 casos sin diagnosticar, que cursan de forma subclínica, siendo este porcentaje la parte sumergida del iceberg (Fasano & Catassi, 2012). La proporción de casos diagnosticados, dependerá fundamentalmente, del conocimiento de la enfermedad por parte de los profesionales, así como de la

posibilidad de solicitar diversas pruebas diagnósticas como marcadores serológicos y biopsia duodenal (Gujarl et al., 2012).



**Figura 1.** Iceberg de la enfermedad celiaca. EC: Enfermedad Celiaca. (Basada en Fasano & Catassi, 2012)

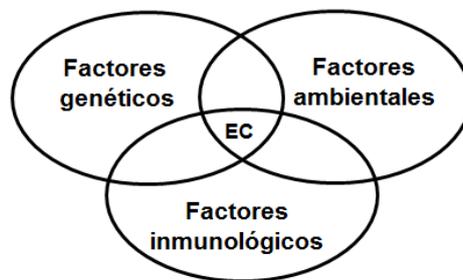
Los datos de prevalencia más antiguos, estaban basados solo en los casos diagnosticados con sintomatología clásica, con cifras de prevalencia muy bajas (1:3.333) y con una gran variabilidad en distintos países de Europa (1:1000 a 1:4.500) (Catassi et al, 2014). Actualmente, gracias a estudios de cribado llevados a cabo en población sana asintomática, se estima que la prevalencia de EC es de 1:100, tanto en niños como en adultos, con una variabilidad de 0.5-1.26% (Catassi et al., 2015; Dubé et al., 2005).

Respecto a la distribución geográfica, existen variaciones importantes en la prevalencia de la EC en diferentes países. En España, estudios epidemiológicos realizados en Madrid, Asturias y País Vasco, reflejan una frecuencia de la EC de entre 1:118 y 1:220 en población pediátrica y 1:389 en población adulta (Castaño et al., 2004; Pascual et al., 2002; Riestra et al, 2000). En Alemania, la prevalencia se estima solo en un 1:518, mientras que en Finlandia y Suecia se ha comprobado que afecta a más del 2% de la población (Mustalahti et al., 2010; Myleus et al., 2009; Olsson et al, 2009). En el continente americano la prevalencia es entorno al 1% de la población,

muy similar a la de Europa (Fassano et al., 2003). Además, cabe destacar los datos de prevalencia de EC en la población saharauí, estimándose en aproximadamente un 5%, siendo el 40% de la población portadora del HLA DQ2 (Catassi et al., 2014). Estas diferencias pueden ser explicadas tanto por los distintos factores ambientales: infecciones gastrointestinales, momento de inicio de consumo de gluten; así como por la frecuencia poblacional del haplotipo HLA-DQ2/DQ8 (Fassano & Catassi, 2001; Kondrashova et al, 2008).

### **1.3 Teorías etiopatogénicas**

La etiopatogenia de la EC no ha sido claramente establecida, sin embargo, es conocido que se trata de una enfermedad multifactorial, en la que intervienen factores genéticos, inmunológicos y ambientales (Figura 2).



**Figura 2.** Esquema de la etiopatogenia de la enfermedad celiaca.

#### ***1.3.1 Factores ambientales***

Aunque otros factores ambientales podrían influir en el desarrollo de EC, la ingestión de gluten constituye el factor desencadenante fundamental para que se inicie la respuesta inmunitaria, en sujetos genéticamente susceptibles.

##### ***1.3.1.1 Gluten***

El gluten constituye un conjunto de proteínas del endospermo de los cereales de la familia *Triticeae* (trigo, la cebada y centeno), con propiedades aglutinantes, y que proporcionan efectos deseables desde el punto de vista tecnológico (Figura 3). El gluten se puede clasificar en dos grupos: prolaminas, solubles en etanol, y con alto contenido en los aminoácidos prolina y glutamina, y las gluteninas, insolubles en etanol. La estructura primaria particular de las proteínas que constituyen el gluten, impide la digestión total del gluten por el ser humano. Esto implica que el producto final de dicha digestión sea una mezcla de péptidos, por lo que, en condiciones fisiológicas normales, las células epiteliales son casi

impermeables a este tipo de moléculas y no permiten su absorción. Sin embargo, en la EC la permeabilidad intestinal y la integridad de las uniones estrechas de las células están alteradas, lo que permite el paso de estos péptidos citotóxicos, desencadenando la respuesta inmunitaria. Se sabe que la EC está causada principalmente por la intolerancia a las prolaminas, aunque también se han encontrado fracciones tóxicas en las gluteninas.

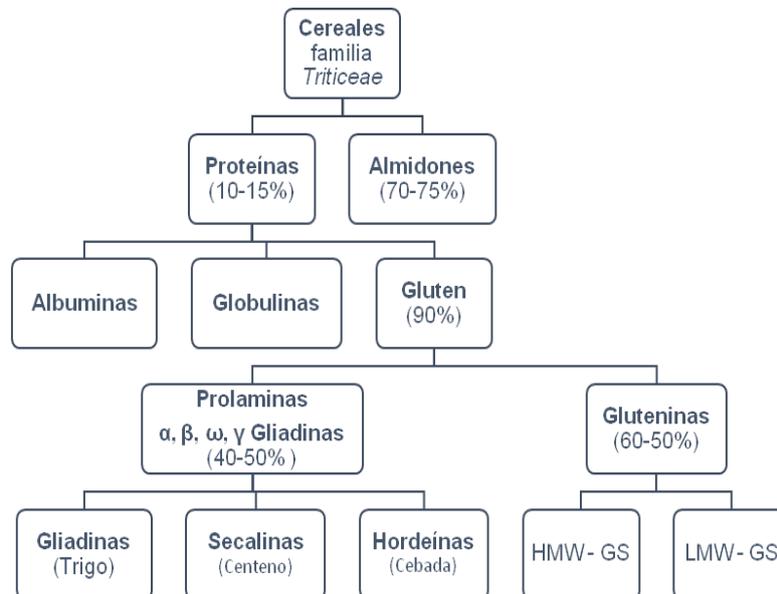


Figura 3. Esquema de la composición de los cereales de la familia *Triticeae*.

Las gliadinas son las prolaminas del trigo, así como las secalinas lo son del centeno y las hordeínas de la cebada (Shewry & Halford, 2002; Wieser, 2007). Las gliadinas son proteínas monoméricas, se clasifican según su movilidad electroforética en geles de poliacrilamida a pH ácido, en 4 grupos:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\omega$ - gliadinas. Las gluteninas son proteínas poliméricas, se clasifican según su peso molecular: gluteninas de alto peso molecular (HMW-GS) y gluteninas de bajo peso molecular (LMW-GS) (Belton, 2005; Shewry et al., 2003; Shewry & Halford, 2002). Desde un punto de vista patogénico, las prolaminas contienen dos tipos de péptidos: **tóxicos**, que inducen daño intestinal en cultivos in vitro con biopsias duodenales (Howdle et al., 1981) e **inmunogénicos**, que estimulan líneas celulares T (DQ2/DQ8) del intestino o sangre periférica de pacientes EC (Anderson et al., 2000; Maiuri et al., 2003). Se ha podido predecir la existencia de 50 péptidos inmunogénicos, entre los que se encuentra el péptido 33-mer, cuya secuencia de 33 aminoácidos es muy resistente a la proteólisis enzimática gástrica, pancreática e intestinal y contiene 6 epítomos de reconocimiento de las células T (Shan et al., 2002).

### **Cantidad de gluten**

La dosis de antígeno alimentario ingerido en las primeras etapas de vida, así como la edad del primer contacto, es un factor a tener en cuenta, ya que podría influir en el desarrollo de la tolerancia oral (Troncone et al., 2008). En diferentes estudios, se había observado que la ingesta de grandes cantidades de gluten durante los primeros años de vida, aumentaba el riesgo de desarrollar EC (Ascher et al., 1997; Mitt & Uibo, 1998). Además, durante la epidemia sueca hubo más casos de EC en niños que habían consumido grandes cantidades de harinas con gluten (38 g/día), que en niños que habían ingerido cantidades menores (24 g/día) (Ivarsson et al., 2000; Ivarsson et al., 2002; Myleus et al., 2009). Todo ello, sugería la existencia de un modelo cuantitativo en relación a la cantidad de gluten consumido en los primeros años de vida y el desarrollo posterior de EC. Más recientemente, se han publicado 2 estudios prospectivos sobre el tema, el primero, en la cohorte sueca de riesgo genético del estudio TEDDY, en el que se concluye que los casos con que desarrollaron EC consumían mayores cantidades de gluten en la visita previa a la seroconversión de los anticuerpos (4.9 g), que los controles (3.9 g) (Aronsson et al., 2016). El segundo estudio, el PreventCD, mostró que la cantidad de gluten consumida durante los 3 primeros años de vida, no suponía un factor de riesgo asociado al desarrollo de EC hasta los 6 años, para la mayoría de haplotipos HLA, pero que sin embargo, el aumento brusco del consumo de gluten entre los 11 y 18 meses de edad, podría aumentar el riesgo de desarrollo de EC en sujetos HLA-DQ2.2/DQ7 (Crespo-Escobar et al., 2017).

#### ***1.3.1.2 Modo de lactancia***

Se ha especulado sobre el efecto protector de la lactancia materna en el desarrollo de EC. Se ha demostrado el efecto beneficioso global de la lactancia, pero además se ha investigado de manera más específica en factores concretos como el efecto de la duración de la lactancia y de la introducción del gluten en la dieta del lactante coincidiendo con la misma. Estudios retrospectivos sugerían que la lactancia materna confería cierta protección en el desarrollo de la EC, sin embargo, se desconocía si esta protección se prolongaba de por vida, o simplemente retrasaba la aparición de los síntomas, y por tanto su diagnóstico.

Aunque no se conoce los mecanismos implicados en el eventual efecto protector, se ha sugerido que la leche materna (LM) podría modular el proceso de exposición del lactante a la microbiota intestinal, y por otra parte, podría prevenir la inflamación del

intestino, así como reducir el paso de péptidos de gluten tóxicos al interior de la mucosa intestinal (Hanson & Korotkova, 2002; Hanson et al. 2002).

Este efecto protector de la LM podría ser debido a 3 factores diferentes o incluso a la combinación de ellos:

- El efecto inmunoprotector que confiere la LM, gracias a componentes de la misma: las lisozimas, lactoferrina, IgA específica o inespecífica. La IgA secretora (sIgA) tiene diversas propiedades biológicas, como la exclusión inmunológica, la inmunomodulación y el mantenimiento de la integridad de las barreras de la mucosa. Además, proporciona la primera línea de defensa contra los patógenos invasores al dirigirse a los antígenos microbianos en el entorno de la mucosa.
- El efecto inmunomodulador de la LM en el sistema inmunitario del tracto digestivo del lactante, estimulando la maduración del sistema inmunitario.
- La posible inducción de tolerancia debida al paso de péptidos de gluten digeridos a través de la LM.

### **Edad de introducción del gluten y lactancia materna.**

La edad de introducción de gluten en lactantes de riesgo y la lactancia materna, han sido considerados como factores ambientales clave en el desarrollo de la EC. La evidencia epidemiológica fue observada en estudios retrospectivos observacionales, basados en la llamada “Epidemia Sueca” (Ivarsson et al., 2000). Entre los años 1984 y 1996, se detectó en Suecia un aumento, considerado epidémico, de casos de EC en niños menores de 2 años. Esta incidencia 4 veces superior a la esperada fue atribuida principalmente a los cambios en edad de introducción del gluten, el aumento del consumo de gluten durante los primeros años de vida y a la disminución de la duración de la lactancia materna (Akobeng et al., 2006; Ivarsson et al., 2000; Ivarsson et al., 2002). En un estudio posterior, realizado en 1.560 pacientes con riesgo genético de desarrollar EC (diabéticos y familiares de primer grado de pacientes con EC), se observó un mayor riesgo de desarrollar EC cuando se introducía el gluten antes de los 3 meses o después de los 7 meses de edad (Norris et al., 2005).

Tras estos dos estudios, se planteó la hipótesis de que la introducción de gluten entre los 4 y 6 meses de edad podría inducir tolerancia oral en pacientes de riesgo. (Akobeng et al., 2006). En una revisión sistemática de diferentes estudios observacionales, se afirmaba que la introducción del gluten en la dieta del lactante mientras estos recibían lactancia materna, reducía significativamente el desarrollo de

EC, en comparación con los que recibían lactancia artificial. Así mismo, mostraba una asociación entre una duración más prolongada de la lactancia materna con un riesgo menor de EC. (Akobeng et al., 2006). Así, en 2008, en las recomendaciones del Comité de Nutrición de la ESPGHAN, se consideró prudente evitar la introducción del gluten antes de los 4 meses, y después de los 6 meses de edad. También se recomendaba su introducción en pequeñas cantidades de gluten y de manera progresiva, preferiblemente coincidiendo con la lactancia materna (Agostoni et al., 2008).

Posteriormente, se realizaron una serie de estudios prospectivos diseñados para comprobar la hipótesis anterior: como el CELIPREV (Risk of Celiac Disease and Age at Gluten Introduction), concluyendo que ni la introducción tardía de gluten ni la LM modificaron el riesgo de EC niños de riesgo, y que la introducción tardía se asoció a un desarrollo más tardío de la EC, independientemente de la duración de la lactancia materna (Lionetti et al., 2014). Por otra parte, en el análisis realizado cuando la cohorte de niños del estudio europeo PreventCD alcanzó 3 años de edad, la incidencia de EC fue similar entre los que recibieron gluten entre los 4 y 6 meses de edad (5.9%) y los que recibieron placebo (4.5%). No se encontraron diferencias entre los niños que recibieron lactancia materna exclusiva hasta 6 meses o más, los que recibieron lactancia mixta y los que no recibieron lactancia materna. Por otra parte, el diagnóstico de EC fue significativamente más frecuente en el grupo de niños homocigotos para HLA DQ2, así como también en niñas (Vriezinga et al., 2014). Un meta análisis publicado recientemente, que incluye estudios observacionales prospectivos, no encontró evidencia de un efecto protector de la lactancia materna en el desarrollo de EC durante la infancia en lactantes con riesgo genético (Szajewska et al., 2015).

Estas recientes publicaciones motivaron unas nuevas recomendaciones en las que se expone que no existe evidencia suficiente para establecer una edad adecuada de introducción del gluten para prevenir EC, por lo que se considera que su introducción puede realizarse en cualquier momento entre los 4 y los 12 meses; se desaconseja realizarla antes de los 4 meses de edad. Se indica también que la lactancia materna, su duración, y la introducción del gluten durante la misma, no ejercerían un papel protector en el desarrollo de EC recomendándose, no obstante, encarecidamente la lactancia materna por sus múltiples y evidentes beneficios (Ribes Koninckx et al., 2015; Szajewska et al., 2016).

1.3.1.3 *Microbiota*

La colonización inicial del tracto gastrointestinal forma la base para el desarrollo de la microbiota (en edades posteriores de la vida) y de la respuesta inmune, por tanto, factores que influyen en este desarrollo durante los primeros años de vida, pueden causar trastornos en la microbiota, dando lugar a una disbiosis duradera. Entre ellos, la slgA parece que tiene un papel en el establecimiento y mantenimiento de la homeostasis con la microbiota comensal (Cong et al., 2009). Se ha sugerido que el recubrimiento de bacterias comensales por slgA puede representar un mecanismo por el cual se realiza esta discriminación entre la microbiota normal abundante y los patógenos raros. La producción alterada de slgA se ha considerado un factor de riesgo para el desarrollo de trastornos gastrointestinales como la EC (Wang et al., 2014). La transferencia de slgA materna al lactante promueve el establecimiento de un sistema inmune regulador y apoya la relación mutualista con la microbiota comensal (Rogier et al., 2014).

Se ha asociado una alta frecuencia de episodios infecciosos, así como tratamientos con antibióticos (ambos relacionados con afectación de la microbiota intestinal) con la aparición de la EC en niños genéticamente susceptibles (Mårild et al., 2013; Mårild et al., 2015). Diferentes estudios demuestran que pacientes con EC activa presentan una microbiota distinta a la de individuos sanos, y que ésta se restaura pero solo parcialmente después de iniciar la dieta sin gluten (DSG), aumentando las cepas de bacterias beneficiosas y disminuyendo las cepas patógenas (Nadal et al., 2007; Sanchez et al., 2012; Sapone et al., 2011). Concretamente, se han detectado en niños y adultos con EC activa cambios en la abundancia de *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Sánchez et al., 2013; Wacklin et al., 2013). Otros estudios muestran una disminución de bacterias protectoras y antiinflamatorias como el *Bifidobacterium*, y un aumento de bacterias gram negativas tales como *Bacteroides* y *E. coli*, en pacientes con EC activa (Collado et al., 2009; Di Cagno et al., 2011). También se ha observado el incremento de *Staphylococcus* (Collado et al., 2009; Di Cagno et al., 2011) y *Clostridium* (Collado et al., 2009; De Palma et al., 2010) y la disminución de *Lactobacillus spp.* (Di Cagno et al., 2011; Nadal et al., 2007; Sant et al., 2007) en niños con EC.

En otras investigaciones se observa que la composición microbiana del intestino de pacientes con EC está asociada con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Así en los pacientes con síntomas gastrointestinales predominan las Proteobacterias, mientras que en pacientes con dermatitis herpetiforme predomina *Firmicutes*. También se detectaron aumentos en el número de Proteobacterias en pacientes con EC con

síntomas persistentes, a pesar de tener una histología normal y seguir una DSG (Wacklin et al., 2010).

Otros estudios han confirmado que el haplotipo HLA-DQ, influye en la composición de la microbiota (Olivares et al., 2014; Palma et al., 2010). Niños con el genotipo de mayor riesgo asociado a la EC (HLA-DQ2) muestran un incremento en la proporción de *Firmicutes* y *Proteobacterias* y una reducción de *Actinobacterias* (incluyendo *Bifidobacterium*) (Olivares et al., 2014).

Así, si bien la mayoría de estos estudios demuestran que existen diferencias en la composición de la microbiota en pacientes con EC, sin embargo, falta consenso entre los estudios con respecto a los cambios específicos en la microbiota de estos pacientes. La inconsistencia de los hallazgos podría deberse, a diferencias en la edad de la población estudiada (adultos o niños), en la metodología aplicada, en las técnicas de muestreo (biopsia, muestra fecal), así como en duración de la DSG y la en la presentación clínica de la enfermedad (Verdu et al., 2015). Estas diferencias dificultan, por otro lado, la comparación entre los estudios y el determinar si la microbiota intestinal contribuye al desarrollo o a la progresión de la EC, o si es simplemente consecuencia de la enfermedad (Cenit et al., 2015).

### ***1.3.1.4 Tipo de parto***

Estudios epidemiológicos han dejado entrever que el tipo de parto (vaginal o cesárea) podría influir en el riesgo de desarrollo de EC. En ciertos estudios (Decker et al., 2010; Marild et al., 2012) la cesárea, especialmente si ha sido programada, está asociada a un aumento moderado del posterior desarrollo de EC. Esto podría ser debido a la alteración de la exposición a bacterias comensales en el período perinatal inmediato.

Sin embargo, según los últimos estudios prospectivos, parece que no habría relación entre el tipo de parto y la incidencia de EC (Emilsson et al., 2015; Lionetti et al., 2014; Stordal et al., 2013; Vriezinga et al., 2014).

### ***1.3.1.5 Infecciones***

Se han observado variaciones estacionales respecto a la aparición de EC, en las que parecía que niños nacidos en verano podrían tener mayor riesgo de desarrollar la misma. Estas variaciones, podrían ser atribuibles a que la retirada de la lactancia materna se suele dar en invierno, coincidiendo así con un aumento en la frecuencia de infecciones (Ivarsson et al., 2003).

En el año 2002 se publicó un estudio en el que las infecciones tempranas se asocian con un mayor riesgo de EC, en concreto, el hecho de tener tres o más episodios

infecciosos informados por los padres (independientemente del tipo de infección), durante los primeros seis meses de vida se asoció con un riesgo posterior significativamente mayor de EC. Posteriormente Auricchio et al, describen que las infecciones respiratorias durante los primeros 2 años de vida, incrementan el riesgo de EC (Auricchio et al., 2018).

Hay estudios en los que tanto adenovirus, enterovirus, virus de la hepatitis C y rotavirus parecen estar implicados como desencadenantes de EC (Plot & Amital, 2009; Stene et al., 2006). Otros estudios más recientes implican a algunos reovirus en el desarrollo de EC (T1L y T3D). Recientemente, Bouziat et al., han estudiado como estos reovirus regulaban la respuesta contra antígenos de la dieta e inducían una pérdida de tolerancia oral, lo que se asociaba con su capacidad para alterar la homeostasis inmune (Bouziat et al., 2017). Los investigadores, administraron las dos cepas a ratones sanos: la cepa T1L, que actúa a nivel de intestino delgado y altera la funcionalidad del sistema inmune, y la cepa T3D, que actúa fuera del tracto gastrointestinal. Observaron diferencias notables entre las dos cepas, mientras que la cepa T3D no tuvo ningún efecto nocivo, la cepa T1L desencadenó una respuesta inflamatoria inmune mucho más agresiva en presencia del gluten, y a su vez, inducía una sobreexpresión del gen IRF1, implicado en la pérdida de la tolerancia al gluten. El papel de los reovirus en la inmunopatogenia de la EC descrita hasta ahora parece explicar que éstos alteran la homeostasis de la respuesta inmune en el individuo, provocando una reducción de la tolerancia oral respecto a antígenos de la dieta que llevan a una respuesta proinflamatoria TH1, propia de la EC. Las infecciones gastrointestinales causadas por virus parecen dejar “huella” en los pacientes que junto con la predisposición genética y otros factores (duración del período de lactancia materna, vacunación, tiempo desde la última infección...) podrían provocar el desarrollo de la EC.

### ***1.3.2 Factores genéticos***

Se necesita al menos un factor ambiental, el gluten, para que se produzca la pérdida de tolerancia oral en la EC. El hecho de que este factor ambiental no resulte nocivo para la mayor parte de la población, indica que también la susceptibilidad de cada individuo es esencial para el desarrollo de la enfermedad. Esta susceptibilidad está sustentada en factores genéticos (Garrote & Bernardo, 2011). La alta heredabilidad de la EC, quedó demostrada en los estudios realizados entre gemelos monozigóticos (Greco et al., 2002), con una tasa de concordancia entre ellos del 80%, mientras que

en gemelos dizigóticos fue del 20%. Por otra parte, la frecuencia con la que se daba la enfermedad en familiares de primer grado de un paciente con EC era mayor (10%) que en individuos no emparentados. (Singh et al., 2015). El patrón de herencia que sigue esta enfermedad es de tipo complejo (poligénico u oligogénico) aunque la implicación de la región HLA de clase II es incuestionable, calculándose que genes que se asientan en esta región confieren hasta un 40% del riesgo total (King & Ciclitira, 2000).

### ***1.3.2.1 Asociación con el sistema HLA***

El sistema HLA (antígeno leucocitario humano) está compuesto por los denominados genes de histocompatibilidad (complejo principal de histocompatibilidad, MHC) localizados en el cromosoma 6, en la región 6p21. Los genes del sistema HLA se agrupan en tres loci diferentes: los de clase I, II y III.

Los productos de los genes de clase I y II son glicoproteínas heterodiméricas de membrana que pertenecen estructuralmente a la familia de las inmunoglobulinas. Estas proteínas se expresan en la superficie de las células humanas nucleadas y su función principal es, por un lado, la presentación de antígenos peptídicos a los linfocitos T y por otro lado la modulación de la actividad de los linfocitos NK (Wolters & Wijmenga, 2008). El HLA de tipo I permite la presentación de antígenos propios de la célula; el de tipo II, cuya expresión está restringida a células presentadoras de antígenos, se encarga de la presentación de proteínas procedentes de la fagocitosis. Por el contrario, los genes que integran la región de la clase III no están implicados en estas actividades pues codifican moléculas del sistema del complemento y citocinas de la familia del factor de necrosis tumoral.

La susceptibilidad a la EC reside principalmente en el HLA-DQ, que es una molécula de clase II, formado por un heterodímero  $\alpha\beta$  codificado por los genes HLA-DQA1 y HLA-DQB1, respectivamente. Más del 90% de los pacientes, expresan el heterodímero HLA-DQ2 codificado por los alelos DQA1\*05:01 y DQB1\*02:01, que dan lugar al haplotipo DQ2.5; asociado, a su vez al gen DRB1\*03 (más común en el centro y norte de Europa). Pero este heterodímero también puede ser codificado por los alelos DQA1\*02:01 y DQB1\*02:02, dando lugar al haplotipo DQ2.2. Este haplotipo, a su vez, va asociado al gen DRB1\*07 (más común en la cuenca mediterránea). Cuando este gen se asocia en trans a la molécula DR5, codificado por DRB1\*11-DQB1\*03:01-DQA1\*05:05, da lugar al genotipo DQ2.2/DQ2.7 (común también en la cuenca mediterránea). Así pues, el heterodímero HLA-DQ2 tiene un papel importante en la

inmunopatogenia de la EC: son responsables de presentar el gluten modificado a los linfocitos T CD4+, provocando una respuesta inmunitaria específica.

Ser homocigoto para el haplotipo DQ2.5 (DQ2.5/DQ2.5) o en combinación con el haplotipo DQ2.2 (DQ2.5/DQ2.2), confiere un mayor riesgo de ser celiaco en comparación con los portadores de alguno de estos haplotipos en heterocigosis (DQ2.5/X y DQ2.2/X) (Dubois et al., 2010; Pisapia et al., 2016).

Aunque varía geográficamente, con tasas más altas en Oriente Medio y Sudamérica (Gonzalez-Galarza et al., 2011), entre el 5-10% de los pacientes celiacos son portadores del haplotipo HLA-DQ8, ligado al gen DRB1\*04. Está codificado por los alelos DQA1\*03:01 y DQB1\*03:02 que confiere un riesgo menor de desarrollo de EC frente a los otros dos haplotipos (Dieli-Crimi et al., 2015; Wolters & Wijmenga, 2008).

### *1.3.2.2 Otros genes no-HLA*

A pesar de que al HLA se le atribuye hasta el 40% de la heredabilidad de la EC, y es el factor de predisposición genética mejor caracterizado en la EC, su contribución a la herencia de la EC es moderada por lo que debe haber otros loci de susceptibilidad no ligados al HLA, cada uno de los cuales tendría un efecto pequeño sobre el riesgo global. Como consecuencia, se han llevado a cabo numerosos esfuerzos para localizar e identificar genes de susceptibilidad adicionales que puedan dilucidar la genética de la celiaquía.

Para ello, se han llevado a cabo estudios de ligamiento en familias y estudios de asociación. Estos estudios han dado lugar a la localización y definición de **regiones CELIAC**, definidas como aquellas regiones cromosómicas que se repiten y se heredan por los afectados de EC en varias generaciones de una familia y en las que se han encontrado cierta asociación con polimorfismos genéticos que actuarían como factores de riesgo y contribuirían al otro 60% de la carga genética, no asociada al HLA, que falta por determinar. Entre los genes no HLA identificados podemos encontrar las regiones: 1) CELIAC2: que contiene un grupo de genes implicados en la activación y diferenciación de linfocitos T y genes que codifican para algunas citoquinas que pueden ser importantes en la regulación del sistema inmunitario y la inflamación (Greco et al., 2001); 2) CELIAC3: se han encontrado genes reguladores de la respuesta linfocitaria, unos que producen la proliferación y activación de citoquinas (CD28 e ICOS) y otro gen que inhibe la respuesta del linfocito (CTLA-4) (Holopainen et al., 1999). 3) CELIAC4: que codifica variantes del gen de la miosina y de los genes de interleucinas 2 y 21. Se ha hipotetizado que las variaciones en este gen, por sus características y función, pueden suponer la disrupción de la barrera intestinal que

permitiría el paso de péptidos inmunogénicos, como los del gluten (Monsuur et al., 2005). Estas regiones han sido definidas mediante estudios de análisis pangénómicos de ligamientos sistemáticos (GWAS, *Genome Wide Association Studies*), y posteriormente mediante el proyecto Immuchip, diseñado para estudiar un gran número de polimorfismos relevantes. Gracias a ello, se identificaron varios genes asociados a la celiaquía, aunque no todas las asociaciones encontradas han sido confirmadas en estudios posteriores.

### ***1.3.3 Factores inmunológicos***

La predisposición genética y la exposición ambiental (ingestión de gluten) no son suficientes para causar EC o explicar totalmente cómo se produce la inflamación en el intestino. En sujetos con EC, la infiltración de linfocitos intraepiteliales (LIE), hiperplasia de criptas y atrofia vellositaria, supone la consecuencia de una serie de acontecimientos mediados por el sistema inmunitario que tienen lugar en la mucosa del intestino delgado. Es por ello que, la desregulación inmunitaria es el elemento clave en la patogenia de la EC (Guandalini, 2014).

En condiciones normales, existe una ausencia de respuesta inmune sistémica frente a proteínas alimentarias, la denominada tolerancia oral. Sin embargo, en la EC, existe una pérdida de tolerancia frente al gluten y prolaminas relacionadas. La capacidad inmunológica del tracto digestivo para distinguir entre antígenos alimentarios y microorganismos patógenos, podría explicarse porque estos proporcionan un estímulo persistente, asociado a otras señales de peligro o invaden tejidos linfoides alejados de la mucosa (Arranz et al., 2012). Hay varios mecanismos descritos como principales responsables de la tolerancia oral: la delección clonal, la anergia clonal y la inducción de los linfocitos T reguladores, que ejercen su función mediante la secreción de citocinas inmunosupresoras (Faria & Weiner, 2005; Mowat, 2003).

El modelo inmunopatogénico más aceptado establece que el gluten tiene un efecto doble mediado por la inmunidad innata (efecto tóxico del gluten sobre el epitelio) y la inmunidad adaptativa (a través de los linfocitos T CD4+ de la lámina propia o tejido subyacente) que genera un daño tisular caracterizado por el aumento de linfocitos en el epitelio y en la lámina propia intestinal, atrofia de las vellosidades del intestino, apoptosis de enterocitos e hiperplasia de las criptas con su consiguiente remodelación de la mucosa intestinal (Brandtzaeg, 2006).

Según este modelo, son necesarios una serie de eventos en la mucosa del intestino delgado: la presencia de péptidos del gluten, el efecto de alguno de éstos sobre el epitelio, la actividad del enzima transglutaminasa tisular (TG2), la presencia de células

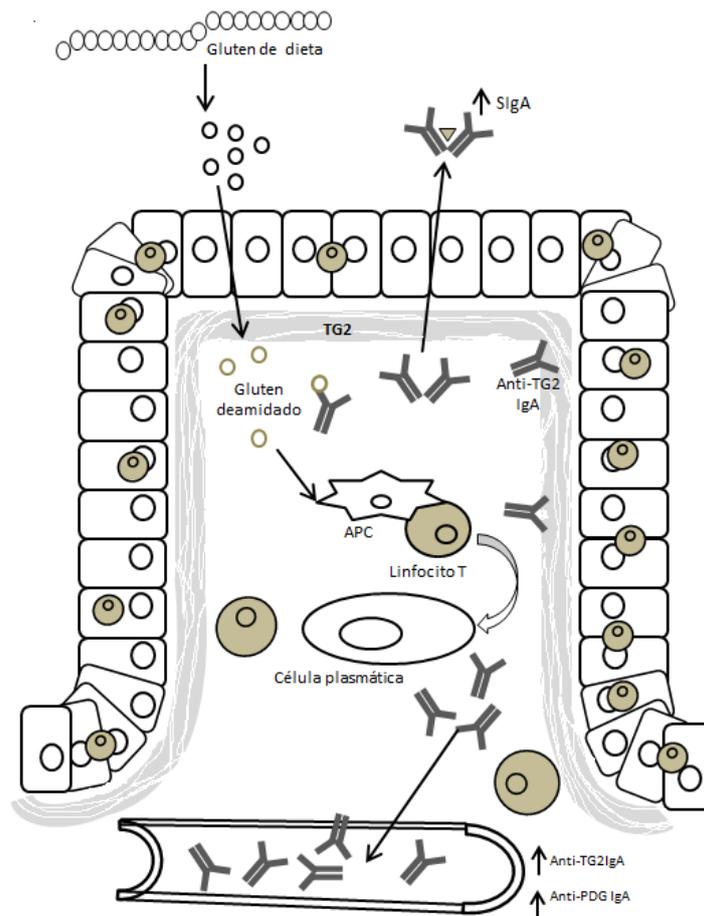
presentadoras de antígenos que expresan molécula HLA-DQ y de linfocitos TCD4+ reactivos al gluten (Gianfrani et al., 2005; Koning et al., 1991; Sollid, 2002). Como vimos anteriormente, los péptidos del gluten pueden ser tóxicos o inmunogénicos; los tóxicos, no son reconocidos por las células T, por lo que su efecto dañino sobre el epitelio es rápido e inespecífico; mientras que los péptidos inmunogénicos han de atravesar el epitelio hasta la lámina propia en la cual la TG2 deamida dichos péptidos, incrementando su afinidad por las moléculas HLA DQ2/DQ8, siendo esta respuesta más tardía y específica. Ambas respuestas conducen a la lesión, citotoxicidad epitelial y subsecuente re-estructuración de la matriz extracelular.

#### *1.3.3.1 Respuesta frente al gluten*

La función principal de la TG2 es catalizar modificaciones de proteínas mediante transamidación o deamidación. De esta manera, la TG2 genera péptidos del gluten con cargas negativas a través de la transformación de glutamina en ácido glutámico (Molberg et al., 2001; Van de Wal et al., 1998), actuando así como péptidos inmunogénicos, uniéndose con mayor afinidad a las moléculas HLA-DQ2/DQ8 (Godkin et al., 1997; Shewry & Halford, 2002; Vartdal et al., 1996) y, aumentando su capacidad para estimular los linfocitos T CD4+. En pacientes con EC activa, encontramos la TG2 expresada en el borde en cepillo epitelial y en el subepitelio de la lámina propia de la mucosa (Molberg et al., 1998) (Figura 4). La TG2 ha sido identificada como el principal autoantígeno en la EC, es por ello que una de las características diagnósticas clave de la EC es la presencia de autoanticuerpos anti-TG2 de tipo IgA e IgG en suero (Rostom et al., 2005) y formando depósitos en la mucosa intestinal en localizaciones específicas.

La respuesta inmunológica inmediata de tipo innato, no relacionada con los linfocitos T con receptores de tipo  $\alpha\beta$ , se desencadena como consecuencia de la interacción entre péptidos tóxicos del gluten y las células epiteliales intestinales o enterocitos (Di Sabatino et al., 2006). Estos péptidos derivan de la mala digestión del gluten en la luz del intestino, debido a la particular estructura primaria de las proteínas que lo constituyen. Así, los enterocitos liberan interleucina 15 (IL-15), la cual: a) promueve la supervivencia, activación y proliferación de los linfocitos intraepiteliales (LIE); b) controla la expansión clonal de los LIE con TCR de tipo  $\gamma\delta$ ; c) modula a células NK con receptores de tipo NKG2D (Hue et al., 2004; Meresse et al., 2004), cuyos ligandos son moléculas codificadas en los loci del HLA como MICA y que están expresadas por los enterocitos (Maiuri et al., 2000; Maiuri et al., 2001; Mention et al., 2003). La IL-15 contribuye a desencadenar la inflamación y el efecto citotóxico frente a los enterocitos y ayuda a debilitar las uniones tight-junctions con el consiguiente aumento de la

permeabilidad de la mucosa intestinal (Clemente et al., 2003; Di Sabatino et al., 2006; Ebert, 2005; Meresse et al., 2004). Estos efectos de la IL-15 permiten que las moléculas de gluten penetren con mayor facilidad en la lámina propia, donde serán reducidas a péptidos desaminados inmunogénicos del gluten mediante la enzima TG2, causando la liberación de más IL-15, actuando así la IL-15 como mediador de la respuesta innata y la lesión epitelial, además de promover la supervivencia de los linfocitos T específicos de la respuesta inflamatoria (Fehniger & Caligiuri, 2001).



**Figura 4.** Esquema de la Inmunopatogenia de la enfermedad celíaca (Imagen adaptada de Sollid & Lundin, 2009).

Por otro lado, las células dendríticas (CD), estimuladas por IL-15, captan los péptidos deamidados inmunogénicos del gluten y realizan la presentación antigénica en el contexto de moléculas HLA-DQ2/DQ8. De esta forma, linfocitos T CD4+ específicos del gluten reconocerán dichos péptidos y se activarán, lo que conlleva a su expansión clonal y diferenciación, en este caso, generalmente, vía respuesta adaptativa Th1, provocando la producción de IFN- $\gamma$ . La presencia elevada de IFN- $\gamma$  aumenta la respuesta innata por parte de los enterocitos así como la transcitosis, aumentando los niveles de péptidos de gluten en la lámina propia y como consiguiente aumenta los

efectos de la inmunidad tanto innata como adaptativa. Así, la colaboración entre las respuestas que ocurren tanto en el epitelio como en la lámina propia causa atrofia vellositaria de la mucosa, típica de la enteropatía de la EC.

#### **1.4 Diagnóstico**

En 1969 la ESPGHAN (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) estableció por primera vez unos criterios para el diagnóstico de EC en la población pediátrica (Meuwisse, 1970), los llamados Criterios Interlaken 1969, también conocidos como la regla de las tres biopsias. Estos criterios requerían una primera biopsia (diagnóstica) mientras el paciente tomaba gluten, que demostraba enteropatía; tras lo cual, se instauraba una DSG durante un período mínimo de 2 años y posteriormente se realizaba una segunda biopsia (pre-provocación), comprobando así la normalización histológica completa tras retirar el gluten de la dieta. Por último, se requería una prueba de provocación que consistía en una tercera biopsia (post-provocación), que corroboraba la reaparición de lesión histológica tras la reintroducción del gluten. La obligatoriedad de la tercera biopsia tenía como objetivo diferenciar la EC de otras causas de enteropatía, así como demostrar el carácter permanente de la intolerancia, quedando establecido el diagnóstico de EC.

Tras años de experiencia obtenida por gastroenterólogos pediátricos y por extensos estudios multicéntricos y la aparición del anticuerpo anti-gliadina (AAG) como marcador serológico de la enfermedad, se modificaron dichos criterios, reduciendo la obligatoriedad de la prueba de provocación a casos determinados (Walker-Smith et al., 1990):

- Niños <2 (3) años en el momento de la primera biopsia intestinal (BI), para excluir otras causas de enteropatía.
- Pacientes que habían comenzado una DSG antes de la realización de la primera BI.
- Cuando no se había llevado a cabo la primera BI antes de iniciar una DSG.
- Cuando la BI al diagnóstico no evidenciaba una lesión característica.
- En cualquier circunstancia en que el diagnóstico era dudoso.

De este modo, la aplicación de los criterios diagnósticos publicados en 1990, permitiría establecer el diagnóstico en niños mayores con síntomas sospechosos de EC, tras la

realización de una sola BI con lesiones características, que no específicas, que respondían a una DSG. Además, la existencia de AAG elevados se consideraba un elemento adicional que apoyaba el diagnóstico.

Años después, los avances y precisión en las pruebas inmunológicas, como la determinación de anticuerpos anti-TG2 y AAE, el establecimiento de la asociación entre EC y marcadores genéticos HLA-DQ2 y /o HLA-DQ8, dieron lugar a la revisión de estos criterios diagnósticos. En 2012, un grupo de expertos de la ESPGHAN, publicó las nuevas guías para el diagnóstico de EC en edad pediátrica, en la que se valoraron y reconsideraron las cuatro herramientas diagnósticas clásicas: la clínica, los anticuerpos, la predisposición genética y la lesión histológica (Husby et al., 2012).

Atendiendo a estos nuevos criterios de la ESPGHAN 2012, el diagnóstico de EC debe ser confirmado con una biopsia, que se efectuará siempre antes de iniciar la DSG. No obstante, se podrá omitir la BI siempre y cuando el sujeto cumpla todos estos criterios:

- Sujetos sintomáticos.
- Con valores de anticuerpos anti-TG2 10 veces superiores al valor de referencia (VR).
- Con AAE, como test confirmatorio, positivos.
- Y que además, presenten un haplotipo HLA asociado a EC (DQ2 y/o DQ8).

En el resto de casos sigue siendo necesaria la realización de al menos una biopsia antes de iniciar una DSG para evitar diagnósticos incorrectos (Husby et al., 2012).

Por otro lado, deja de ser necesario realizar una prueba de provocación a aquellos pacientes cuyo diagnóstico no se cuestiona, independientemente de la edad al diagnóstico y tan solo se realizará en niños con:

- Marcadores serológicos negativos en el momento de sospecha inicial.
- Lesión histológica de bajo grado (Marsh 0 o 1), o problemas para valorar la BI.
- No haplotipo HLA de riesgo.

### ***1.4.1 Manifestaciones clínicas***

Los nuevos criterios diagnósticos de la ESPGHAN 2012, describen, de acuerdo a la sintomatología, en qué situaciones se debe investigar el diagnóstico de EC. Se

establecen dos grandes grupos, pacientes con síntomas clásicos, y pacientes asintomáticos o que pertenecen a algún grupo de riesgo (Tabla 1).

**Tabla 1.** Situaciones en las que investigar la EC según las guías diagnósticas de la ESPGHAN 2012.

En niños y adolescentes que presentan síntomas de etiología no filiada:	En niños y adolescentes que pertenezcan a alguno de los siguientes grupos de riesgo:
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diarrea crónica o intermitente</li> <li>• Fallo de medro, pérdida de peso, estancamiento ponderal</li> <li>• Pubertad retrasada, amenorrea</li> <li>• Anemia ferropénica</li> <li>• Náuseas o vómitos</li> <li>• Dolor abdominal crónico</li> <li>• Distensión abdominal</li> <li>• Estreñimiento crónico</li> <li>• Fatiga crónica</li> <li>• Aftas bucales recurrentes</li> <li>• Dermatitis herpetiformes</li> <li>• Fracturas óseas con traumatismos mínimos osteopenia/osteoporosis</li> <li>• Alteración bioquímica hepática</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Familiares de 1er grado con EC</li> <li>• Diabetes mellitus tipo 1</li> <li>• Síndrome de Down</li> <li>• Enfermedad tiroidea autoinmune</li> <li>• Síndrome de Turner</li> <li>• Síndrome de Williams</li> <li>• Déficit selectivo de inmunoglobulina tipo A</li> <li>• Hepatitis autoinmune</li> </ul>

#### **1.4.2 HLA**

Aproximadamente, el 95% de los pacientes celíacos son HLA-DQ2 positivos y el otro 5% expresa HLA-DQ8 (Karell et al., 2003). Los individuos homocigotos para el HLA-DQ2 presentan al menos cinco veces más riesgo de desarrollar la EC que los heterocigotos (Bourgey et al., 2017; Vriezinga et al., 2014). Además, estos tipos de HLA son comunes, alrededor de un 30-40% de la población general los posee, aunque la mayoría no padece la enfermedad. Por tanto, su presencia es necesaria pero no suficiente por sí sola para desarrollar EC.

El análisis genético tiene un alto valor predictivo negativo, así la ausencia de HLA-DQ2/HLA-DQ8 permite excluir la EC con un 99% de fiabilidad, evitando con ello pruebas invasivas, incómodas y de mayor coste, y exigiendo la búsqueda de otras causas para explicar la clínica del paciente (Miranda et al., 2012).

### ***1.4.3 Marcadores serológicos***

Desde el punto de vista diagnóstico, la característica más útil para la práctica clínica de la respuesta inmune en la EC, es la presencia de anticuerpos circulantes en sangre en pacientes con EC activa. Los anticuerpos séricos como los anti-TG2 y AAE, son marcadores sensibles y específicos de EC, por lo que son los más utilizados para el despistaje de la misma. Sin embargo, la negatividad de su análisis no excluye el diagnóstico de la misma, especialmente en pacientes adultos. Por otro lado, las pruebas basadas en IgG son útiles para la detección de la EC en pacientes con déficit de IgA.

#### ***1.4.3.1 Anticuerpos anti-gliadina y anticuerpos contra péptidos deamidados de gliadina***

La determinación de anticuerpos anti-gliadina (AAG) (de tipo IgA e IgG) fue la primera herramienta serológica para el diagnóstico de la EC, a partir de los años 80. (Ribes-Koninckx et al., 1984; Troncone & Ferguson, 1991). Los AAG están dirigidos contra la fracción de gliadina de la proteína del trigo y proteínas similares presentes en el centeno y la cebada. Presentan una sensibilidad y especificidad variables, entre el 80 y 90%, con un valor predictivo positivo por debajo del 30% (Leffer & Schuppan, 2010).

Posteriormente, se desarrollaron las pruebas para la determinación de anticuerpos dirigidos contra péptidos deamidados de la gliadina (anti-PDG), tras comprobar el proceso de desamidación que sufren los péptidos de gliadina a nivel de la lámina propia. Los anti-PDG pueden usarse inicialmente o conjuntamente cuando los otros anticuerpos son negativos, cuando el paciente es menor de 2 años de edad o cuando existe deficiencia primaria o secundaria de inmunoglobulina tipo A (IgA). Las ventajas de los anti-PDG frente a las pruebas de los AAG radican que su mayor especificidad aunque esta sigue siendo inferior a la de los antiTG2 IgA y EMA.

#### ***1.4.3.2 Anticuerpos antiendomiso***

Los AAE, descritos en 1984, están dirigidos contra la transglutaminasa tisular extracelular 2 y se detecta mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando como sustrato tejido de esófago de mono o tejido del cordón umbilical humano. Brevemente, los anticuerpos antiendomiso del suero se unen a sus correspondientes antígenos presentes en la sección del tercio inferior del esófago de mono. Una vez unidos, los anticuerpos se ponen de manifiesto mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas A humanas conjugado con fluoresceína y se visualizan por microscopía de fluorescencia. De este modo, los sueros que presentan fluorescencia tipo reticular (marcaje específico) en la capa de musculatura lisa más próxima a la mucosa del esófago de mono (endomiso) deberán considerarse

positivos. La prueba de detección de AAE presenta una sensibilidad y especificidad mayor a las pruebas de los AAG. En niños, la sensibilidad de los AAE IgA oscila entre el 83% y 100 %, con una sensibilidad mayor al 90% en la mayor parte de los casos; y la especificidad varía entre el 95-100%, pero es mayor al 95% en la mayoría de los casos, (Giersiepen et al., 2012) (Tabla 2) sugiriendo un alto valor predictivo positivo y negativo (Kapuscinska, 1987). La elevada especificidad de los AAE, se debe a que éstos reconocen solo los epítomos de transglutaminasa tisular (tTG) relacionados con EC, tTG extracelular combinada con fibronectina.

Un inconveniente destacable en la detección de AAE es que su lectura es subjetiva, por lo que es necesario que su interpretación sea realizada por un observador cualificado y con experiencia. La especificidad de estos anticuerpos, en laboratorios expertos, está entre el 98 y el 100%, por lo que deben considerarse como el estándar de referencia de anticuerpos específicos de EC.

#### *1.4.3.3 Anticuerpos antitransglutaminasa tisular*

La transglutaminasa tisular está identificada como autoantígeno de la EC, lo que ha propiciado el desarrollo de diversos métodos ELISA que permiten determinar la presencia de anticuerpos frente a este antígeno. Diferentes estudios han corroborado que los anticuerpos anti-TG2 IgA y los AAE IgA son el mismo anticuerpo determinado frente a sustratos distintos (Molberg et al., 2000; Troncone et al., 1999).

Los anticuerpos anti-TG2 son producidos por células plasmáticas de la lámina propia intestinal, donde se unen a la TG2 presente en la mucosa intestinal; también pueden acumularse en tejidos de órganos que presentan un alto contenido en T2G como el hígado, bazo, riñón, cerebro o placenta; donde se produce el paso posterior a la circulación, jugo duodenal y saliva. (Korponay-Szabó et al., 2004). Así, los niveles de anti-TG2 observados en suero, son el reflejo de los anti-TG2 acumulados en los tejidos.

Los anti-TG2 IgA tiene una alta sensibilidad (>95%) para el diagnóstico de EC, pero una especificidad ligeramente menor que los AAE ya que se han observado anti-TG2 en otras patologías como enfermedades autoinmunes, enfermedades hepáticas o infecciones víricas; sin embargo, en estos casos no son dependientes del gluten, se suelen encontrar a títulos bajos y presentan una especificidad diferente ya que van dirigidos frente a epítomos intracelulares de tTG inducidos por daño tisular o inflamación, y no contra epítomos de tTG relacionados con la EC. Niveles altos de anti-TG2 (>10xVR), pueden considerarse como valores altamente específicos de EC. Sin

embargo, cuando los niveles son positivos pero bajos, deben confirmarse con la determinación de los AAE, y/o BI.

Como ventaja frente a los AAE, los anti-TG2 se determinan mediante una técnica objetiva, cuantitativa más rápida y barata; como ventaja adicional frente a los anti-PDG presenta mayor especificidad y mantienen una alta sensibilidad, incluso con variaciones, dependiendo de la población estudiada. Se recomienda la determinación de anti-TG2 IgA para confirmar la existencia de EC, debiendo asimismo determinar la concentración de IgA total en suero, para descartar una posible deficiencia selectiva de IgA. La sensibilidad de la prueba de los anti-TG2 de clase IgG, es menor que los de clase IgA, sin embargo, los anti-TG2 IgG pueden utilizarse para realizar el cribado de la EC en pacientes con déficit de IgA, donde tiene una alta sensibilidad y especificidad (Korponay-Szabo et al., 2003).

**Tabla 2.** Sensibilidad, especificidad, Likelihood ratios y Odds ratio diagnóstico para AAE, anti-TG2, AAG y anti-PDG en niños.

	Número de estudios	Sensibilidad (Rango)	Especificidad (Rango)	LR+	LR-	DOR
<b>AAE IgA</b>	11	82.6-100%	94.7-100%	31.8	0.067	553.6
<b>Anti-TG2 IgA</b>	18	73.9-100%	77.8-100%	21.8	0.06	469
<b>Anti-TG2 IgG</b>	4	12.6-99.3%	86.3-100%	8.3	0.22	53.3
<b>Anti-PDG IgA</b>	3	80.7-95.1%	86.3-93.1%	9.4	0.121	86.1
<b>Anti-PDG IgG</b>	3	80.1-98.6%	86.0-96.9%	13.6	0.061	234
<b>AAG IgA</b>	6	60.9-96%	79.4-93.8%	7.3	0.186	40.6

AAE: anticuerpos anti-endomisio; Anti-TG2: anticuerpos antitransglutaminasa; Anti-PDG: anticuerpos anti-péptidos deamidados de gliadina. LR+: Likelihood ratio positivo; LR-: Likelihood ratio negativo; DOR: Odds ratio diagnóstico. (Adaptado de Giersiepen et al., 2012).

### 1.4.4 Biopsia intestinal: histología

Aunque los nuevos criterios ESPGHAN 2012 (Husby et al., 2012) permiten omitir la BI en niños y adolescentes, si se cumplen una serie de condiciones (sujetos sintomáticos con anticuerpos anti-TG2 IgA > 10xVR, verificados por AAE, y HLA DQ2 y/o DQ8 positivos), en muchos de los casos es necesario el estudio histológico de la mucosa intestinal obtenida mediante biopsia para confirmar el diagnóstico. Normalmente, las biopsias se obtienen mediante endoscopia del tracto digestivo superior, permitiendo la

obtención de múltiples muestras (a nivel de bulbo duodenal, 1ª, 2ª y 3ª porción duodenal) y/o eventualmente, la selección de determinadas zonas de la mucosa de aspecto patológico. Las anomalías histológicas pueden ser heterogéneas e irregulares en estadios iniciales de EC, es decir, pueden presentarse de forma “parcheada”, motivo por el cual se recomienda tomar múltiples fragmentos de biopsia durante la endoscopia con la finalidad de evitar que la lesión pase desapercibida. Es más, existen datos que demuestran que en hasta el 10% de los casos de EC la lesión histológica se limita, inicialmente, al bulbo duodenal (Kurien et al., 2012). Por este motivo, se aconseja tomar como mínimo 4 biopsias de la segunda-tercera porción del duodeno y otra del bulbo duodenal (Husby et al., 2012). Es imprescindible que en el momento de la biopsia el paciente siga una dieta con gluten, ya que, si ha iniciado una DSG las lesiones de la mucosa intestinal pueden remitir en un período de tiempo relativamente corto, dificultando la confirmación del diagnóstico.

Los hallazgos histológicos característicos de la EC comprenden (Hill et al., 2005; Husby et al., 2012):

- **Incremento de linfocitos intraepiteliales (LIE):** Es el primer y más sensible hallazgo causado por el gluten en la mucosa intestinal y se considera, por sí solo, la característica histopatológica más relevante (Marsh, 1992). Sin embargo, no es totalmente específico de EC, ya que puede presentarse también en una serie de enfermedades como la giardiasis, intolerancias alimentarias, enteropatía autoinmune y esprue tropical, entre otras. Se habla de aumento de LIE cuando existen más de 25 LIE por cada 100 enterocitos (Hayat, 2002). Los LIE son una subpoblación heterogénea de linfocitos T que se entremezclan con células epiteliales y que tienen un papel inmunológico importante en la respuesta frente a antígenos en la mucosa del intestino. Se reconocen fácilmente por tinción de hematoxilina-eosina, y también pueden identificarse utilizando una tinción para los anticuerpos anti-CD3 o  $\gamma\delta+$ .
- **Cambios en los enterocitos:** En fases iniciales o latentes de EC no se observan anomalías llamativas en los enterocitos. No obstante, cuando hay daño severo, presentan cambios inespecíficos tales como la pérdida del borde en cepillo, apariencia cuboidal, pérdida de la orientación basal, etc...
- **Hiperplasia de las criptas:** el aumento del índice mitótico en las criptas como mecanismo para intentar reparar el daño epitelial (citólisis de enterocitos) conduce a un alargamiento de las criptas.

- **Disminución en la relación vellosidad/cripta:** Siendo el cociente normal vellosidad/cripta mayor de 2.5, cocientes menores se consideran indicativos de atrofia.
- **Aumento de la infiltración de la lámina propia (basal) por parte de células plasmáticas, linfocitos, mastocitos, eosinófilos y basófilos:** La mucosa intestinal normal contiene células plasmáticas y linfocitos T, junto a macrófagos y, ocasionalmente, eosinófilos, que forman parte del sistema linfoide asociado a la mucosa (MALT), por lo que no deben ser interpretadas como patológicas. En una mucosa que presenta anomalías en las vellosidades suele existir además, un aumento de células en los 2/3 superiores de la lámina propia a expensas, predominantemente, de linfocitos y células plasmáticas. No obstante, a pesar de la utilidad del estudio de la lámina propia, ninguno de estos hallazgos es específico ni diagnóstico de EC.
- **Atrofia parcial o total de las vellosidades:** La atrofia vellositaria es una de las alteraciones histológica más característica en la EC. Existen diferentes grados de atrofia vellositaria cuya nomenclatura difiere según centros y autores.

Así, el espectro de alteraciones histológicas varía desde un incremento aislado de LIE aislados hasta la destrucción de vellosidades intestinales con un aplanamiento completo de la mucosa. En 1992, Marsh describió 3 estadios histológicos progresivos en la EC. Más tarde, Oberhuber modificaría el sistema de clasificación de Marsh dividiendo el estadio 3 en 3 subgrupos, dando lugar a la clasificación de Marsh-Oberhuber (Tabla 3) (Oberhuber et al., 1999). Actualmente, la mayor parte de los anatomopatólogos usan dicha clasificación para el diagnóstico de EC. Se consideran determinantes en el diagnóstico de EC, las lesiones Marsh-2 (hiperplásica) y Marsh-3 (atrofia parcial, subtotal o la total), sin embargo, las lesiones de bajo grado (Marsh-1, infiltrativa), no son específicas de EC, ya que solo el 10% de los individuos con Marsh-1 tiene EC.

**Tabla 3:** Clasificación de Marsh-Oberhuber (Oberhuber et al., 1999)

Marsh 0	Arquitectura normal de la mucosa y de las vellosidades
Marsh 1	Aumento de los LIE (>25/100 enterocitos)
(lesión infiltrante)	Vellosidades arquitectónicamente normales con una relación normal vellosidad/cripta de 3 a 1
Marsh 2	Aumento de los LIE (>25/100 enterocitos)
(lesión hiperplásica)	Hiperplasia de las criptas
	Arquitectura normal de las vellosidades
Marsh 3	3a: aumento de los LIE, hiperplasia de las criptas y atrofia parcial de las vellosidades
(lesión destructiva)	3b: aumento de los LIE, hiperplasia de las criptas y atrofia casi total de las vellosidades
	3c: aumento de los LIE, hiperplasia de las criptas y atrofia total de las vellosidades

#### **1.4.5 Biopsia intestinal: depósitos de anticuerpos anti transglutaminasa tisular**

La presencia de anomalías histológicas inespecíficas, el posible parcheado de la lesión e incluso la calidad de la muestra pueden afectar a la interpretación histológica de la BI, dificultando así la confirmación del diagnóstico de la enfermedad. Por otra parte, grados menores de enteropatía (Marsh 1-2) asociados a la EC pueden también ser atribuibles a agentes infecciosos u otras patologías como alergias alimentarias y enteropatías autoinmunes.

La EC se caracteriza por abarcar un amplio espectro de manifestaciones clínicas, histológicas y serológicas, que en ocasiones pueden dificultar el diagnóstico, como formas asintomáticas, una mucosa duodenal con apariencia normal y/o marcadores serológicos negativos. Por ello, son necesarios marcadores diagnósticos adicionales que ayuden a asegurar el diagnóstico, como son la presencia de depósitos subepiteliales de anti-TG2 IgA o la presencia de cambios en las subpoblaciones de LIE en el linfograma intraepitelial determinado mediante citometría de flujo.

En el linfograma intraepitelial, mediante el análisis por citometría de flujo, se determinan de forma conjunta, 3 parámetros: el porcentaje de LIE (LIE CD45+)

respecto al total del epitelio, el porcentaje de LIE TcR-  $\gamma\delta$ +, y el porcentaje de LIE CD3- (De Andres et al., 2015).

Para determinar la presencia de depósitos de anti-TG2, mediante la técnica de inmunofluorescencia original publicada por Korponay-Szabó et al. (Korponay-Szabó et al., 2004), se incuban secuencialmente diferentes secciones de biopsias duodenales del mismo individuo con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-TG2 y posteriormente un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con isotiocinato de rodamina (TRITC en rojo), y posteriormente con anticuerpo policlonal de conejo anti-IgA humana conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC en verde). Por último, se realiza la lectura en microscopio de fluorescencia o microscopio confocal, pudiéndose detectar la presencia de depósitos de anticuerpos de clase IgA frente a TG2, mediante la colocalización de anticuerpos IgA (verde) y TG2 (rojo). Cuando los depósitos de Inmunoglobulina de clase A se detectan en colocalización con la transglutaminasa tisular (se observa coloración amarilla por la superposición de ambas fluorescencias) se confirma la presencia de autoanticuerpos dirigidos frente a la transglutaminasa tisular a nivel de la mucosa intestinal, y por lo tanto la presencia de depósitos de tTG en la mucosa. Los pacientes con EC muestran depósitos intestinales de anticuerpos anti-TG2 IgA localizados por debajo de la membrana basal de los enterocitos a lo largo de las vellosidades y de las criptas y alrededor de los vasos de la mucosa. Basándose en esta técnica se observó la presencia de depósitos anti-TG2 IgA en pacientes con EC, EC potencial y dermatitis herpetiforme (Korponay-Szabó et al., 2004), demostrando que la detección de estos depósitos en la evaluación histológica de pacientes con sospecha de EC es un fenómeno específico, independientemente del grado de enteropatía.

Los depósitos anti-TG2 IgA son detectables en pacientes con EC al diagnóstico, siendo concordantes los resultados de estudios realizados en pacientes pediátricos y en adultos. Los depósitos tuvieron una sensibilidad del 100% en la EC no tratada (Korponay-Szabó et al, 2004; Koskinen et al., 2010; Salmi et al., 2010; Tosco et al., 2013), exceptuando únicamente a niños menores de 2 años donde la sensibilidad fue del 73% (Maglio et al., 2011). El valor medio de especificidad es de un 94% (rango 80-100%) al diagnóstico de EC (Gatti et al., 2014). En 6 de un total de 16 estudios revisados, se encontraron depósitos en grupos control en el 5-20% de los casos, con una alta prevalencia en diabetes mellitus tipo 1 y enfermedad inflamatoria intestinal. Así mismo, diversos estudios de seguimiento de pacientes muestran que los depósitos desaparecen lentamente tras el inicio de una DSG, tendiendo a desaparecer más tarde que los marcadores serológicos, siendo detectables en el 56% de los pacientes

después de más de 2 años de DSG (Koskinen et al., 2010); revelando así su utilidad como marcador específico de EC en aquellos pacientes que han iniciado una DSG en el momento de la biopsia, o con una dieta pobre en gluten, hecho frecuente en el ámbito familiar con algún miembro con EC.

Diferentes investigaciones sugieren la presencia de anticuerpos frente a TG2 en la mucosa del intestino delgado en pacientes con EC, antes de su detección en sangre periférica y precediendo al deterioro de la mucosa por lo que tendrían un papel importante en el diagnóstico precoz, evitando la morbilidad de las complicaciones de la EC no tratada. Así, pacientes con EC en estadio temprano, que presentan una morfología vellositaria de la mucosa del intestino delgado conservada, pueden mostrar estos depósitos de autoanticuerpos dirigidos a TG2 en la mucosa (Kaukinen et al., 2005; Tosco et al., 2013) y en la mayoría de los casos estos depósitos predicen una posterior evolución hacia una atrofia vellositaria (Kaukinen et al., 2005; Salmi et al., 2006; Tosto et al., 2011).

Se estudiado el efecto de los depósitos anti-TG2 IgA que se acumulan alrededor de los vasos sanguíneos en la lámina propia (Kalliokoski et al., 2013). Al parecer su efecto antiangiogénico pudiera ser el responsables de la vascularización anormal observada en la mucosa intestinal en la EC no tratada, contribuyendo con ello al desarrollo de la atrofia vellositaria.

La detección de los depósitos anti-TG2 IgA puede ayudar a establecer un diagnóstico diferencial entre EC y otras enfermedades; también puede facilitar la interpretación de especímenes no óptimos para su evaluación histológica o con problemas de orientación. Por otra parte, resulta una herramienta eficaz y prometedora para el diagnóstico de EC, principalmente en los casos con un grado bajo de enteropatía o sin sintomatología evidente; así como en el diagnóstico de EC potencial. Sin embargo, si bien es una técnica no excesivamente compleja, su lectura e interpretación requiere una infraestructura y nivel de pericia solo al alcance de laboratorios especializados.

### **1.5 Tratamiento**

Una vez diagnosticada la EC, el único tratamiento existente y eficaz en la actualidad consiste en mantener una DSG de por vida. Tras lo cual, se consigue una normalización de los síntomas a partir de las dos semanas posteriores al inicio de la DSG, la normalización serológica entre los 6 y 12 meses y la recuperación de las vellosidades intestinales en torno a los 2 años (Bravo, 2011). Está demostrado que la ingesta de gluten, aunque sea en muy pequeñas cantidades, de forma continuada, puede producir daño en la mucosa intestinal o provocar otros trastornos y alteraciones no deseables, incluso en ausencia de síntomas. (Gibert et al., 2006; Catassi et al., 2007).

Por otra parte, la DSG debe aportar todos los nutrientes necesarios para el paciente según su edad, etapa evolutiva de la enfermedad y situación de gravedad.

La DSG consiste en la exclusión de la dieta de las proteínas del endospermo de trigo (especialmente, gliadinas y gluteninas), y de sus homólogos en la cebada (hordeínas), centeno (secalinas), y avena (aveninas), así como los híbridos de estos cereales (como kamut y triticale), y sus derivados (almidón, harina, etc.). El término gluten es usado, en muchas ocasiones, para referirnos de forma genérica tanto al gluten de trigo como a otras proteínas contenidas en los cereales citados, las prolaminas caracterizadas por un alto contenido en los residuos prolina y glutamina, en las que se han identificado fragmentos tóxicos, es decir, capaces de estimular una respuesta inmune inadecuada que resulta lesiva para la mucosa intestinal de la mayoría de los pacientes con EC.

El Codex Alimentario establece como límite máximo de contenido en gluten, para los productos considerados sin gluten, 20 partes por millón (ppm) o mg/kg. Dicha normativa se encuentra en revisión, ya que se desconoce la cantidad máxima de gluten que puede ingerir un celíaco sin perjuicio para su salud. La cantidad mínima de gluten necesaria para inducir la aparición de síntomas no está aún del todo clara. Catassi, en 2007, publica cómo la ingesta de unas dosis de gluten menor a 50 mg diarios no induce cambios significativos en la mucosa intestinal, pero 50 mg o más de gluten al día sí lo logran a pesar de comprobar variabilidad individual en esta respuesta. (Catassi et al., 2007). La mayoría de autores coinciden en que las cantidades seguras se encuentran entre 10 y 50 ppm. Aunque lo más seguro sería contener menos de 10 ppm o 0 ppm, no obstante, conllevaría a una limitada disponibilidad de alimentos sin gluten. De manera que, lo más favorable para el celíaco es que consuman alimentos naturales que no tienen gluten, como leche,

carnes, pescados, huevos, frutas, verduras, además de los cereales permitidos, como arroz o maíz y patatas, y otros sustitutivos de alto valor nutricional, como las legumbres y diversos tipos de harinas (amaranto, trigo sarraceno, mijo, quínoa, sorgo, etc.).

Tratamientos alternativos como el desarrollo de una vacuna, fármacos dirigidos a mantener las tight junctions, enzimas capaces de hidrolizar los péptidos de gliadina y convertirlos en inocuos etc. están desde hace algunos años en distintos niveles de desarrollo aunque ninguna de ellas ha alcanzado resultados que permitan prever su aplicación práctica a corto o medio plazo.



## *2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS*

---

## **2 Hipótesis y objetivos**

### **2.1 Hipótesis**

Diferentes factores, genéticos, ambientales y dietéticos, no totalmente esclarecidos, contribuyen al desarrollo de la EC. Varios autores, apuntan a que el aumento de la prevalencia de la EC en nuestro entorno en los últimos años, podría estar relacionada con factores ambientales como son la edad de introducción del gluten en la alimentación y la forma de introducción del mismo, la lactancia materna y la aparición de procesos infecciosos intercurrentes, especialmente la infección de diversos reovirus como los rotavirus.

La evidencia clínica muestra que la lactancia materna puede conferir cierta protección frente al desarrollo de EC, ya que en estudios observacionales retrospectivos, la lactancia materna prolongada se ha asociado a una incidencia decreciente de EC en niños. Sin embargo, los mecanismos implicados en este efecto inmunoprotector no se han abordado hasta el momento, por lo que se plantean tres cuestiones no resueltas que dieron lugar al inicio del presente estudio:

- ¿Está asociado este efecto protector al paso de pequeñas cantidades de gluten al tracto intestinal del lactante a través de la LM?
- ¿Está asociado este efecto protector al paso de anticuerpos específicos frente a antígenos alimentarios al tracto intestinal del lactante a través de la LM?
- ¿Influyen las características estudiadas de la LM en la descendencia?

Dado que no hay estudios publicados que aborden este problema, nos planteamos determinar en madres celiacas que siguen una DSG, la presencia de AAG en muestras de LM y evaluar el posible impacto de la DSG en el contenido de AAG en LM y, por consiguiente, en su eventual efecto protector frente a antígenos alimentarios (gluten) en el lactante. Igualmente nos proponemos analizar la relación entre la concentración de IgA total, de AAG y de prolaminas en LM con factores como la dieta de la madre, el país al que pertenecen, el mes de lactancia de la muestra etc.

Nuestra hipótesis es, por tanto, que péptidos del gluten y/o AAG presentes en la LM podrían ayudar a prevenir o modular el desarrollo de la EC. Para probar esta hipótesis, en primer lugar, vamos a determinar cuál es el papel de la lactancia materna en aquellas madres diagnosticadas de EC, que siguen una DSG, y que por lo tanto no secretarían péptidos de gluten, y estudiaremos si sus hijos lactantes se beneficiarían o no de este “efecto” de inducción de tolerancia oral, comparando el contenido de AAG y

gluten de la LM de estas madres, con el de la LM de madres que seguían una dieta con gluten.

Con el fin último de establecer una posible relación con el desarrollo de EC en su descendencia, analizaremos la composición de la LM (AAG, IgA total y contenido en prolaminas relacionadas) de aquellas madres cuyos niños hayan desarrollado EC en los primeros años de vida, para compararla con el resto de muestras de LM.

Estas madres pertenecen a una cohorte de niños de riesgo de EC (la cohorte Prevent CD) donde el diagnóstico de EC se realiza de forma muy precoz debido a un protocolo de seguimiento riguroso desde el nacimiento, por lo que también se estudiará la respuesta inmunitaria a nivel serológico y de la mucosa intestinal (histología y depósitos de anticuerpos anti-TG2), en estos casos de debut temprano, analizando estos resultados junto con la respuesta inmunológica en LM.

## **2.2 Objetivos**

- **Objetivo principal:**

El objetivo planteado es estudiar la presencia de AAG y péptidos de gliadina en LM de un grupo de madres con diagnóstico de EC que siguen una DSG y de un grupo de madres no celiacas con dieta normal (DN) pertenecientes al estudio multicéntrico europeo PreventCD, y comparar los niveles de anticuerpos y péptidos de gliadina de ambos grupos de madres, con el fin último de poder establecer una posible relación con el desarrollo de EC en su descendencia.

Para alcanzar este objetivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1- Desarrollar un método propio inmunológico para estudiar la presencia de anticuerpos anti gliadina en leche materna.
- 2- Optimizar un sistema para cuantificar la presencia de prolaminas en muestras de LM utilizando las técnicas más sensibles y específicas: técnicas inmunológicas (ELISA, Western blot) y técnicas proteómicas (espectrometría de masas).
- 3- Analizar los niveles de IgA total, AAG y prolaminas en LM de un grupo de madres con diagnóstico de EC que siguen una DSG y de un grupo de madres no celiacas con DN, pertenecientes a una cohorte de niños de riesgo para EC (Prevent CD cohort, [www.preventcd.com](http://www.preventcd.com)) seguidos desde su nacimiento.
- 4- Comparar el contenido de anticuerpos estudiados y prolaminas en LM de madres cuyos hijos desarrollaron EC antes de los 6 años de edad (período de seguimiento actual de la cohorte) frente a los anticuerpos en LM de madres cuyos hijos no han sido diagnosticados de EC.
- 5- Analizar la relación entre la IgA total y los AAG en LM en ambos grupos de madres.

- **Objetivos secundarios:**

Se plantearon los siguientes objetivos secundarios:

1. Analizar la respuesta inmune precoz en niños que han recibido lactancia materna y tienen un diagnóstico de EC, estudiando la serología, histología, así como la aparición de depósitos de intestinales anti-TG2.

2. En lactantes de riesgo, evaluar la aparición de depósitos intestinales anti-TG2 en biopsias intestinales muy tempranas y analizar su valor predictivo de desarrollo posterior de atrofia de las vellosidades.



*3. ESTUDIO DE ANTICUERPOS EN  
LECHE MATERNA: ANTI-GLIADINA  
e IgA Total*

---

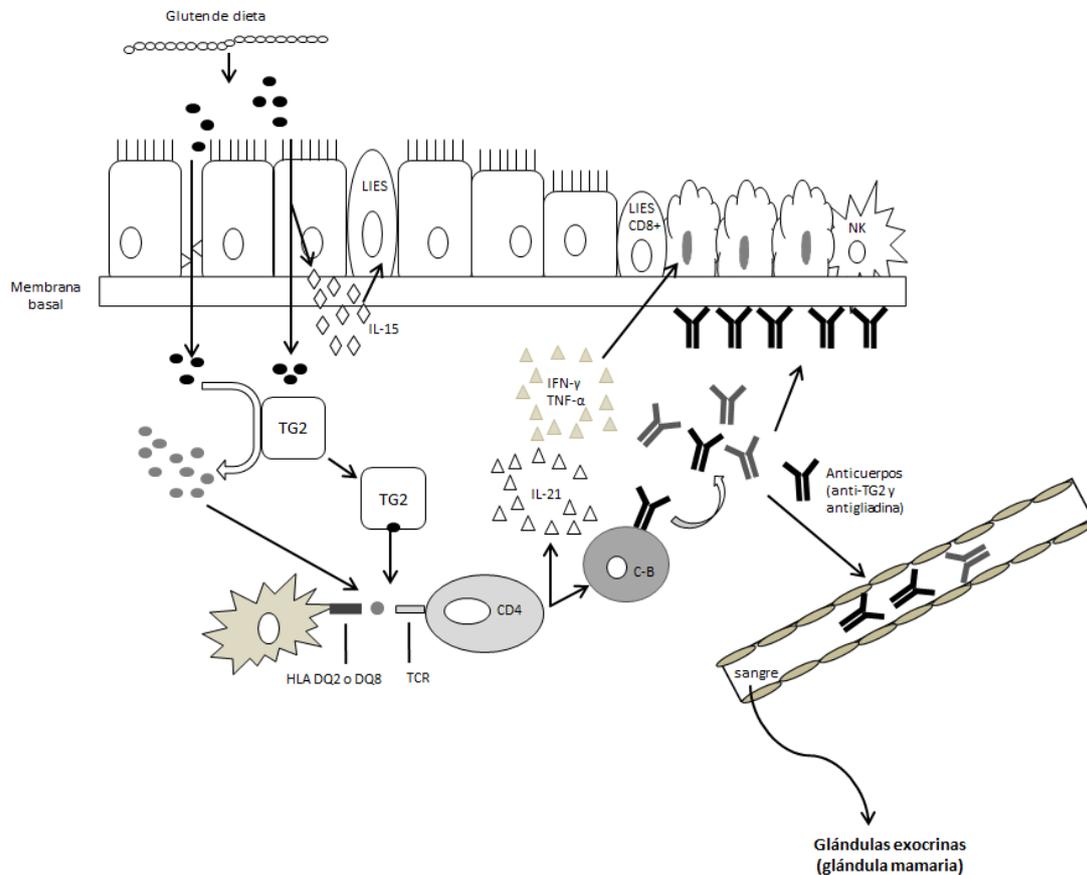
### **3 Estudio de anticuerpos anti-gliadina en leche materna**

#### **3.1 Antecedentes y justificación**

La presencia de la microbiota intestinal estimula el sistema inmunitario del bebé. La colonización bacteriana masiva en el recién nacido tiene lugar durante el parto, al exponerse a la microbiota vaginal, fecal y de la piel de la madre. Tras el nacimiento, la LM promueve la colonización y maduración de la microbiota intestinal en el lactante (Mueller et al., 2015). Además, la lactancia materna contribuye al desarrollo óptimo del sistema inmunitario de los recién nacidos por otros mecanismos, ya que la leche materna (LM) contiene no solo los nutrientes necesarios para el desarrollo de los lactantes, sino también numerosos factores bioactivos como enzimas, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, y la transferencia pasiva de inmunidad como la sIgA y también anticuerpos específicos frente a proteínas alimentarias.

El principal anticuerpo que contiene la LM, la sIgA, se encuentra en todas las secreciones exocrinas y en las mucosas, donde se inician la mayoría de las infecciones. Estos anticuerpos, son producidos principalmente en la mucosa intestinal, donde se encuentra las 2/3 partes del sistema inmunitario, debido a la gran exposición microbiana (Brandtzaeg, 2002). Por el contrario, la sIgA que contiene la LM se sintetiza por las células B de la glándula mamaria, que han migrado desde el intestino de la madre: Los antígenos alimentarios o microbianos, presentes en el lumen intestinal son transportados por las células M, pasando al interior de las placas de Peyer (agregaciones de linfocitos en la mucosa intestinal) donde los antígenos son presentados a los linfocitos T y B induciéndose síntesis de IgA dimérica, gracias a la presencia de la cadena J. Estas células B migran a varias mucosas, incluido el intestino, pero también a glándulas exocrinas como las glándulas mamarias, formando así el llamado círculo entero-mamario (Figura 5). En la glándula mamaria los linfocitos B producen dímeros de IgA unidos mediante la cadena J, éstos dímeros se transforman en sIgA cuando son transportados a través del epitelio de la glándula mamaria y adquieren una nueva cadena polipeptídica, la pIgR (Hanson & Korotkova, 2002). Este complejo es muy resistente a la proteólisis, interacciona firmemente con los mucopolisacáridos del lumen intestinal, y podrá, por tanto, ejercer su función protectora en el intestino del lactante. Debido a éste círculo entero-mamario, la LM contiene anticuerpos específicos de clase sIgA frente a antígenos que han estado en contacto con intestino de la madre. Además, los anticuerpos específicos frente a antígenos alimentarios, no solo están influidos por la dieta reciente de las madres, sino

que también puede reflejar la experiencia antigénica intestinal previa (Cruz et al., 1981; Hanson, 1998).



**Figura 5.** Círculo enteromamario (figura propia).

Se ha demostrado que los anticuerpos frente a proteínas alimentarias, presentes en la LM, pueden modificar la respuesta inmune en el intestino de los lactantes (MacGillivray & Kollmann, 2014). Por otra parte, los datos sobre la relación entre la dieta materna y los niveles de anticuerpos frente a estos antígenos alimentarios en la LM son contradictorios (Cruz et al., 1981; Fäth-Magnusson, 1989; Mascart-Lemone et al., 1991). La LM tiene una composición compleja y la grasa y el contenido de proteínas pueden interferir con la detección de anticuerpos específicos, lo que podría explicar algunas discrepancias en estudios previos.

Como ya se ha comentado, los estudios observacionales retrospectivos sugirieron que la lactancia materna puede conferir cierta protección desarrollo de EC y la lactancia materna prolongada se ha asociado a una menor incidencia de EC en los niños (Agostoni et al., 2008; Auricchio et al., 1983; Greco et al., 1988; Stevens et al., 1986).

Sin embargo, un meta análisis publicado recientemente, que incluye estudios observacionales prospectivos (Lionetti et al., 2014; Vriezinga et al., 2014), no encontró pruebas de un efecto protector de la lactancia materna en el desarrollo de EC durante la infancia (Szajewska et al., 2015). Aun así, todos estos estudios han sido realizados a nivel de grupo, y en el caso de los últimos estudios prospectivos, solo se han analizado los datos hasta que los niños cumplieron una determinada edad (3 años, en el caso del Prevent-CD), pero no se conoce los efectos de la lactancia materna sobre el desarrollo de la EC a largo plazo. Además, no hay estudios publicados sobre AAG en LM de madres celíacas siguiendo una DSG.

Por lo tanto, el objetivo de este estudio es determinar la presencia de AAG en muestras de LM en madres EC con DSG y madres sin EC ni restricciones dietéticas pertenecientes al ensayo clínico PreventCD ([www.preventcd.com](http://www.preventcd.com)) y evaluar el posible impacto de una DSG en el contenido de AAG en LM. Además, nuestro objetivo fue evaluar prospectivamente la relación entre los niveles de AAG en LM y el desarrollo de EC en la descendencia de las madres participantes. Como no existe un método estandarizado para analizar AAG en LM, desarrollamos un método propio específico para este propósito.

El estudio fue financiado por Unión Europea en el contexto del 7º proyecto Con el apoyo de subvenciones de la Comisión Europea (FP6-2005-FOOD-4B-36383–PREVENTCD), y por el Ministerio Español de Sanidad: FIS PS09/01056.

Parte del contenido de este capítulo, ha sido publicado en: *European Journal of Nutrition*, 2017 (Roca et al., 2017).

## **3.2 Sujetos**

Los sujetos del estudio pertenecen a dos grupos diferentes: por una parte madres de población general, y por otra, madres de sujetos pertenecientes a la cohorte del Proyecto Europeo PreventCD ([www.preventcd.com](http://www.preventcd.com)).

### **3.2.1 *Población general***

Mujeres de población general que se encontraban lactando, y que recogieron 1 muestra de leche durante el primer mes de lactancia, en las que se comprobó que seguían una dieta diversificada incluyendo gluten. Estas madres fueron reclutadas en el Hospital Universitario y Politécnico La Fe de Valencia, entre los años 2009-2010.

- **Criterios de inclusión**

Se incluyeron las mujeres que cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

- Madres de recién nacidos que habían dado a luz en el Hospital La Fe.
- Nacimiento a partir de 37 semanas de gestación.
- **Criterios de exclusión**

Cumplir cualquiera de los siguientes criterios, fue motivo de exclusión:

- Complicaciones maternas o neonatales.
- Patología materna o neonatal que contraindicara la lactancia materna.
- Que la madre siguiera alguna dieta de exclusión.
- Con alergia conocida.

Las muestras de este grupo fueron empleadas para realizar los ensayos preliminares para el desarrollo de los métodos de análisis de anticuerpos en LM.

### **3.2.2 Cohorte Prevent CD**

El estudio PreventCD, en el que se incluyeron en bebés con alto riesgo de desarrollar EC, se trata de un estudio aleatorizado de doble ciego, cuyo principal objetivo era analizar la incidencia de EC a los 3 años, tras la introducción precoz del gluten, entre los 4 y 6 meses, en una cohorte Europea, compuesta por sujetos de 8 países, con riesgo genético, reclutados desde el nacimiento, entre 2007 y 2010, y seguidos prospectivamente, al menos hasta los 3 años. (Hogen et al., 2010; Vriezinga et al., 2014) (Tabla 4).

Los participantes de PreventCD, eran recién nacidos, entre 0 y 3 meses de edad, con riesgo de EC, es decir, con al menos un familiar de primer grado con EC confirmado por biopsia, y HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8 positivos. Se excluyeron los recién nacidos prematuros (<36 semanas) o con síndromes asociados con un mayor riesgo de EC, como la trisomía 21 o el síndrome de Turner.

### **Intervención**

Todos ellos siguieron el mismo protocolo de estudio y seguimiento (Hogen et al., 2010). Se aleatorizaron los sujetos en 2 grupos, el grupo A, recibió 200 mg de gluten vital en polvo (equivalente a 100 mg de gluten inmunológicamente reactivo) diariamente entre los 4 y 6 meses de edad y otro el grupo B recibió placebo (2 g de lactosa en polvo). La aleatorización se realizó de manera informatizada en el departamento de estadística del Hospital Universitario de Leiden (Países Bajos). Después de las 8 semanas de intervención, ambos grupos recibieron la misma cantidad de gluten mediante unas recomendaciones estandarizadas, que se les dio a los padres, utilizando productos regulares disponibles en todos los países: de 6 a 7

meses, recibieron 250 mg de gluten, de 7 a 8 meses, recibieron 500 mg de gluten, de 8 a 9 meses 1000 mg de gluten y de 9 a 10 meses recibieron 1500 mg de gluten. A partir de los 10 meses, los padres no recibieron ningún tipo de recomendación nutricional y se permitió un consumo libre de gluten de acuerdo a los hábitos alimentarios de cada país participante. Este consumo se registró y cuantificó hasta los 36 meses.

### **Seguimiento y evaluación de EC**

La recolección de datos, las mediciones antropométricas y la extracción de sangre en los lactantes fueron realizadas tal y como se describe en la tabla 4. Se realizó un seguimiento de los pacientes que consistió en la evaluación periódica cada 2-3 meses, desde el nacimiento hasta los 3 años, en la que se realizó exploración física (peso, talla, perímetros), evaluación de síntomas característicos de EC y determinación de los niveles de anticuerpos anti-TG2 e IgA total.

A partir de los 3 años, se continuó con un seguimiento periódico anual de aquellos niños cuyos padres mantuvieron el consentimiento. Actualmente, la mayoría de ellos se encuentran en seguimiento en las unidades clínicas correspondientes.

El diagnóstico de EC se realizó según los criterios de la ESPGHAN 1990, indicándose B1 a los sujetos con anticuerpos específicos de EC elevados que además presentaban sintomatología clínica gastrointestinal característica de EC. Pero también, se realizó a los sujetos con síntomas extraintestinales (malabsorción, fallo de medro, talla baja, etc) con niveles de anticuerpos específicos de EC elevados.

En niños asintomáticos, se ofreció la realización de biopsia si tenían: 1) ATG2 positivos en 2 ocasiones en un intervalo de 3 meses, 2) AAG positivos alto (> 50 U/ml) en 3 ocasiones en un intervalo de 3 meses, ó 3) aumentando claramente la AAG positivo en 2 pruebas realizadas en un intervalo de 3 meses (>17 y <50 U/ml para la primera muestra positiva y un aumento de al menos 20 U/ml para la segunda muestra positiva). En niños con síntomas de malabsorción, diarrea crónica y falta de crecimiento, las biopsias se ofrecieron independientemente de la presencia de ATG2 elevado o AAG.

La cuantificación del consumo de gluten se evaluó utilizando cuestionarios de frecuencia de alimentos validados, traducidos y adaptados para su uso en los países participantes, o manteniendo registros de alimentos de 7 días.

Finalmente, todos los casos fueron revisados, discutidos y confirmados por el comité de diagnóstico de expertos del estudio PreventCD.

**Tabla 4.** Cronograma de intervenciones, determinaciones y recogida de muestras realizadas en los niños de cohorte del PreventCD.

Edad en meses	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	18	20	22	24	28	30	34	36	
Aleatorización			X																				
Intervención				X	X	X																	
Incremento pautado gluten							X	X	X	X													
Consumo libre de gluten											X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Registro dietético				X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Muestras de LM	X	X	X	X	X	X	X	X	X														
Medidas antropométricas	X	X	X	X	X	X			X			X			X			X					X
Evaluación clínica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Muestras de sangre	X*			X#		X#			X#			X#			X#			X#					X#

\*De terminación del genotipo HLA; # Marcadores serológicos específicos de EC. Tabla adaptada de (Hogen et al., 2010).

## **Subpoblación de madres de niños de la cohorte de PreventCD**

Las muestras de LM de este estudio, se obtuvieron de una submuestra de madres de la cohorte PreventCD de España (Valencia, Madrid, Reus), Italia y Holanda. Al ser uno de los criterios de inclusión en la cohorte el tener un familiar de primer grado diagnosticado de EC, esta muestra incluye tanto madres con EC que seguían una DSG, como madres no EC con una dieta con gluten (Vriezinga et al., 2014).

- **Criterios de inclusión**

Se incluyeron las mujeres que cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

- Madres que habían dado a luz a partir de la semana 37 de gestación.
- Madres que habían proporcionado 2 o más muestras de LM en diferentes meses de lactancia entre el primer y sexto mes.

- **Criterios de exclusión**

Cumplir cualquiera de los siguientes criterios, fue motivo de exclusión:

- Complicaciones maternas o neonatales.
- Patología materna o neonatal que contraindicara la lactancia materna.
- Déficit de IgA.

La cohorte PreventCD todavía se encuentra en seguimiento, pero el seguimiento y la recopilación de datos de este estudio se cerró el 30 de octubre de 2014, cuando todos los niños de la cohorte habían alcanzado al menos los 4 años de edad.

- **Aspectos éticos**

El estudio PreventCD fue aprobado por el Comité de Ética Médica en cada centro participante y cumplió con las normas de buenas prácticas clínicas (ICH-GCP). El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y se registró en Current Controlled Trials (ICTRP CTRP NTR890). Los participantes firmaron un consentimiento informado escrito, que era un requisito esencial para la inscripción en el estudio. Todas las madres fueron informadas del propósito del estudio y voluntariamente proporcionaron las muestras de LM.

## **3.3 Material**

### **3.3.1 *Muestras de leche materna***

En cada uno de los centros participantes se les dio instrucciones a las madres para que extrajeran la leche manualmente o mediante una bomba de succión, pero siempre

al final de la toma. Las muestras de LM se congelaron a -20°C en el congelador doméstico y se llevaron a cada centro en un plazo de siete días para su almacenamiento a -80°C hasta su análisis. Posteriormente, se enviaron congeladas en hielo seco al laboratorio de la Unidad de Enfermedad Celiaca e Inmunopatología Digestiva en Valencia para su análisis centralizado. Desde allí una alícuota de las muestras de LM se envió a la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología en Madrid.

Las madres de población general recogieron una única muestra de LM madura dentro del primer mes de lactancia.

Las madres del proyecto PreventCD recogieron muestras una vez al mes durante los primeros 6 meses después del nacimiento, la primera muestra fue recogida no antes de los primeros 15 días tras el nacimiento. Se repartió a cada madre 8 tubos etiquetados de 15 ml (dos reservas), para que recogieran, al menos 10 mL de LM al mes. Cada niño/madre tuvo un Número de Identificación Único (NIU) basado en un código de centro y el número de participación del niño para garantizar el anonimato. Para cada muestra se cumplimentaron etiquetas con el NIU y la siguiente información:

- ✓ Fecha de extracción.
- ✓ Momento del día (mañana, tarde o noche) en que se efectúa la extracción.
- ✓ Mes de vida del recién nacido.

### **3.3.2 Registro dietético**

Se realizó un registro alimentario de las madres correspondiente a los 2 días próximos a la extracción de LM (el día anterior y el propio día de la extracción), donde anotaron todos los alimentos ingeridos por la madre lactante de la forma más precisa y detallada posible (cantidad y marca), así como la hora de cada toma.

### **3.3.3 Base de datos ProMISe**

Los datos de los sujetos obtenidos durante el estudio se registraron en la base de datos ProMISe. Esta base de datos común del proyecto PREVENT CD, es una aplicación de gestión de datos basada en la web que utiliza una base de datos central de SQL (Structured Query Language), que es gestionada de manera centralizada por el Departamento de Estadística Médica y Bioinformática del Hospital Universitario de Leiden.

### **3.4 Metodología**

La LM tiene una composición compleja y variada, y el contenido de grasas y proteínas puede interferir, entre ellos, en la detección de anticuerpos. Aunque existen métodos estandarizados para la detección de AAG a nivel sérico, revisando la literatura, no hay un método estandarizado para la determinación de AAG en LM, ni existe ninguna prueba comercial para determinar AAG en estas muestras, por lo que consideramos necesario desarrollar un método propio. Para la cuantificación de la IgA total en muestras de LM utilizamos un kit comercial.

El desarrollo del método y los análisis de AAG e IgA total en LM se realizaron en la Unidad de Investigación de Enfermedad Celiaca e Inmunopatología Digestiva, del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, en Valencia.

#### **3.4.1 Desarrollo del método para la determinación de anticuerpos anti gliadina en leche materna**

Tomando como punto de partida otros ensayos para AAG IgA publicados previamente (Fälth-Magnusson, 1989; Rumbo et al., 1998; Juto & Holm, 1992; Tallería, 1990) y tras la optimización de la separación del suero de la LM, se desarrollaron dos métodos para la detección de AAG: anticuerpos anti gliadina IgA (AAG-IgA) y anticuerpos anti gliadina IgA de tipo secretor (S-AAG). Para ello, realizamos una serie de ensayos con el fin de optimizar diferentes variables utilizando para el desarrollo y la optimización del método, muestras de LM de población general y muestras del estudio del Prevent CD seleccionadas al azar.

##### **3.4.1.1 Preparación muestras LM**

Las muestras almacenadas, tras descongelación a 4°C se homogeneizaron, alicuotaron y almacenaron a -80°C. Para optimizar la preparación de las muestras se realizaron ensayos con LM completa y suero de LM. En cuanto a la preparación del suero, para eliminar el contenido de grasa y los elementos celulares que pudieran interferir con los inmunoensayos, y dado que no hay aceptado un método estándar para este fin, probamos las siguientes variables:

- Velocidad de Centrifugación: 2700, 10000 o 12000g.
- Tiempo de centrifugación: 12 o 15 min.
- Temperatura de centrifugación: 5°C u 8°C.
- Número de centrifugaciones consecutivas: 1 ó 2.

También se analizaron diferentes diluciones de la muestra (1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40) para determinar la dilución de trabajo óptima.

*3.4.1.2 Variación de los diferentes parámetros en los ensayos para la determinación de AAG en LM.*

Tras la optimización de la separación de suero de la muestra, se desarrollaron 2 métodos para la detección de AAG en muestras de suero de LM de diferentes periodos de lactancia. Se llevaron a cabo una serie de experimentos variando los parámetros descritos a continuación:

**1. Variación de la fase de bloqueo**

Para seleccionar el agente bloqueante más apropiado, los pocillos se recubrieron con gliadina y se probaron las siguientes variables: 1% de BSA, 2% de suero de oveja, 2% de leche en polvo desnatada, 2% de TRIS y sin bloqueo.

Se realizaron experimentos para comparar diferentes temperaturas de incubación en la fase de bloqueo (BSA 1%), 37°C y temperatura ambiente (24°C) para optimizar las condiciones del ELISA.

**2. Diluciones del anticuerpo conjugado**

Ensayamos diferentes diluciones de 2 anticuerpos conjugados cuyos antígenos eran la cadena  $\alpha$  o el componente secretor de la IgA humana:

- 1- Anticuerpo anti-IgA humana (específico de cadena  $\alpha$ ), desarrollado en cabra, conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma®) diluido a 1:50, 1:100, 1:250, 1:500 o 1:1000 (v/v)
- 2- Anticuerpo policlonal de clase IgG desarrollado en cabra, contra componente secretor IgA (libre o unido) humano (®) conjugado con peroxidasa. Se probaron las siguientes diluciones 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000 o 1:5000 (v/v).

*3.4.1.3 Determinación de anticuerpos anti-gliadina clase IgA (AAG-IgA)*

Se determinó la presencia de AAG-IgA mediante ELISA:

*Preparación del antígeno:* Gliadina extraída de harina de trigo Scoutt-66 en tampón carbonato-bicarbonato, concentración final 0.1 mg/ml.

*Recubrimiento con antígeno:* se incubó una microplaca de poliestireno de 96 pocillos (ELISA-plate high binding, Greiner) con solución de antígeno, 100 µl/pocillo, durante la noche a temperatura ambiente.

*Bloqueo:* Los sitios de unión no específicos se bloquearon incubando con 200 µl/pocillo de tampón bloqueo durante 1 hora.

*Incubación de muestras:* 100 µl/pocillo de cada muestra se incubaron 1 hora a temperatura ambiente.

*Conjugado:* Se incubó anti-IgA humano de cabra conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) (100 µl/pocillo) durante 30 min a temperatura ambiente.

*Sustrato:* Se añadieron 100 µl/pocillo de una solución que contenía fosfato de p-nitrofenilo (1 mg/ml; Sigma) en tampón de sustrato (1% de tampón carbonato-bicarbonato y 1 volumen de agua destilada, más MgCl<sub>2</sub> 2M).

*Stop:* La reacción se detuvo después de 25 minutos con 100 µl/pocillo de NaOH 0.3 M y la absorbancia se determinó a 405 nm usando un lector de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific).

#### ***3.4.1.4 Determinación de anticuerpos anti-gliadina sIgA (S-AAG-IgA)***

Se determinó la presencia de S-AAG-IgA mediante ELISA:

La preparación del antígeno, el recubrimiento, la fase de bloqueo y la incubación de las muestras siguen el mismo procedimiento que el descrito previamente.

*Conjugado:* El anticuerpo anti-secretor (IgA) de cabra, conjugado con peroxidasa (sigma) se incubó (100 µl/pocillo) durante 30 min a temperatura ambiente.

*Sustrato:* 100 µl/pocillo de una solución que contiene 12 ml de H<sub>2</sub>O; Se añadieron 4 tabletas de OPD (2 mg) (Dako) y 5 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%).

*Stop:* La reacción se detuvo después de 20 min con 100 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol/l y la absorbancia se determinó a 490 nm usando un lector de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific).

Después del recubrimiento, los pocillos se lavaron 4 veces con PBS; y después de la fase de bloqueo, y la incubación las muestras y conjugado, los pocillos se lavaron 4 veces con PBS-Tween. Cada muestra fue analizada por duplicado. Las muestras también se ensayaron en pocillos no recubiertos con antígeno, bloqueados con BSA (1%) como controles individuales. Se analizó una muestra de control positivo en cada experimento y se utilizó su valor para normalizar los resultados. Los pocillos de la primera y la última fila se incubaron con PBS-Tween como blancos.

3.4.1.5 *Índice de absorbancia*

La concentración de AAG se expresó en unidades arbitrarias (UA).

$$IA = \frac{AB \text{ Muestra (media)} - AB \text{ Blanco (media)}}{AB \text{ Estandar (media)} - AB \text{ Blanco (media)}} \text{ UA}$$

3.4.1.6 *Especificidad de los ensayos*

La especificidad de los ensayos se confirmó mediante experimentos de inhibición (con el antígeno específico) y mediante el enriquecimiento de muestras (con AAG).

La especificidad de los ensayos AAG-IgA y S-AAG (o especificidad de anticuerpos) se confirmó mediante preincubación de muestras de LM durante la noche a 4°C con concentraciones crecientes de gliadina: 0, 1, 10 y 100 µg/ml. Las muestras se analizaron tal y como se describió anteriormente para la determinación de AAG-IgA y S-AAG.

Además, la especificidad de los ensayos de AAG-IgA se confirmó enriqueciendo las muestras de LM con suero sanguíneo con altos niveles de AAG (>128 U/ml). Se añadieron concentraciones crecientes de suero diluido 1:100 a las muestras: 0, 2, 4 y 25 µl; y luego se analizaron como se describió anteriormente para la determinación de AAG-IgA.

3.4.1.7 *Estudio piloto en 2 grupos de madres: AAG-IgA y S-AAG*

Con el fin de comprobar el método desarrollado, se realizó un estudio piloto en el que se analizó un pequeño número de muestras de LM, elegidas al azar, tanto de madres con una DN como de madres celíacas con DSG. Todas ellas reclutadas en la Unidad de Gastroenterología Pediátrica Hospital La Fe, y pertenecientes al proyecto europeo Prevent-CD.

3.4.1.8 *Análisis estadístico para el desarrollo del método*

Los datos se resumieron por la media, la desviación estándar, la mediana, el primer y el tercer cuartil en el caso de las variables continuas y por las frecuencias relativas y absolutas en el caso de las variables categóricas. La concordancia entre los diferentes métodos se evaluó utilizando gráficos de Bland Altman y se estimó el sesgo promedio y el 95% de los límites de concordancia para cada comparación por pares. Los logaritmos de los valores de medición se usaron para todas las comparaciones. Dado

que se tomaron medidas repetidas para cada mujer, estas estimaciones se corrigieron de acuerdo con el método propuesto por Bland-Altman (Bland & Altman, 2007).

### ***3.4.2 Método de análisis de anticuerpos anti-gliadina en muestras de leche materna***

La presencia de AAG-IgA se realizó mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) desarrollado en base a los resultados de los experimentos expuestos en el apartado anterior.

- Se recubrieron microplacas de 96 pocillos de fondo plano (ELISA-plate high binding, Greiner®+) con 100 µl/pocillo de gliadina extraída de harina de trigo Scoutt-66 [20] a una concentración de 0,1 mg / ml en carbonato - tampón de bicarbonato (pH 9.6) e incubado a temperatura ambiente durante la noche.
- Después de lavar 4 veces con PBS, los sitios de unión no específicos se bloquearon con 200 µL/pocillo de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% (v/v) en PBS-Tween (Tween-20 al 0.05% (v/v); pH 7.4) durante 1 hora a temperatura ambiente seguido de lavado con PBS-BSA.
- Las muestras se diluyeron a 1:5 (v/v) en BSA 0.5% (v/v) en PBS-Tween y 100 µl/pocillo de cada muestra se incubaron 1 hora a temperatura ambiente.
- Después del lavado, se incubó anti-human IgA (Sigma®) de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma®) a 1:50 en BSA 0.5% (v/v) en PBS-Tween (100 µl/pocillo) durante 30 min a temperatura ambiente.
- El ensayo se desarrolló con 100 µl/pocillo de una solución que contiene fosfato de p-nitrofenilo (1 mg/ml; Sigma®) en tampón sustrato (1 vol. De tampón carbonato-bicarbonato y 1 vol. De agua destilada, más MgCl<sub>2</sub> 2M).
- La reacción se detuvo después de 25 min con 100 µl/pocillo de NaOH 0.3 M y la absorbancia se determinó a 405 nm usando un lector de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific®).

Cada muestra fue analizada por duplicado. Se analizó una muestra de LM de referencia (estándar) en cada experimento y se utilizó su valor para normalizar los resultados. La primera y la última fila de pocillos se incubaron con PBS-BSA como blancos.

La concentración de anticuerpos se calculó en unidades arbitrarias (UA), referidas a una muestra estándar, seleccionadas durante el procedimiento de estandarización (valores medios), después de restar los espacios en blanco.

### **3.4.3 Cuantificación de inmunoglobulina de clase A en leche materna**

Para la determinación de IgA total se utilizó un kit comercial, que estaba validado para diferentes tipos de muestras biológicas, entre ellas la leche humana. Así, se realizó una cuantificación de IgA total (g/l) en suero de leche humana usando el kit ELISA de Bethyl Laboratories® siguiendo las instrucciones del fabricante, que recomiendan utilizar una dilución a partir de 1:10000 para muestras de suero de LM. Previo al análisis, se testó un kit y se ajustó la dilución para nuestras muestras, utilizando muestras elegidas al azar de madres de población general y madres con EC sin consumo de gluten. Finalmente, las muestras de suero de LM se analizaron a una dilución 1:12000; tanto las muestras como la curva patrón de IgA y los blancos fueron analizados por duplicado. Los coeficientes de variación (CV) inter e intraensayo fueron <10%.

### **3.4.4 Análisis estadístico**

Los datos se resumieron por mediana (1er - 3er cuartil) en el caso de variables continuas y por frecuencias relativas en el caso de variables categóricas. Se usaron modelos mixtos lineales para evaluar la asociación de AAG-IgA e IgA total con las variables mes, dieta y ubicación. Se agregó una interacción entre el mes y la dieta a los modelos para permitir diferentes evoluciones en el tiempo para cada grupo (según su dieta). Los individuos se agregaron al modelo como un factor aleatorio para tener en cuenta el diseño de medidas repetidas. La asociación entre los valores de IgA total y AAG-IgA se evaluó mediante la correlación de Pearson. Todos los análisis estadísticos y gráficos se realizaron con R (versión 3.1.2). Los valores P <0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

## **3.5 Resultados y discusión**

### **3.5.1 Método desarrollado para el análisis de anticuerpos anti-gliadina en leche materna**

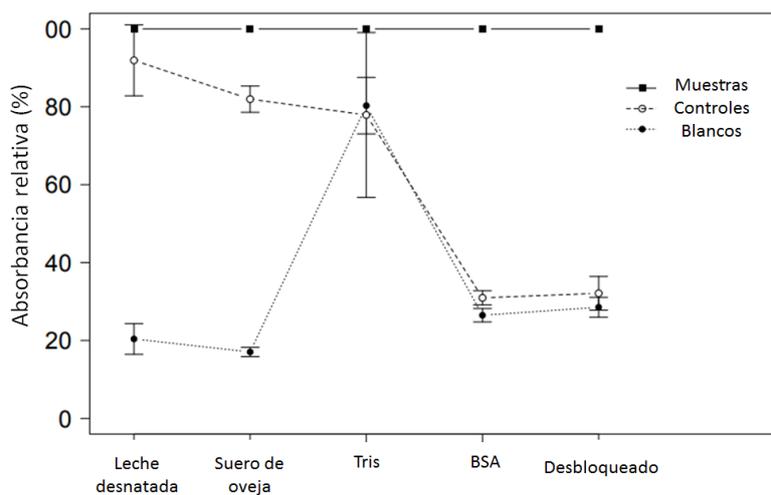
#### **3.5.1.1 Preparación muestras de leche materna**

Se usaron muestras de LM completa (n=10) y fracciones de suero (n=12), y con la leche completa se observaron interferencias (variabilidad intratest>15%). Para evitar la interferencia debida al contenido de grasa y elementos celulares con los inmunoensayos, éstos se eliminaron por centrifugación. Después de probar las variables anteriores descritas, con diferentes diluciones de muestra de suero (1/1, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40), las condiciones óptimas fueron: una centrifugación a 10000 g, 12 min

y 5°C y la dilución óptima 1/5. La doble centrifugación y la velocidad más alta (12000 g) no mejoran los resultados en la detección de AAG-IgA en LM que los obtenidos con una sola centrifugación y 10000 g. Una temperatura de centrifugación más baja (5°C) mantiene las fases de la muestra bien separadas, permitiendo una separación de las diferentes fracciones; facilitando así, la obtención de suero libre de impurezas, siendo la grasa fácil de eliminar, la fracción de suero mayoritariamente clara y el pellet más firme.

**3.5.1.2 *Variaciones del bloqueo***

Para seleccionar el agente bloqueador más apropiado, los pocillos se recubrieron con gliadina, se bloquearon con BSA al 1%, suero de oveja al 2%, leche desnatada en polvo al 2%, TRIS al 2% y desbloqueado, y se ensayó con AAG-IgA (Figura 6). Cuando se usaron leche desnatada o suero de oveja como agentes bloqueadores, se observó una alta absorbancia en los pocillos control, lo que indica que se produjeron uniones no específicas, posiblemente anticuerpos u otros factores presentes en la muestra LM al agente bloqueante, ya que en los blancos no se ve una absorbancia tan alta. Cuando se usó tampón Tris como agente bloqueante, se obtuvo una respuesta relativa similar en los pocillos control y en los blancos, pero esta respuesta fue alrededor del 80% de la respuesta de las muestras, por lo que se descartó como agente bloqueante. Cuando se usó BSA como agente bloqueado, se obtuvo una respuesta relativamente baja, tanto en los controles como en los blancos, con respecto a la respuesta de la muestra. Se observó una respuesta similar en el ensayo no bloqueado, pero con una respuesta un poco más alta y más variable.



**Figura 6.** Absorbancia relativa de diferentes tipos de bloqueos para los ensayos AAG-IgA.

El mismo procedimiento se ensayó para S-AAG con 1% de BSA, 2% de leche desnatada en polvo y 2% de TRIS, y se obtuvieron resultados similares a los de AAG-IgA, sin embargo, en el ensayo sin bloqueo, las respuestas de los blancos fueron incluso mayores que las respuestas de las muestras.

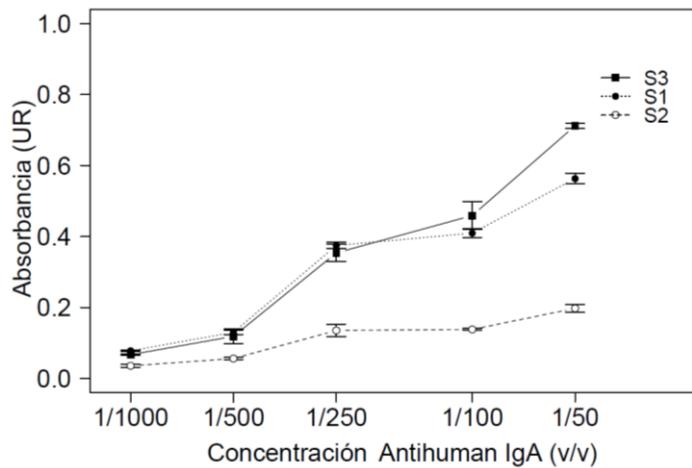
Al realizar la determinación de AAG-IgA no se encontraron diferencias entre las respuestas obtenidas con fase de bloqueo (BSA 1%) o sin bloqueo. Sin embargo, en el ensayo para la determinación de S-AAG, en aquellas pruebas en las cuales no se realizó bloqueo hubo una absorbancia obtenida para los blancos fue incluso superior a la obtenida para las muestras; esto probablemente es debido a que el anticuerpo anti-SC se adhiere fuertemente a las paredes y fondo de los pocillos, por lo que esta prueba deberá incluir una fase de bloqueo.

Para ambos (AAG-IgA y S-AAG) la variabilidad intra ensayo resultó menor utilizando BSA en la fase de bloqueo que realizando los ensayos sin bloquear, por lo que se seleccionó éste como agente bloqueante.

Cuando comparamos diferentes temperaturas de incubación, 37°C y temperatura ambiente (24°C) en la fase de bloqueo (BSA 1%) en los ensayos para ambos métodos, no encontramos diferencias en los resultados, por lo que los análisis se realizaron a temperatura ambiente.

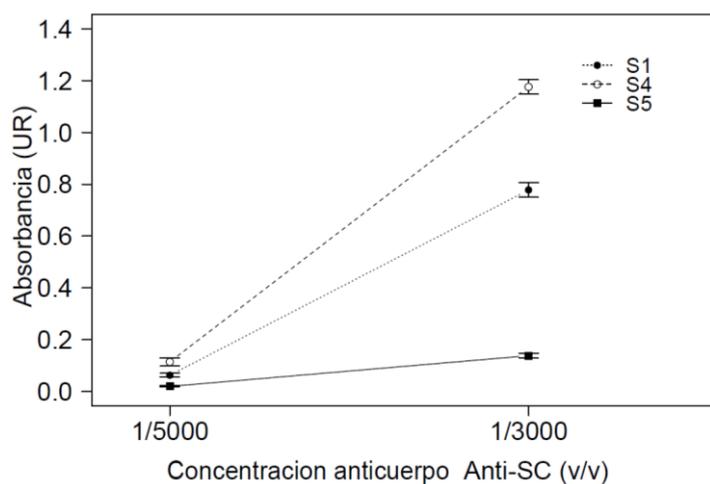
#### *3.5.1.3 Diluciones del anticuerpo conjugado*

Se realizó en muestras de suero de LM la determinación de AAG-IgA con diferentes diluciones del anticuerpo conjugado, anti-IgA humana de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma) diluido 1:50, 1:100, 1:250, 1:500 o 1:1000 (v/v). El anticuerpo conjugado a dilución 1:50 en PTB se estableció como óptimo, ya que permite una buena discriminación entre las muestras; y además, los valores de absorbancia obtenidos estuvieron dentro del rango óptimo de lectura (Figura 7).



**Figura 7.** Absorbancia de tres muestras diferentes de suero de LM (s1, s2 y s3) con incremento de las concentraciones de anti-IgA humana para el ensayo AAG-IgA.

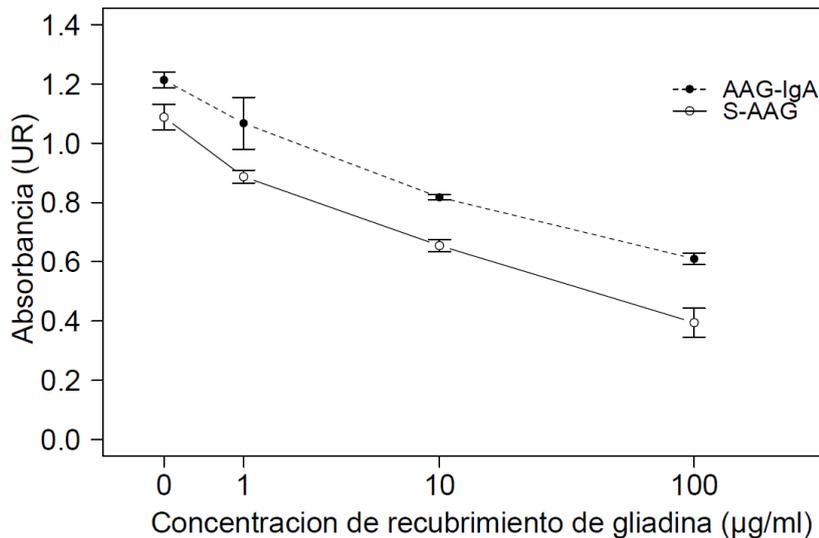
Se realizó la determinación de S-AAG-IgA en muestras de suero de LM con diluciones diferentes de anticuerpo anti-componente secretor (IgA) conjugado con peroxidasa diluido 1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000 o 1:5000 (v/v). La dilución 1:3000 en PTB del anticuerpo se estableció como óptima, ya que permite una buena discriminación entre las muestras; y además, los valores de absorbancia obtenidos estuvieron dentro del rango óptimo de lectura (Figura 8).



**Figura 8.** Absorbancia de tres muestras de suero de LM (s1, s4 y s5) con incremento de las concentraciones de anti-Secretory Component (IgA) antibody concentrations en el ensayo S-AAG.

*3.5.1.4 Especificidad de los ensayos*

En los ensayos de especificidad de AAG-IgA y S-AAG, la detección de AAG disminuye de forma lineal al aumentar la concentración de gliadina utilizada en la etapa de preincubación (Figura 9).



**Figura 9.** Absorbancia de muestra de suero de LM incubada con diferentes concentraciones de gliadina, y después analizada para AAG-IgA and S-AAG.

La especificidad de los ensayos de AAG-IgA se confirmó enriqueciendo las muestras de LM con un suero sanguíneo que contenía altos niveles de AAG; se observó una alta correlación entre el volumen de suero utilizado y los niveles de detección de AAG en las muestras de LM enriquecida con suero; es decir, la detección de AAG aumenta al aumentar la concentración de suero sanguíneo utilizado para enriquecer cada muestra (spiking).

Además, los resultados de ambas pruebas fueron altamente reproducibles entre los experimentos y entre muestras duplicadas: el coeficiente de variación (CV) intraensayo fue <10% e interensayo <12%.

*3.5.1.5 Estudio piloto en 2 grupos de madres: AAG-IgA y S-AAG*

Se analizaron 46 muestras de LM de 23 madres pertenecientes al proyecto europeo Prevent-CD: 12 madres con una dieta normal (DN) y 11 madres celíacas con dieta sin gluten (DSG), reclutadas en la Unidad de Gastroenterología Pediátrica Hospital La Fe de Valencia. Las muestras correspondían a diferentes meses de lactancia (1-6 m).

Todas las mujeres dieron a luz a término entre la semana 37 y 42 de gestación y ninguna de ellas tenía deficiencia selectiva de IgA. En la tabla 5 se describe la media, la desviación estándar y la mediana de los resultados obtenidos al analizar AAG-IgA y S-AAG para ambos grupos de madres. Los valores S-AAG muestran una mayor variabilidad, especialmente para las madres con una DSG.

**Tabla 5:** Edad y resultados (UA) de AAG de 2 grupos de mujeres.

	<b>Dieta Normal (n=12)</b>	<b>Dieta sin Gluten (n=11)</b>
	<b>Media (SD)</b>	<b>Media (SD)</b>
	<b>Mediana [1<sup>er</sup> – 3<sup>er</sup> cuartil]</b>	<b>Mediana [1<sup>er</sup> – 3<sup>er</sup> cuartil]</b>
<b>Edad (años)</b>	34.4 (3.3)	32.8 (3.3)
	34.0 [32.0, 36.0]	33.0 [30.3, 35.0]
<b>AAG-IgA</b>	1.04 (0.65)	1.14 (0.75)
	0.90 [0.60, 1.36]	0.88 [0.66, 1.28]
<b>S-AAG</b>	0.88 (0.97)	1.22 (1.64)
	0.68 [0.35, 1.02]	0.66 [0.35, 1.19]

Como conclusión de los experimentos realizados, en los que estudiamos diferentes variables, se establecieron las condiciones metodológicas óptimas para los 2 ensayos, que posteriormente utilizamos para los análisis en LM en el presente estudio. La diferencia entre los dos métodos desarrollados fue, fundamentalmente, el anticuerpo utilizado: específico para la pieza secretora o contra la cadena alfa. Casi todas las IgA en LM son de tipo secretor, por lo que cuando se cuantifica la AAG-IgA, equivaldría a cuantificar la S-AAG. Dado que ambos métodos mostraron resultados equivalentes, solo analizamos en detalle los resultados obtenidos para AAG-IgA.

### **3.5.2 Determinación de inmunoglobulinas de clase A y anticuerpos anti-gliadina en leche materna**

#### **3.5.2.1 Características de la muestra**

Se analizaron un total de 218 muestras de leche madura, obtenidas a partir de las 2 semanas siguientes después del parto, procedentes de 41 madres con DN y 42 madres con un diagnóstico de EC y que seguían una DSG. Todas las madres con EC

habían estado siguiendo la DSG durante más de 2 años (Tabla 6), lo que fue confirmado mediante el RD.

Por otra parte, en España, el consumo de gluten las madres con DN fue cuantificado, obteniendo una media de  $8.43 \pm 1.9$  g/día (media $\pm$ SD). En Holanda, la media de consumo fue más elevado, i. e, de  $17 \pm 3.8$  g/día. Respecto al resto de madres con DN, se confirmó que no realizaban ninguna dieta de exclusión y que consumían gluten diariamente.

Además, las muestras recogidas durante la lactancia exclusiva representan el 87% de las madres con EC y el 90% de las muestras de madres no celíacas. Todas las mujeres dieron a luz entre la semana 37 y 42 de gestación. Ninguna mujer refirió tener una deficiencia selectiva de IgA.

**Tabla 6:** Características de 83 madres con y sin enfermedad celíaca (EC) de Valencia, Reus, Madrid, Nápoles y Leiden. Los p-valores se han obtenido a partir de los modelos mixtos lineales ajustados para evaluar las diferencias entre madres EC y no EC.

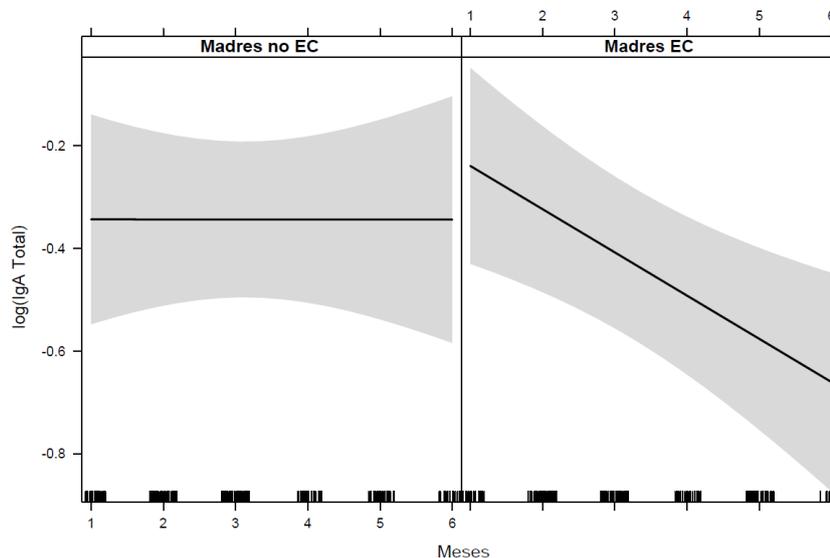
		Valencia (23/57)		Reus (20/47)		Madrid (7/19)		Nápoles (14/39)		Holanda (19/56)	
(Madres/muestras)		No-EC (12/28)	EC (11/29)	No-EC (13/30)	EC (7/17)	No-EC (2/5)	EC (5/14)	No-EC (4/11)	EC (10/28)	No-EC (10/30)	EC (9/26)
Número de muestras <sup>a</sup>	Mes 1	3	4	6	2	0	3	1	3	8	6
	Mes 2	8	6	4	4	1	3	1	6	9	7
	Mes 3	8	7	6	4	1	4	2	7	9	7
	Mes 4	5	4	5	3	1	1	2	5	2	1
	Mes 5	2	5	6	1	1	2	3	4	2	3
	Mes 6	2	3	3	3	1	1	2	3	0	2
Edad en años. Media (rango)		35.2 (30-40)	32.7 (28-38)	34.6 (28-41)	34.1 (28-39)	34.5 (33-36)	33 (30-37)	32.3 (31-34)	31.4 (25-41)	33.8 (27-41)	33 (31-37)
Paridad (nºde mujeres)	Primípara	0	8	0	2	0	0	0	5	1	1
	Múltipara	12	3	13	5	2	5	4	5	9	8
IgA total (g/l)	Mediana (1st, 3rd Q)	0.67 (0.55, 0.92)	0.79 (0.56, 0.94)	0.65 (0.53, 0.72)	0.87 (0.60, 1.32)	0.71 (0.62, 0.81)	0.72 (0.59, 1.02)	0.78 (0.66, 1.00)	0.48 (0.32, 0.66)	0.77 (0.51, 1.35)	1.00 (0.70, 1.23)
	P-valor	0.18		0.054		0.11		0.027 <sup>1</sup>		0.13	
AAG-IgA (UA)	Mediana (1st, 3rd Q)	1.1 (0.85, 1.91)	0.68 (0.49, 0.82)	0.63 (0.44, 0.91)	1.33 (0.74, 1.97)	1.01 (0.76, 1.26)	1.02 (0.82, 1.62)	1.02 (0.67, 1.36)	1.28 (0.82, 1.48)	1.28 (0.76, 1.46)	0.85 (0.64, 1.01)
	P-valor	0.13		0.13		0.93		0.78		0.88	

<sup>a</sup> Número de muestras recogidas en diferentes meses de lactancia en los 2 grupos. <sup>1</sup>Encontramos una diferencia significativa entre las madres EC y no-EC en Nápoles.

3.5.2.2 *Análisis de IgA en leche materna*

Los valores de IgA total en LM variaron entre 0.3 y 1.4 g/l (rango recortado), la mediana fue de 0.668 g/l y el 1er y 3er cuartil fue 0.482 y 0.86 g/l, respectivamente. En general, el contenido en de IgA en LM fue similar en madres con DN o DSG. Para las madres con DN, la mediana de IgA fue de 0.679 g/l y el 1er y 3er cuartil fue 0.53 y 0.93 g/l, respectivamente, y para las madres con DSG 0.657 g/l y el 1er y 3er cuartil fue 0.45 y 0.93 g/l, respectivamente. Solo las madres italianas con DN tuvieron unos niveles de IgA en LM estadísticamente más altos, en comparación con aquellas madres que seguían una DSG ( $p=0.027$ ).

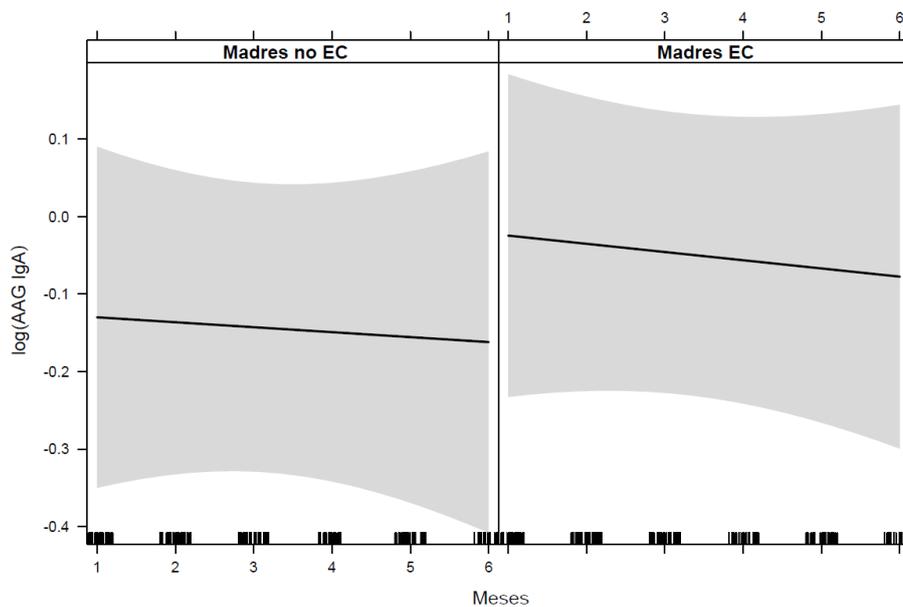
Existe una interacción estadísticamente significativa entre la variable DSG con la variable mes ( $p=0.048$ ), esto significa que los niveles totales de IgA en ambos grupos de madres evolucionan de manera distinta. Se observa una marcada disminución en el contenido de IgA en las madres con EC a lo largo de los meses de lactancia, pero en las madres no-EC con DN los niveles se mantienen estables desde el primer mes de lactancia (Figura 10). Esta diferencia no se vio afectada por el país de origen ( $p=0.73$ ) (Anexo 1). Por otra parte, no hubo diferencias significativas en los niveles de IgA total entre madres primíparas y multíparas ( $p=0.26$ ).



**Figura 10.** Gráfico de efectos (Effects plot) del modelo de regresión lineal mixto que muestra la evolución de IgA total en LM en el tiempo, de madres con DN (izquierda) y DSG (derecha) durante los primeros 6 meses de lactancia. Las áreas sombreadas representan intervalos de confianza del 95% para la tendencia lineal.

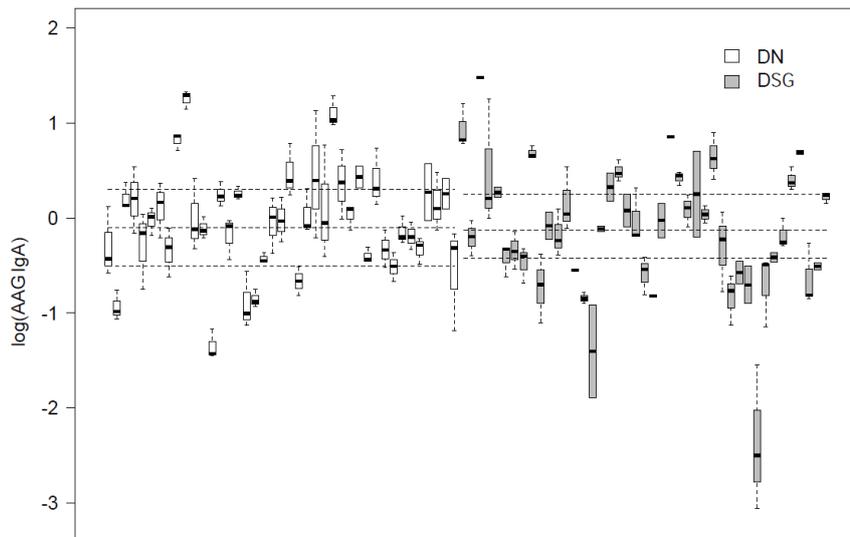
**3.5.2.3 Análisis de AAG en leche materna**

El contenido de AAG-IgA en LM fue similar en las madres con DSG y en las madres con DN (Tabla 6). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los distintos países. En ambos grupos de madres, los niveles de AAG-IgA evolucionan de forma similar a lo largo del tiempo con una ligera disminución a lo largo de los meses de lactancia ( $p=0.91$ ) (Figura 11). Esta evolución en los niveles de AAG-IgA fue similar en todos los países ( $p=0.55$ ) (Anexo 2) y entre las madres primíparas y multíparas ( $p=0.21$ ).



**Figura 11.** Diagrama de efectos del modelo de regresión lineal mixto que muestra la evolución de AAG-IgA en LM en el tiempo, en madres con DN (izquierda) y DSG (derecha) durante los primeros 6 meses de lactancia. Las áreas sombreadas representan intervalos de confianza del 95% para la tendencia lineal.

La variabilidad de los valores AAG-IgA de diferentes muestras de la misma madre (0.08) fue significativamente menor que entre muestras de madres diferentes (0.33) ( $p < 0.001$ ) (Figura 12); tal y como muestra el gráfico, los valores de AAG-IgA observados para cada madre, representados como la dispersión dentro de cada diagrama de caja, están claramente menos dispersos que los valores de AAG-IgA entre diferentes madres. Además, se puede observar que los valores para AAG-IgA en el grupo de madres con DN, presentan menor variabilidad que en el grupo de madres EC con DSG.

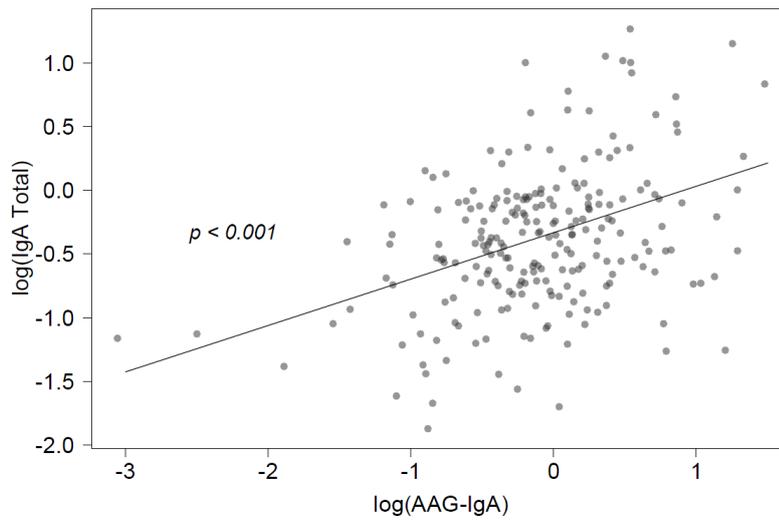


**Figura 12.** Variabilidad de la concentración de AAG-IgA en LM en muestras de madres con DSG (n=112) y DN (n=106). Cada caja representa datos de una madre. Las líneas discontinuas representan el primer cuartil, la mediana y el tercer cuartil (todas las muestras del estudio).

#### 3.5.2.4 Comparación de los niveles totales de IgA y AAG-IgA

Tanto los niveles de IgA total como de AAG-IgA en LM siguen un patrón longitudinal similar en la mayoría de las madres, sin embargo, este no es el caso en el 36% de ellas. Este fenómeno fue independiente de la dieta de las madres.

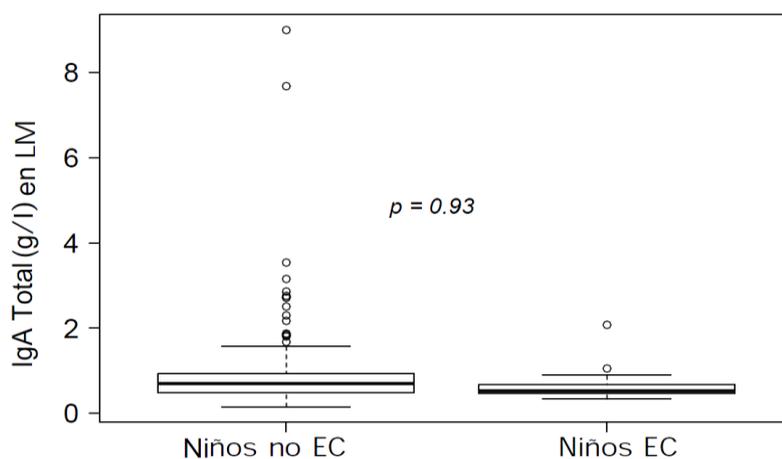
Tanto en madres con DN como DSG, se encontró una asociación significativa entre los niveles de IgA total y AAG-IgA en LM ( $p < 0.001$ ) (Figura 13).



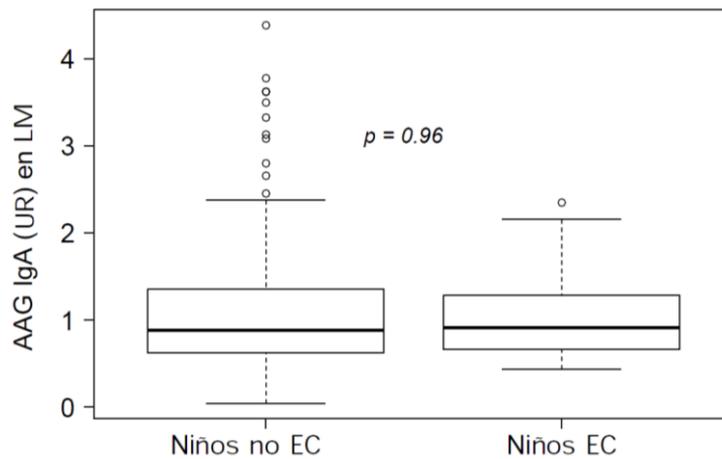
**Figura 13.** Diagrama de dispersión que muestra la asociación entre los valores AAG-IgA e IgA Total. Se ha agregado una tendencia lineal estimada con modelado lineal al gráfico.

**3.5.2.5 Relación entre IgA total y AAG en LM y el desarrollo de EC**

Un total de 9 niños de las 83 madres desarrollaron EC antes de los 6 años de edad, 3 niños de Italia (2 de madres EC y 1 madre no-EC) y 6 niños de España (5 madres con EC y 1 no-EC). Los niveles de IgA total y AAG en LM fueron similares entre las madres cuyos hijos desarrollaron EC y aquellos cuyos hijos no desarrollaron la enfermedad (Figura 14 y Figura 15).



**Figura 14.** Diagrama de cajas que muestra los niveles de IgA total (g/l) en la LM de madres de niños que desarrollaron o no EC. El de P-valor se calculó usando un modelo mixto lineal con IgA total como variable de respuesta y desarrollo de EC como predictor.



**Figura 15.** Diagrama de cajas que muestra los niveles de AAG-IgA (UA) en la LM de madres de niños que desarrollaron o no EC. El P-valor se calculó usando un modelo lineal mixto con AAG-IgA como variable de respuesta y desarrollo de EC como predictor.

### 3.5.3 Discusión

Tras la optimización de la metodología para la separación del suero de las muestras de LM; se desarrollaron dos métodos para detectar AAG-IgA y otro S-AAG, probando diferentes variables (diluciones de muestra, dilución de conjugados, etc.). El desarrollo de ambos métodos se hizo usando muestras, seleccionadas al azar, de LM de madres celíacas con una DSG y madres no celíacas con DN de diferentes meses de lactancia, con el fin de obtener un método suficientemente sensible para detectar valores en ambos casos. Dado que ambos métodos mostraron resultados equivalentes, solo los resultados obtenidos mediante el método de determinación de AAG-IgA se incluyeron en el estudio.

Se han encontrado AAG presentes en muestras de LM en diferentes meses de lactancia, tanto de madres con EC que siguen una DSG, como de madres que no son EC y siguen una dieta que contiene gluten. Los resultados muestran que la dieta no es un factor clave que influya en la presencia de AAG en LM. Concretamente observamos que, aunque no haya exposición al antígeno (gliadina) durante el embarazo, la lactancia e incluso en meses y años previos, la secreción de anticuerpos frente a gliadina todavía se produce en la LM.

Estudios previos han reportado altos niveles de AAG-IgA en calostro y LM en madres que no son celíacas y que siguen una dieta que contiene gluten (Fälth-Magnusson et al., 1989; Juto & Holm, 1992; Ozcan et al., 2000; Rumbo, et al., 1998). Ozcan et al. mostraron que el consumo diario de pan en dos grupos con diferente nivel socioeconómico no afectaba los niveles de AAG en LM (Ozcan et al., 2000), pero en su estudio, todas las madres consumían gluten en mayor o menor medida. Nuestros hallazgos sobre la disminución de AAG-IgA a lo largo de los meses de lactancia están de acuerdo con los resultados descritos por Ozcan et al., dentro de los primeros 45 días de lactancia (Ozcan et al., 2000). Por otra parte, nuestros resultados en madres EC con DSG son consistentes con los hallazgos de Mascart-Lemone en madres africanas que no consumen pan o cualquier otra fuente de gluten (Mascart-Lemone et al., 1991).

Las madres con exclusión temporal de proteínas de huevo o leche de vaca de su dieta, todavía secretan anticuerpos contra estas proteínas en su LM, y se han encontrado niveles similares de estos anticuerpos en calostro de madres con una dieta restrictiva y de madres sin exclusiones dietéticas (Fälth-Magnusson, 1989). Sin embargo, en estas publicaciones, el período de restricción dietética antes del muestreo de LM fue de alrededor de 3 meses, que es más corto que la duración de la DSG en nuestras madres con EC. Otros estudios recientes, encontraron caseína y beta-lactoglobulina IgA en LM de madres con dieta exenta de leche de vaca, pero en este caso, se encontraron niveles más bajos de anticuerpos específicos en madres con dietas restrictivas en comparación con aquellos que consumieron leche (Järvinen et al., 2014).

Nuestros hallazgos son concordantes con los estudios de Hanson (Hanson & Korotkova, 2002), que muestran que los linfocitos de memoria migran del intestino a la glándula mamaria y que las experiencias antigénicas previas de la madre, se reflejan en los anticuerpos secretados en su LM (Hanson et al., 1999). Por lo tanto, la presencia de AAG en muestras de LM de madres que siguen una DSG durante años, refleja la existencia de una memoria inmunológica de larga duración, independiente de la dieta de las madres.

Aunque las madres celíacas de nuestro estudio seguían una DSG, no podemos excluir la posibilidad de transgresiones dietéticas; sin embargo, debemos tener en cuenta el alto nivel de motivación de las mujeres con EC para adherirse a la DSG durante el embarazo y la lactancia. Por otro lado, los alimentos etiquetados como productos sin gluten no pueden exceder las 20 ppm de gluten, pero pueden contener hasta 19 ppm de gluten y estos productos pueden consumirse a diario y en cantidades diferentes;

por lo tanto, podríamos especular que las madres con una DSG estricta todavía ingieren pequeñas cantidades de gluten que son capaces de provocar una respuesta inmunológica, y por tanto producir y secretar AAG en LM, y así, también se podría explicar los niveles similares de AAG en madres EC y no EC. Sin embargo, se necesita una investigación más profunda en esta línea, para poder evaluar la cantidad mínima de gliadina capaz de producir un estímulo antigénico, tanto a nivel de sérico, como a nivel de la glándula mamaria.

Además, en el presente estudio, las madres con DN, tenían al menos un miembro de la familia diagnosticado con EC ya que era este un criterio indispensable para participar en el estudio PREVENTCD; esto puede influir en su dieta, puesto que nuestro grupo ha demostrado que en las familias con un individuo celiaco el consumo de gluten diario es inferior en comparación con la población general (Lerma et al., 2014; van Overbeek, et al., 1997).

La LM es rica en IgA, que es sintetizada por células B presentes en las glándulas mamarias que han migrado desde el intestino de la madre. La unión de IgA dimérica a un componente secretor (Järvinen et al., 2014), permite que la sIgA sobreviva a través del tracto gastrointestinal, y proporciona inmunoprotección pasiva contra antígenos de microorganismos y alimentos. De acuerdo con la literatura, en el calostro inicial, la sIgA aparece en alta concentración, pero en los niveles de leche madura se reducen a 0.5-1.5 g/l (Hanson & Korotkova, 2002). En nuestro estudio, los niveles de IgA (mediana: 0.67 g/l) en LM son similares a los datos publicados anteriormente.

Encontramos que el contenido de IgA en LM fue similar en madres EC y no EC. Sin embargo, existe una marcada tendencia a una disminución gradual en las madres con EC a lo largo de los meses, mientras que permanece estable en las madres que no padecen EC desde el primer mes de lactancia en adelante; se necesitan estudios adicionales para determinar la razón y la relevancia potencial de esta disminución. En estudios previos, se encontraron niveles significativamente menores de IgA total y anticuerpos frente a proteínas de leche de vaca en calostro y LM de madres cuyo bebés desarrollaron alergia a proteínas de leche de vaca (Järvinen et al., 2000). Una publicación reciente, determinó que madres españolas con EC tenían niveles más bajos de S-IgA en LM en el primer mes de lactancia en comparación con las madres sanas. Los autores sugirieron que una concentración disminuida de IgA en la LM podría reducir la protección de la mucosa del lactante y favorecer la intolerancia al gluten (Olivares et al., 2015), ya que la producción alterada de sIgA se ha considerado un factor de riesgo para el desarrollo de trastornos gastrointestinales como la EC (Wang et al., 2014); además la reducción en sIgA intestinal parece contribuir a la

disbiosis de la microbiota y favorecer la respuesta proinflamatoria (Maynard et al., 2014). Sin embargo, nuestros resultados no son directamente comparables con los de Olivares et al., ya que nuestros datos son longitudinales (medimos la evolución en el tiempo) y los de Olivares et. al comparan los datos solo en el primer mes de lactancia.

Por otro lado, la asociación encontrada entre los niveles de IgA total y AAG en los dos grupos de madres, sugiere que la producción de AAG en LM dependería del mismo mecanismo que regula la producción de IgA total por la glándula mamaria.

No encontramos ninguna relación entre los niveles totales de IgA o AAG en LM y el desarrollo de EC en la descendencia, pero como solo 9 niños desarrollaron EC durante el estudio, el tamaño de la muestra es demasiado pequeño para tener valor estadístico una afirmación definitiva. Por otra parte, 7 de los 9 que desarrollaron EC durante los 4 años primeros años de vida, tenían madres diagnosticadas de EC que seguían una DSG; sin embargo, en la cohorte global del PreventCD con 80 niños diagnosticados de EC, no se encontró relación entre el desarrollo temprano de EC y la presencia de ésta en uno o los dos padres, (Vriezinga et al., 2014).

En conclusión, AAG-IgA estuvieron presentes en LM de madres EC tras una DSG, así como en madres que no son EC y siguen una DN. Si la presencia de estos anticuerpos tiene algún papel en la promoción de la adquisición de la tolerancia al gluten en el lactante, nuestro estudio muestra que, a este respecto, los hijos de madres con EC estarían en igualdad de condiciones que los niños de madres que no padecen EC. Además, se observa una marcada tendencia a una disminución gradual en el contenido de IgA total en la leche materna de madres con enfermedad celiaca a lo largo de los meses, mientras que permanece estable en las madres que no padecen enfermedad celiaca. Esta disminución de las concentraciones de IgA en la leche materna podría reducir la protección a nivel de la mucosa del lactante.

***4. ESTUDIO DE LA PRESENCIA DE  
GLUTEN EN LECHE MATERNA***

---

## **4 Estudio de la presencia de gluten en leche materna**

### **4.1 Antecedentes y justificación**

Los lactantes amamantados tienen una composición de microbiota intestinal diferente en comparación con los niños alimentados con fórmula, pudiendo tener este hecho una influencia en el riesgo de desarrollar EC (Palma et al., 2012). Junto a esta hipótesis, otras teorías podrían explicar el papel de la lactancia materna en el desarrollo de la EC. La posible presencia de péptidos de gluten en la LM (Chirido et al., 1998; Troncone et al., 1987) podría promover una tolerancia oral al gluten, en los niños amamantados. Sin embargo, si ésto fuera así, en el caso de las madres celíacas con una DSG, este efecto no aparecería, ya que su LM no contendría péptidos de gluten. Teniendo en cuenta esta hipótesis, sería muy interesante cuantificar el contenido de gluten en la LM y las variaciones a lo largo de las diferentes etapas de la lactancia, así como la diferencia que existiría entre madres celíacas con una DSG y madres no celíacas con DN.

Hasta la fecha, pocos estudios que han abordado la determinación de gluten en LM, mostrando concentraciones de gliadinas presentes muy bajas, del orden de ng/ml (Chirido et al., 1998; Troncone et al., 1987). Los métodos empleados en los análisis han sido distintos y, por ello los resultados obtenidos en cada uno son difícilmente comparables. Además, la LM es una muestra compleja de analizar debido a los compuestos que la forman. La gran cantidad y diversidad de componentes, que además varían con el transcurso de la lactancia, el alto contenido en grasa, y el amplio rango dinámico de las cerca de 1000 proteínas diferentes que se pueden identificar, dificulta en gran medida el análisis. Además, la relación entre el gluten y los anticuerpos frente al gluten en LM y el desarrollo de EC en niños apenas ha sido investigada. Los únicos estudios disponibles en este campo, de hecho, han encontrado fracciones de gliadina y AAG en la LM de mujeres que seguían una dieta con gluten (Chirido et al., 1998; Fälth-Magnusson, 1989; Troncone et al., 1987). Sin embargo, los resultados sobre gliadina en LM son discrepantes y difíciles de interpretar.

Por ello, el objetivo de este estudio es determinar la presencia de péptidos de gluten en muestras de LM, en un grupo de madres con DN, así como en un grupo de madres celíacas que siguen una DSG. (Mena et al., 2013).

## **4.2 Sujetos**

Los sujetos del estudio pertenecen a dos grupos diferentes: por una parte madres de población general, y por otra, madres de sujetos pertenecientes a la cohorte del Proyecto Europeo PreventCD ([www.preventcd.com](http://www.preventcd.com)).

### **4.2.1 Población general**

Mujeres de población general que se encontraban lactando, y que recogieron 1 muestra de leche durante el primer mes de lactancia, en las que se comprobó que seguían una dieta diversificada incluyendo gluten. Estas madres fueron reclutadas en el Hospital Universitario La Paz de Madrid entre los años 2009-2010.

- **Criterios de inclusión**

Se incluyeron las mujeres que cumplieron los siguientes criterios de inclusión:

- Madres de recién nacidos que habían dado a luz en el Hospital La Paz.
- Nacimiento a partir de 37 semanas de gestación.

- **Criterios de exclusión**

Cumplir cualquiera de los siguientes criterios, fue motivo de exclusión:

- Complicaciones maternas o neonatales.
- Patología materna o neonatal que contraindicara la lactancia materna.
- Que la madre siguiera alguna dieta de exclusión.
- Con alergia conocida.

Las muestras de este grupo fueron empleadas para realizar los ensayos preliminares para el desarrollo de los métodos de análisis de gliadina en LM.

### **4.2.2 Subpoblación de madres de niños de la cohorte de PreventCD**

Los análisis realizados en LM en este estudio, se basan en la submuestra de madres de niños de la cohorte de PreventCD de Valencia, descrita en el punto 3.2.2.

### **4.3 Material**

#### **4.3.1 *Muestras de leche materna***

Las muestras de LM pertenecientes a la cohorte de sujetos de Valencia fueron congeladas y enviadas en hielo seco desde la Unidad de Enfermedad Celiaca e Inmunopatología Digestiva hasta la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología en Madrid (Apartado 3.3.1.). Las muestras de LM de población general pertenecientes al Hospital Universitario la Paz de Madrid fueron congeladas y enviadas en hielo seco a la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología en Madrid.

#### **4.3.2 *Registro dietético***

Se realizó un registro alimentario de las madres de 2 días próximos a la extracción de LM (el día anterior y el propio día de la extracción), donde anotaron todos los alimentos ingeridos por la madre lactante de la forma más precisa y detallada posible (cantidad y marca), así como la hora de cada toma.

#### **4.3.3 *Base de datos ProMISe***

Los datos de los sujetos obtenidos durante el estudio se registraron en la base de datos ProMISe, tal y como se describe en el punto 3.3.3.

### **4.4 Metodología**

Todos los análisis fueron realizados en la Unidad de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España) entre los años 2009 y 2017. Los métodos utilizados para la detección de gluten en LM fueron:

#### **4.4.1 *ELISA-R5 competitivo y sándwich***

Tanto el ELISA-R5 tipo sándwich (Mendez et al., 2005; Valdes et al., 2003) como el ELISA-R5 competitivo (Mena et al., 2012), son caseros y están basados en el anticuerpo monoclonal R5. Este anticuerpo reacciona con el epítipo QQPFP y otros patrones de aminoácidos tales como QLPFP, LQPFP y QQQFP, presentes en las secuencias tóxicas de gliadinas, hordeínas y secalinas para pacientes celíacos (Kahlenberg et al., 2006; Osman et al., 2001). En estudios previos se había constatado que el anticuerpo R5 es muy sensible a estas prolaminas (Valdes et al., 2003).

Previo al análisis se realizó una extracción de los péptidos mediante el método UPEX (Mena et al., 2012). Se realizaron también pruebas con etanol y con solución cocktail (La descripción de los protocolos de extracción se encuentra en el Anexo 3). Se realizaron también pruebas con etanol y con cocktail, pero los resultados fueron similares.

El límite de detección del ELISA sándwich es de 1.5 ng/ml permite el análisis de gliadina desde 0.15 mg/100 g alimento/muestra (i.e. 1.56 ppm gliadinas o 3.2 ppm gluten). Se detalla el protocolo del mismo en el anexo 4. (Valdes et al., 2003)

Para el método ELISA competitivo el límite de detección es de 0.36 ng/ml de gliadinas y el límite de cuantificación de 1.22 ng/ml de gliadinas. Se detalla el protocolo del mismo en el anexo 5. (Mena et al., 2012).

La diferencia principal entre el sistema de tipo competitivo y el sándwich radica en que en el tipo competitivo es suficiente un solo epítipo de los reconocidos por el anticuerpo R5 para poder cuantificar las proteínas de gluten, mientras que con el sándwich se necesitan al menos dos de estos epítipos. Por tanto, para muestras hidrolizadas, o en aquellas en las que no se conoce la composición, pero se espera que pueda haber péptidos, como es el caso de las muestras de LM, es más adecuado el sistema tipo competitivo, ya que sirve para cuantificar tanto gluten intacto como hidrolizado. Sin embargo, el sistema tipo sándwich es más robusto y no se ve tan afectado por los interferentes tanto como el competitivo, por lo que al tratarse de muestras complejas y con gran variedad de componentes que pueden interferir en el análisis, se probarán ambos métodos en los primeros experimentos.

En base a la literatura previa (Chirido et al., 1998; Troncone et al., 1987), la cantidad esperada de gluten en muestras de LM es menor (del orden de ng/ml) en comparación con alimentos sin gluten ( $\mu\text{g/ml}$ ). Por ello, para ambos métodos se utilizaron diluciones más concentradas de las muestras, que la dilución habitual utilizada para el análisis de alimentos sin gluten. Además, se analizaron muestras de LM enriquecidas, con una cantidad conocida de gliadinas, y se compararon con el control (gliadinas con PBS-tween 0.05% -BSA 1% Buffer), para evaluar la recuperación de gliadinas y descartar que los resultados positivos se debieran a componentes interferentes presentes en las muestras, considerando que se usan diluciones muy bajas para estas muestras. El patrón de gliadinas utilizado es una mezcla de 28 variedades de trigo representativas de los países europeos productores de trigo, del *Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity* (2 mg/ml en 60% etanol/agua [v/v]).

#### **4.4.2 *Gluten-Tec® ELISA***

Se trata de un Kit de ELISA que emplea el anticuerpo monoclonal alpha-20 (Mujico et al., 2012), que reacciona frente a epítomos de gliadinas que estimulan las células T en individuos con EC.

#### **4.4.3 *R5 western blot***

Para el análisis mediante Western Blot R5, después de la electroforesis en gel SDS-PAGE unidimensional, las proteínas se electrotransfirieron a la membrana de PVDF (difluoruro de polivinilideno), se incubaron con el anticuerpo R5 conjugado con peroxidasa (R5-HRP) y se inmunodetectaron utilizando quimioluminiscencia mejorada (GE HealthCare), tal como se ha descrito anteriormente (Valdes et al., 2003).

El Western blot es una técnica inmunológica que permite la confirmación del contenido en gluten en los alimentos mediante el análisis de cada una de las proteínas presentes en la muestra a través de anticuerpos monoclonales que reaccionan con dichas proteínas.

En la técnica de Western blot, una vez realizada la electroforesis de las proteínas en un gel SDS-PAGE, se realiza la transferencia de las proteínas separadas desde dicho gel a una membrana adsorbente porosa adecuada, que permite la adsorción de dichas proteínas, lo cual da lugar a que las proteínas transferidas constituyan una réplica del gel. Para realizar dicha transferencia se emplea un método electroforético (denominado electroblotting) en el que, empleando la fuerza de un campo eléctrico, las proteínas son eluidas del gel y se mueven desde el gel hasta la membrana, donde quedan inmovilizadas en su matriz adsorbente. Para ello, se emplea una cubeta con el buffer de transferencia, colocándose el gel y la membrana en contacto entre soportes de espuma con electrodos a cada lado. La membrana empleada para este fin, fue de PVDF (Polyvinylidene).

Antes de realizar la inmunodetección de las proteínas con el anticuerpo R5 monoclonal, se realizó el bloqueo de los sitios de unión de la membrana que no fueron ocupados por proteínas, para evitar inespecificidades en la detección. Para ello se incubó la membrana con leche en polvo desnatada, que constituye una mezcla de proteínas inerte a la reacción con el anticuerpo. También se chequeó la eficiencia de la transferencia antes de continuar con el estudio con anticuerpos. Para ello, en la electroforesis se incluyó un patrón de peso molecular preteñido de manera que al transferir el gel a la membrana se pudo visualizar que cada una de las proteínas que constituyen el marcador aparecieron correctamente en la membrana, lo cual

presupone que el resto de proteínas que estuvieran contenidas en el gel también se transfirieron correctamente.

#### **4.4.4 Técnicas proteómicas**

##### **Digestión de proteínas**

La cantidad de proteína total en las muestras fue determinada empleando el kit de cuantificación de proteínas Pierce 660nm protein assay (Thermo). Previo a la digestión, las proteínas de cada muestra fueron precipitadas por el método metanol/cloroformo. Para la digestión, 20 µg de los pellets de proteínas fueron resuspendidos y desnaturalizados empleando 20 µl del buffer 7 M Urea/2M Thiourea/100mM TEAB, pH 7.5, reducidas con 2 µL de 50mM Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP, AB SCIEX), pH 8.0, a 37°C durante 60 minutos and seguido por alquilación mediante 1 µL de 200mM cysteine-blocking reagent (methyl methanethiosulfonate (MMTS, Pierce) durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente las muestras se diluyeron hasta 120 µl para reducir la concentración de guanidina con 50mM TEAB. Las digestiones se iniciaron añadiendo el enzima tripsina de grado secuenciación (Sigma-Aldrich) a cada muestra en ratio 1/20 (w/w), y se incubaron a 37°C durante toda la noche en un agitador. Las muestras digeridas fueron evaporadas hasta sequedad empleando un concentrador a vacío.

##### **Cromatografía líquida y análisis por espectrometría de masas**

Los péptidos digeridos de cada muestra se limpiaron y desalaron usando los discos de tipo C18 Stage-Tips Empore 3M (Sigma-Aldrich). De cada muestra se tomó 1 µg de péptidos digeridos y se sometieron a una cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas 1D-nano LC ESI-MS/MS (Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometric), usando un sistema de nano-cromatografía Eksigent Technologies nanoLC Ultra 1D plus (SCIEX, Foster City, CA, USA) acoplada al triple cuadrupolo de alta velocidad Triple TOF 5600 mass spectrometer (SCIEX) con una fuente Nanospray III. La columna analítica empleada tenía una fase reversa basada en sílice Acquity UPLC® M-Class Peptide BEH C18 Column (Waters Corporation, Milford, MA, USA). La columna de atrapamiento fue una columna de tipo C18 Acclaim PepMap™ 100 (Thermo-Fisher Scientific Inc.), con un diámetro de partícula de 100 µm x 2 cm, 5 µm, tamaño de poro de 100 Å, conectada on-line con la columna analítica. La bomba de carga empleó una solución de ácido fórmico al 0.1 % en agua a un flujo de 2 µl/min. La nano-bomba empleó un flujo de 250 nL/min y funcionó bajo condiciones de elución en gradiente. Los péptidos se separaron

empleando un gradiente de 250 min desde un 2% a un 90% de fase móvil B (fase móvil A: 2% acetonitrilo (Scharlab S.L), 0.1 % ácido fórmico (Sigma-Aldrich); fase móvil B: 100 % acetonitrilo, 0.1 % ácido fórmico). El volumen de inyección empleado fue de 5 µl.

Los datos del análisis fueron adquiridos empleando un voltaje de ionspray de 2300 V, gas inerte 35, temperatura 150, gas de la fuente iónica 25, y potencial 150 V. Para la adquisición independiente de los datos se realizaron escaneos de datos de MS durante 0.25 segundos en el rango de masas de 350-1250 Da seguidos de 35 escaneos MS/MS de 100 milisegundos en el rango de masas de 100-1800.

### **Análisis de los datos proteómicos y búsqueda de secuencias**

Los datos de espectrometría de masas fueron obtenidos empleando el programa PeakView v2.2 Software (SCIEX) y fueron exportados como archivos de tipo “mgf” (Mascot generated files), que fueron empleados para lanzar las búsquedas empleando el motor de búsqueda Mascot Server v2.5.1 (Matrix Science, London, UK) frente a una base de datos conjunta que incluía la base de datos de Homo sapiens (UniProtKB/SwissProt), así como las bases de datos correspondientes a los cereales trigo, cebada, centeno y avena (Triticum, Hordeum, Secale y Avena, respectivamente) también de la base de datos pública de UniProtKB/SwissProt.

Los parámetros de búsqueda empleados fueron los siguientes: metililación en Cisteína como modificación fija y oxidación de la metionina como modificación variable. Ambas modificaciones se producen de forma habitual durante el procesamiento de las muestras, al incluir los pasos de digestión alquilación y reducción de las proteínas. La tolerancia de masa a nivel de péptido establecida fue de 25 ppm y de 0.05 Da para las masas de los fragmentos. Además, se contempló la posibilidad de que existieran 1 o 2 puntos de corte para tripsina no realizados como variable. Solo los péptidos con un score individual igual o superior a 20 en la puntuación establecida por el motor empleado en las búsquedas, se consideraron como fiables y se tuvieron en cuenta a la hora de asignar las diferentes proteínas correctamente identificadas.

## **4.5 Resultados y discusión**

### **4.5.1 *ELISA R5 sándwich y competitivo***

#### **4.5.1.1 *Análisis de muestras de LM en población control***

Se procedió a analizar, tanto por ELISA-R5 sándwich como por ELISA-R5 competitivo, 30 muestras de LM de 30 madres con DN, pertenecientes a población general. La edad media de las madres fue de 31.3 años, rango 28-41 años.

Se obtuvieron valores por debajo del límite de cuantificación por ELISA-R5 sándwich y entre 20 y 75 ng/ml por ELISA-R5 competitivo.

**Tabla 7.** Niveles de gliadinas obtenidos mediante análisis por **ELISA-R5 sándwich y competitivo** en 30 muestras de LM de madres con DN. Los valores corresponden a la media de las diluciones 1:8 y 1:16 de la muestra y se expresan como ng/ml de gliadinas.

Muestra	ELISA-R5 Sandwich	ELISA-R5 Competitivo
LP1	<1.5	42.63±6.16
LP2	<1.5	21.35±8.66
LP3	<1.5	57.96±8.60
LP4	<1.5	41.03±0.79
LP5	<1.5	33.09±9.09
LP6	<1.5	74.55±10.56
LP7	<1.5	49.07±14.21
LP8	<1.5	31.41±4.36
LP9	<1.5	29.97±5.38
LP10	<1.5	20.13±5.61
LP11	<1.5	73.09±7.59
LP12	<1.5	70.38±24.70
LP13	<1.5	34.59±7.11
LP14	<1.5	27.45±4.91
LP15	<1.5	20.39±7.41
LP16	<1.5	33.92±8.43
LP17	<1.5	72.96±10.70
LP18	<1.5	24.04±6.15
LP19	<1.5	21.30±5.29
LP20	<1.5	28.06±7.16
LP21	<1.5	20.27±4.53
LP22	<1.5	27.79±4.60
LP23	<1.5	36.88±9.32
LP24	<1.5	57.41±11.26
LP25	<1.5	73.18±11.01
LP26	<1.5	26.88±6.51
LP27	<1.5	49.01±20.02
LP28	<1.5	36.11±11.12
LP29	<1.5	40.33±13.24
LP30	<1.5	35.88±10.15

4.5.1.2 Análisis de una muestra de LM con y sin adición de una cantidad conocida de gliadinas.

Para comprobar que los resultados de los análisis anteriores no se ven afectados por posibles interferentes presentes en la LM, se empleó una muestra al azar del proyecto Prevent-CD y se analizó por ELISA-R5 sándwich y competitivo. Aunque a priori se espera que las gliadinas puedan estar presentes en la muestra en forma hidrolizada, y por tanto, el sistema de elección sería el competitivo, el sistema tipo sándwich es más robusto y no se ve afectado tan fácilmente por los interferentes tanto como el competitivo, ya que, en este tipo de ELISA el anticuerpo R5 de captura está fijado a la placa de ELISA y el anticuerpo R5 conjugado no entra en contacto directamente con las muestras. A esta muestra, además, se le adicionó una cantidad conocida de gliadinas para comprobar si se conseguía recuperar la cantidad de este valor control. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

En el análisis ELISA-R5 competitivo el resultado fue positivo, mientras que el resultado del análisis ELISA-R5 sándwich fue negativo (por debajo del límite de cuantificación, es decir 1.5 ng/ml) (Tabla 8).

**Tabla 8.** Análisis de una muestra de LM sin enriquecer y enriquecida con 140 ng/ml de gliadinas por ELISA-R5 competitivo y sándwich. Concentración de gliadina [ng/ml].

Muestra	ELISA-R5 competitivo	ELISA-R5 sándwich
Gliadinas (control) (140 ng/ml)	139 ± 2	135 ± 5
Leche materna	67 ± 26	<1.5
Leche materna enriquecida	405 ± 112	91 ± 8

Los resultados de la muestra enriquecida, en la que por ELISA competitivo se recupera una cantidad mayor de gliadina que la que se le adiciona, sugieren que algunos componentes encontrados en la LM podrían interferir con el análisis ELISA, por lo que al usar el sistema competitivo el resultado parece estar sobreestimado, mientras que con el sándwich estaría por debajo del valor esperado. Varios factores podrían contribuir al resultado negativo encontrado al usar el ELISA tipo sándwich:

(a) las gliadinas presentes en la LM están altamente hidrolizadas o incluso desamidadas y no es posible cuantificarlas completamente usando un ELISA tipo sándwich,

(b) las gliadinas están presentes en fragmentos de suficiente longitud para ser detectados por el sistema tipo sándwich, pero están presentes en una concentración menor que el límite de cuantificación de la técnica,

(c) las gliadinas no se detectan debido a la presencia de interferentes en la LM.

**4.5.1.3 *Análisis comparativo del contenido en gliadinas en muestras de LM de madres celíacas y no celíacas***

Con el fin de determinar si se observa alguna diferencia en las muestras en ambos grupos de madres, se realizaron varias pruebas en las 11 muestras de LM de madres celíacas y no celíacas del estudio. El análisis de proteínas en leche se suele realizar solamente en la fracción de suero, pero se analizó también la fracción completa que incluye la grasa, para descartar que las gliadinas presentes puedan estar unidas a alguna lipoproteína, o bien que durante la precipitación se puedan eliminar infravalorando, por tanto, su presencia. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado, en el mismo ensayo. Además algunas de ellas se repitieron en días y ensayos diferentes, comprobándose una variabilidad interensayo elevada de entre 20% y 50%.

**Tabla 9.** Niveles de gliadinas (media±DS ng/ml), obtenidos mediante análisis por **ELISA-R5 competitivo y sándwich** en muestras de LM: entera/ fracción de suero y enriquecida/no enriquecida con 160 ng/ml de gliadinas, de madres celíacas y no celíacas.

Muestra	EC	ELISA-R5 Competitivo				ELISA-R5 Sándwich		
		LM entera	Fracción de suero LM	LM entera enriquecida	Fracción de suero enriquecido	LM entera	Fracción de suero LM	leche entera enriquecida
1	Si	83±64	ND	671±37	ND	19±2	ND	266±18
2	Si	368±338	ND	743±226	ND	37±22	ND	165±35
3	Si	508±691	ND	410±51	ND	28±24	ND	113±20
4	Si	204±121	ND	724±345	ND	23±11	ND	228±29
5	Si	141±42	ND	1691±652	ND	24±13	ND	190±33
6	No	167±54	ND	ND	ND	< 1.5	ND	137±29
7	No	149±45	ND	1004±120	ND	6±8	ND	136±40
8	No	129±76	39±6	664±64	699±115	21±4	15±4	89±6
9	No	386±94	29±9	615±102	541±78	12±1	11±1	ND
10	No	60±18	35±4	624±69	730±234	< 1.5	< 1.5	ND
11	No	234±146	53±1	225±55	ND	ND	ND	ND

LM: leche materna; ND: No determinado

En la Tabla 9 se puede observar una gran variabilidad entre las medias de una misma muestra en todos los casos, como se refleja en la elevada desviación estándar. También se observan diferencias entre analizar la leche completa o bien solamente la fracción de suero, en concreto mediante ELISA-R5 competitivo, siendo mayor la media del coeficiente de variación en el análisis de LM entera (0.42) que la del suero (0.15) en las muestras 8, 9, 10 y 11. Sin embargo, no se observan estas diferencias al analizar la leche completa o bien solamente la fracción de suero mediante ELISA-R5 sándwich, aunque hay que tener en cuenta que se analizaron pocas muestras en ambas condiciones.

#### **4.5.2 Gluten-Tec® ELISA**

Para descartar que el problema en estos análisis sea debido al anticuerpo R5, se empleó otro kit diferente que emplea otro anticuerpo. Este kit también está diseñado para cuantificar gliadinas en alimentos etiquetados como “sin-gluten”, por lo que, también se ha tenido que emplear una dilución más baja de la utilizada habitualmente en este kit.

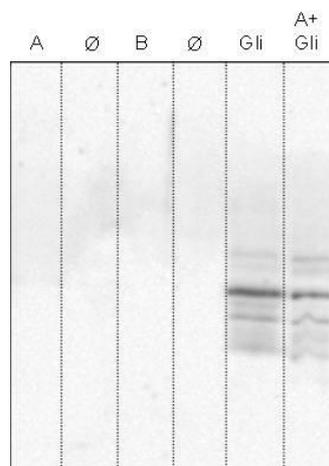
**Tabla 10.** Niveles de gliadinas obtenidos mediante análisis por **Gluten-Tec® ELISA** en muestras de LM con y sin adición de gliadinas (ng/ml).

<b>Muestra</b>	<b>Gliadinas (ng/ml)</b>
140 ng/ml gliadinas (control)	142 ± 1
Leche materna A	409 ± 255
Leche materna A + 140 ng/ml gliadinas	971 ± 325
Leche materna B	335 ± 208

En la Tabla 10 se observa que al emplear este anticuerpo también se presentan interferencias similares a las encontradas con el anticuerpo R5, así, encontramos niveles distintos de gliadinas, pero teniendo en cuenta los resultados del control no se puede afirmar si estos valores son reales o son artefactuales y debidos a la presencia de interferentes. Además no hay una correlación lineal entre las diluciones seriadas empleadas y esto da lugar a los altos valores de desviación estándar observados.

#### 4.5.3 Western Blot R5

Teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos, es necesario confirmar si estos valores son reales o debidos a artefactos. Para ello, se realizó un análisis Western Blot R5, para confirmar la presencia de gliadinas. Con este propósito y para lograr una alta sensibilidad, se realizó una alta concentración de muestra. La leche humana contiene una gran cantidad de proteínas y, por lo tanto, es necesario eliminar las principales proteínas sin perder las gliadinas. Para ello, y para conseguir extraer las gliadinas y eliminar las proteínas mayoritarias de la leche, se realizó una precipitación con etanol al 60%. Al emplear etanol 60%, las proteínas procedentes del gluten permanecen solubles, mientras que el resto de proteínas (y en este caso también las de la LM) son insolubles y por tanto precipitan. Tras el paso de incubación con el etanol 60% se centrifugan las muestras, permaneciendo las proteínas del gluten en solución y el resto de proteínas se descartan al quedar en el pellet. Se pueden observar las bandas de gliadinas reactivas típicas en ambos controles, pero no en las muestras de leche humana (Figura 16).



**Figura 16.** Análisis de gluten en muestras de leche humana (A y B) mediante R5 Western blot. A=67 ng/ml, B=22 ng/ml, Gli=5ng de gliadinas, A+Gli=muestra A+5 ng de gliadinas, Ø=carril vacío.

Esto sugiere que los valores positivos obtenidos con el ELISA-R5 competitivo son falsos positivos o, al menos, están muy sobreestimados, o que las proteínas del gluten presentes en la LM están altamente hidrolizadas, por lo que al realizar la electroforesis en el gel SDS-PAGE los péptidos pequeños se pierden, no pueden ser transferidos a la membrana y por tanto no pueden detectarse mediante Western blot. El western blot R5 no detecta ninguna otra proteína en las muestras de leche humana y sugiere que el

anticuerpo R5 no presenta reacciones cruzadas con otras proteínas presentes en la leche humana.

#### **4.5.4 Técnicas proteómicas**

Se intentó confirmar, mediante técnicas no inmunológicas, que los resultados encontrados se deben a la presencia de gluten y no a interferencias o falsos positivos. Las técnicas proteómicas, al ser de tipo no inmunológico, presentan la ventaja de no depender de un anticuerpo en el análisis, por lo que son muy útiles para confirmar que los resultados obtenidos con los ELISAs son debidos a la presencia de prolaminas y no debidos a interferencias o falsos positivos. No obstante, en este caso presentan la desventaja de que en la muestra de LM hay un gran rango dinámico y hay presentes muchas proteínas y en una mayor proporción que las proteínas de interés para el análisis, por lo que esto hace que el análisis sea complicado. Estudios proteómicos sobre la composición de muestras de leche humana han demostrado que se pueden identificar hasta 976 proteínas humanas diferentes en la LM (Gao et al., 2012).

Para mejorar la sensibilidad, la muestra previamente se concentró y posteriormente se digirieron todas las proteínas con tripsina, siguiendo el protocolo estándar empleado en el análisis proteómico de muestras, aunque, a priori, no es el enzima más adecuado para las prolaminas, ya que, la tripsina presenta pocos puntos de corte para estas proteínas y los fragmentos obtenidos son demasiado largos o pequeños, y no se pueden analizar por completo mediante los espectrómetros de masas. Posteriormente los digeridos trípticos se analizaron mediante los espectrómetros de masas ABi 4800 MALDI-TOF/TOF y nanoLC Ultimate 3000 nanoHPLC acoplado a HCT Ultra trampa iónica. (Anexo 7)

Se realizó una búsqueda frente a las bases de datos disponibles que incluyen las especies de trigo, cebada y centeno, obteniéndose que en la muestra de LM analizada hay presentes algunas proteínas de trigo y cebada, pero los fragmentos trípticos obtenidos no son los habituales de prolaminas. Aunque, previo al análisis, se precipitaron la mayor parte de las proteínas mayoritarias presentes en la LM, algunas permanecían en grandes cantidades, siendo esto un factor limitante al tratar de identificar proteínas minoritarias como las prolaminas.

Por las técnicas proteómicas se detectan las proteínas propias de la leche, pero no se logra identificar inequívocamente péptidos de proteínas de gluten, posiblemente debido a que, en el caso de estar presentes, es en una cantidad tan baja, que por este

tipo de técnicas y debido al amplio rango dinámico respecto a las proteínas mayoritarias, no es posible detectar.

#### ***4.5.5 Discusión***

En 1987 Troncone et al. detectaron, mediante un sistema de ELISA tipo sándwich, niveles de gliadinas entre 5 y 95 ng/ml en 53 de 80 muestras de leche de 53 mujeres con niveles máximos entre 2 y 4 horas tras la ingestión de los 20g de gluten. Posteriormente, en 1998, Chirido et al. observaron, utilizando un sistema de ELISA de inhibición, niveles entre 5 y 1200 ng/ml (media de 178 ng/ml) en 49 muestras de leche y entre 29 y 9000 ng/ml (media de 883 ng/ml) en 14 muestras de calostro. También estudiaron en 6 mujeres sometidas a dieta libre de gluten durante un periodo de 3 días la variación de los niveles de gluten en LM. Los resultados no fueron concluyentes debido a la alta variabilidad de los mismos.

Más recientemente, en 2008, en una tesis doctoral realizada en el Leiden University Medical Center (Hopman, 2008) se determinaron los niveles de gluten en leche obtenida durante 8 meses de lactancia de 23 mujeres con dieta normal y 13 mujeres (12 celiacas y una con síntomas compatibles) con DSG. Para ello utilizaron 4 sistemas de ELISA competitivo, basados en anticuerpos que detectaban epítomos células T estimulantes de  $\alpha$ -gliadinas (dos de ellos),  $\gamma$ -gliadinas y gluteninas de alto peso molecular (HMW-gluteninas). Encuentran niveles de péptidos de gluten, del orden de  $\mu$ g y ng según el método utilizado, en ambos grupos de madres; pero sólo dos de los anticuerpos detectaron diferencias significativas entre madres con DN y DSG. Sin embargo, se ha sugerido la posibilidad de que exista reactividad cruzada de los anticuerpos empleados con alguna proteína de la leche por similitud de secuencia con las proteínas del gluten y que justificaría la detección de un nivel basal de péptidos de gluten en la leche de madres con DSG. Por otro lado, en este estudio no se encontró correlación entre cantidad de gluten ingerido y los niveles detectados en la leche en madres con DN.

En los escasos estudios publicados por otros grupos hasta el momento, se ha encontrado que los niveles de gliadinas presentes en este tipo de muestras son muy bajos, del orden de ng/ml, mientras que los sistemas de ELISA disponibles para analizar gluten en alimentos, aun siendo muy sensibles, solo permiten cuantificar contenidos en gluten del orden de  $\mu$ g/ml (ppm). Además, las características especiales de la LM, hace que el análisis revista una gran complejidad. Así, la gran cantidad y diversidad de componentes, que además varían con el transcurso de la lactancia, el alto contenido en grasa, y el amplio rango dinámico de las cerca de 1000 proteínas

diferentes que se pueden identificar, dificulta en gran medida el análisis. Por otra parte, hay que tener en cuenta que una adecuada extracción y almacenamiento de la muestra, previo a su análisis, es fundamental para conseguir resultados fiables. Además, las proteínas del gluten son digeridas por los enzimas presentes en el tracto intestinal de la madre, sin embargo, esta digestión no es completa, y los péptidos resistentes a la degradación, atraviesan la barrera del intestino; y estos péptidos, llegarían a la glándula mamaria a través del círculo entero mamario, pudiéndose especular que en este trayecto sufren algún proceso de degradación antes de ser secretados.

Mediante los experimentos realizados en este trabajo, queda reflejado que la cantidad de gluten en LM no se podría determinar mediante las técnicas de las que disponemos actualmente, debido bien a que se encuentra en muy pequeñas cantidades (por debajo del límite de cuantificación de los métodos), o bien porque los péptidos se encuentran muy hidrolizados (péptidos de pequeño tamaño) que se eliminarían mediante el método de extracción realizado. La alta variabilidad entre los resultados obtenidos en los análisis y la falta de concordancia en la recuperación de gliadinas en los ensayos de enriquecimiento de las muestras, indica de presencia de interferentes en las muestras de LM que estarían alterando la cuantificación de los mismos. Por todo ello, los resultados obtenidos sobre el análisis del gluten en LM no son concluyentes, siendo necesario realizar más investigación sobre este tema, estudiando los componentes que están interfiriendo en el análisis, así como el mecanismo responsable de la posible cantidad de péptidos de gluten secretada por la glándula mamaria.



*5. ESTUDIO SEROLÓGICO E  
INMUNOLÓGICO EN NIÑOS CON UN  
DIAGNÓSTICO PRECOZ DE  
ENFERMEDAD CELIACA*

---

## **5 Estudio serológico e inmunológico en niños con un diagnóstico precoz de EC**

### **5.1 Antecedentes y justificación**

Como se ha comentado en otros apartados, la evidencia muestra que la producción de autoanticuerpos, como los AAG y anti-TG2 ocurre en la mucosa del intestino delgado (Marzari et al., 2001), y de hecho los autoanticuerpos séricos se cree que son resultado del paso de los mismos desde el intestino. Tanto en adultos, como en población pediátrica, los depósitos de estos anticuerpos anti-TG2 están presentes en el intestino delgado de pacientes celíacos con enfermedad manifiesta, por debajo de la capa epitelial y alrededor de los vasos sanguíneos (Korponay-Szabo et al., 2004; Koskinen et al., 2010; Maglio et al., 2011).

En la cohorte del PreventCD se estudió una población pediátrica con alto riesgo de desarrollar EC, portadores del HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8 y con al menos un familiar de primer grado con EC, lo que favoreció que las biopsias se tomaron muy temprano en el curso de la enfermedad. Éstas fueron realizadas cuando los lactantes mostraron síntomas y/o marcadores serológicos de EC positivos. Debido a que el diagnóstico de EC en la cohorte del Prevent-CD se realiza de forma muy precoz, se decidió profundizar en estudiar la respuesta inmunitaria tanto a nivel serológico, como a nivel de la mucosa intestinal (depósitos subepiteliales de anti-TG2) de los 9 niños, descendientes de las 83 madres del estudio, que desarrollaron EC antes de los 6 años de edad.

### **5.2 Sujetos**

Los sujetos del estudio pertenecen a la cohorte del PreventCD, ya descrita en el punto 4.1.2.

### **5.3 Material**

#### **5.3.1 *Muestras de sangre***

Las extracciones de sangre de los niños pertenecientes al proyecto Prevent CD, se realizaron, según protocolo, al menos siete veces durante los primeros 3 años de edad y luego anualmente a partir de entonces (Tabla 1). El intervalo medio entre la seropositividad confirmada y la realización de biopsias de intestino delgado fue de 2

meses. Las muestras de sangre fueron enviadas desde los centros participantes al laboratorio central (Thermo Fisher Scientific, Freiburg, Alemania), donde las mediciones de los anticuerpos anti-TG2 y AAG en suero se realizaron de forma centralizada.

### **5.3.2 Biopsias intestinales**

Las biopsias se realizaron generalmente mediante endoscopia por vía superior del tubo digestivo, donde se obtuvieron 4 muestras de la segunda parte del duodeno y 2 del bulbo duodenal. En algunos casos la biopsia se realizó mediante cápsula de Watson-Crosby, obteniéndose un solo fragmento. Se conservaron fragmentos de tejido intestinal fijados en parafina para su evaluación histológica, así como fragmentos congelados adecuados para la investigación de depósitos anti-TG2 en los niños a los que se les realizó biopsia intestinal.

### **5.3.3 Base de datos ProMISe**

Los datos de los sujetos obtenidos durante el estudio se registraron en la base de datos ProMISe, tal y como se describe en el punto 3.3.3.

## **5.4 Metodología**

### **5.4.1 Tipaje HLA**

El tipaje HLA para la inclusión de los sujetos en el estudio se realizó en un laboratorio central con muestras de ADN de todos los niños mediante hibridación mediante sonda de oligonucleótidos para DQA1\*05, DQA1\*02:01, DQB1\*02 y DQB1\*03:02 (Eu-Gen Risk test, Eurospital SpA, Trieste, Italia) (Vriezinger et al., 2014).

### **5.4.2 Anticuerpos anti-TG2 y anticuerpos AAG séricos**

Las mediciones de los anticuerpos anti-TG2 y AAG en suero se realizaron de forma centralizada (Thermo Fisher Scientific, Freiburg, Alemania) al menos siete veces durante los primeros 3 años de edad y luego anualmente a partir de entonces. ATG2-IgA y AAG fueron detectados de manera automatizada mediante fluoroenzimoinmunoensayo usando Celikey and Varelisa Gliadin IgA (EliA CeliKey Phadia-thermofisher). Niveles  $\geq 6$  U/ml y  $\geq 17$  U/ml se consideraron positivos, respectivamente, para los anticuerpos indicados.

Los niveles de IgA total sérica se midieron en todos los niños y las muestras de suero con IgA  $< 0,20$  g/l se evaluaron para AAG-IgG y A TG2-IgG usando Varelisa Gliadin y

Celikey IgG (límites a 17 y 10 U/ml, respectivamente) (Thermo Fisher Scientific, Freiburg, Alemania).

#### ***5.4.3 Evaluación histológica de la biopsia***

La valoración histológica de las biopsias se realizó de forma local por los anatomopatólogos de cada hospital, pero, además las muestras de biopsias fueron evaluadas “a ciegas” sin ninguna información clínica, serológica o genética adicional, de forma centralizada en el Departamento de Anatomía Patológica, del Instituto de Patología de Brescia (Italia). La histología de las biopsias se clasificó de acuerdo a la clasificación de Marsh-Oberhuber (Oberhuber et al., 1999).

El diagnóstico de EC se realizó de acuerdo con los criterios de 1990 de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN) (Walker et al., 1990) en presencia de al menos un grado leve de atrofia vellositaria (grado Marsh 3), mientras que la hiperplasia de las criptas sola fue considerado insuficiente para el diagnóstico.

#### ***5.4.4 Depósitos intestinales de anti-TG2***

Al menos uno de los fragmentos de la biopsia se congeló inmediatamente embebido en compuesto OTC (BioOptica, Milán, Italia), se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C. Se evaluó la presencia de depósitos extracelulares anti-TG2 IgA mediante inmunofluorescencia doble siguiendo la metodología descrita por Korponay-Szabó et al. (Korponay-Szabó et al., 2004), que se resume a continuación:

Las muestras eran incubadas 30 minutos en cámara húmeda secuencialmente secciones de 5µm de BI adheridas a portas “SuperFrost” (Dako) con: anticuerpo monoclonal de ratón anti-TG2 dilución (1:200; CUB7402, labvision, Neomarkers), un anticuerpo secundario de conejo anti inmunoglobulina de ratón conjugado con Rodamina (TRITC; 1:120; Dako A/S, Glostrup, Denmark) y posteriormente con anticuerpo policlonal de conejo Anti-IgA humana conjugado con Fluoresceina Isotiocianato (FITC) (1:40; Dako, Glostrup, Denmark). Finalmente, las secciones se enjuagaron varias veces en PBS y se montaron con medio de montaje Vectashield (Lab Vector, Burlingame). Por último se realizó la lectura en microscopio de fluorescencia o microscopio confocal, pudiéndose detectar la presencia de depósitos de anticuerpos de clase IgA frente a TG2, mediante la colocación de anticuerpos IgA (verde) y TG2 (rojo) (anexo 6).

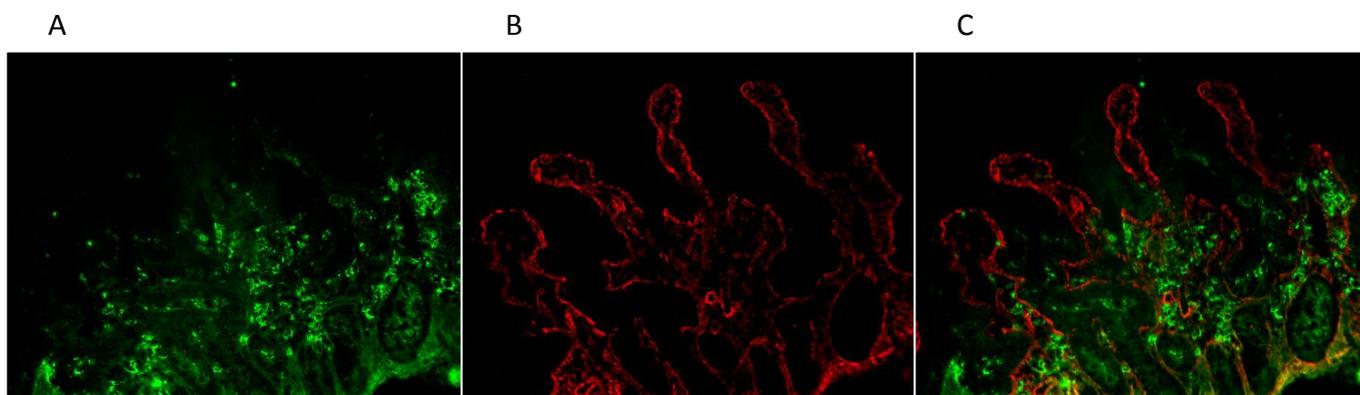
La presencia de depósitos intestinales de anticuerpos anti-TG2 IgA se puede observar formando bandas amarillo-anaranjadas localizadas por debajo de la membrana basal a lo largo de las vellosidades y las criptas y alrededor de los vasos de la mucosa.

Las tinciones se realizaron en 2 laboratorios (Nápoles y Valencia). Los depósitos de IgA de anti-TG2 se graduaron semicuantitativamente, de acuerdo con su intensidad y difusión en las muestras de tejido:

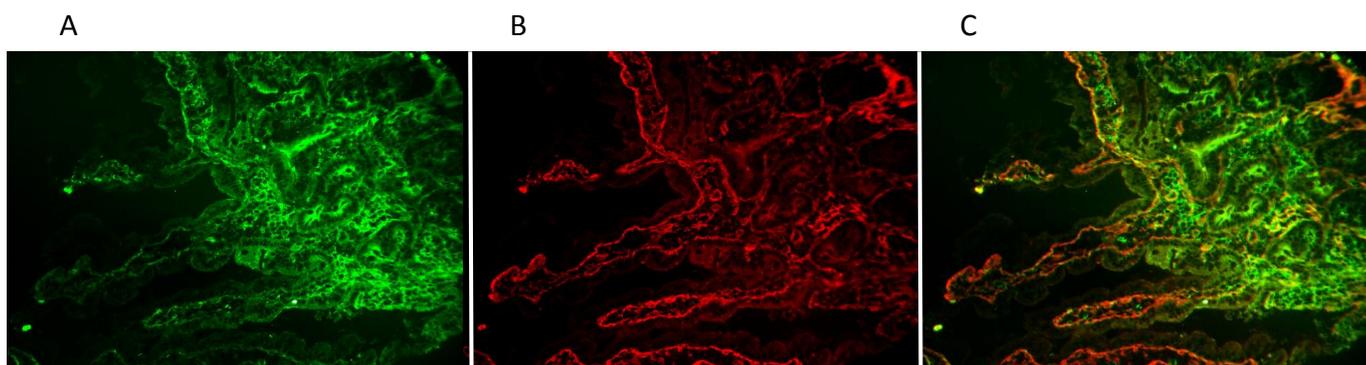
(-) = ausencia de tinción (Figura 17),

(+ débil) = tinción positiva débil con una distribución parcheada (Figura 18), ó

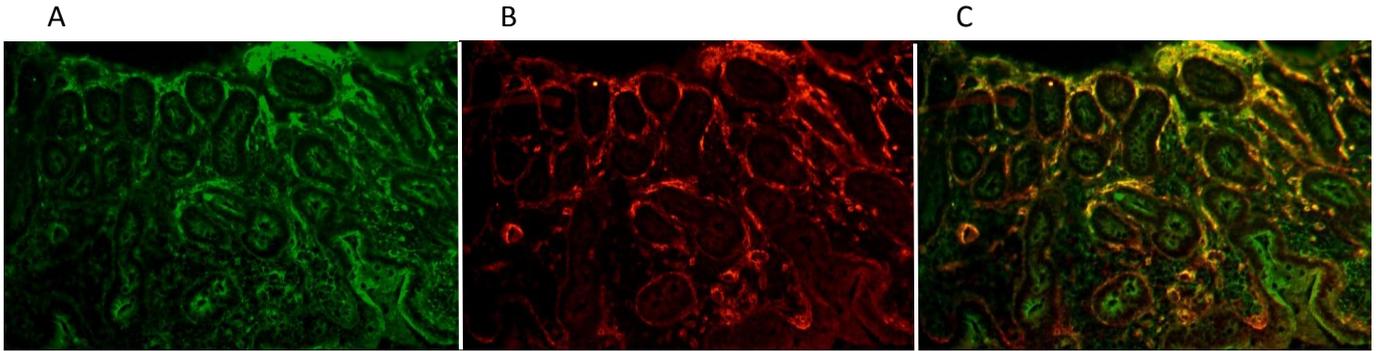
(+) = tinción positiva (Figura 19).



**Figura 17.** Sección de mucosa intestinal con ausencia de depósitos anti-TG2 IgA. (A) Corte bajo luz de longitud de onda de 495nm para la detección de IgA. (B) Corte bajo luz de longitud de onda de 552 nm para la detección de la TG2. (C) Colocalización entre ambas imágenes. (20x).



**Figura 18.** Sección de mucosa intestinal en la que se observan depósitos anti-TG2 IgA con tinción débil y distribución parcheada. (A) Corte bajo luz de longitud de onda de 495 nm para la detección de IgA. (B) Corte bajo luz de longitud de onda de 552 nm para la detección de la TG2. (C). Colocalización entre ambas imágenes, se observan depósitos de anti-TG2 en amarillo, por debajo de la membrana basal del epitelio vellositario, alrededor de las criptas y los vasos. (20x).



**Figura 19.** Sección de mucosa intestinal en la que se observan depósitos anti-TG2 IgA positivos. (A) Corte bajo luz de longitud de onda de 495 nm para la detección de IgA anti-TG2. (B) Corte bajo luz de longitud de onda de 552 nm para la detección de la TG2. (C). Colocalización entre ambas imágenes, se observan, depósitos de anti-TG2 en amarillo, por debajo de la membrana basal del epitelio vellositario, alrededor de las criptas y los vasos. (20x).

## **5.5 Resultados y discusión**

### **5.5.1 Características de la muestra**

Un total de 9 niños (5 niñas y 4 niños), descendientes de las 83 madres que participaron en el estudio de LM, desarrollaron EC antes de los 6 años de edad (Tabla 11), 3 niños de Italia y 6 de España. El diagnóstico de los 9 niños se realizó de manera muy temprana, entre el año y los cuatro años de edad. En todos se realizó BI, al mostrar síntomas y/o marcadores serológicos positivos.

Los 9 niños del estudio, con diagnóstico de EC, recibieron lactancia materna durante un período de entre 3 y 19 meses. De estos 9 lactantes amamantados, cabe destacar que 7 tuvieron madres celiacas, las cuales seguían una DSG, y 2 tuvieron madres sin EC que consumían una DN con gluten. Coincide que estos 2 últimos niños, tuvieron un debut más temprano de la enfermedad, entre el año y los dos años de edad, en comparación con los otros 7, en los que el diagnóstico de EC fue posterior, entre los 2-4 años de edad. Estos resultados son especialmente llamativos, sobre todo considerando que en todos ellos se aplicó el mismo protocolo de seguimiento y despistaje de la EC, sin embargo, el pequeño tamaño de la muestra no permite un análisis estadístico de estos hallazgos.

**5.5.2 Evaluación de resultados histológicos y de determinación de depósitos TG2-IgA en las biopsias intestinales**

De los 9 niños, 8/9 recibieron el diagnóstico definitivo de EC en base a lesión histológica tipo Marsh 3a-c y serología anti-TG2 positiva. Los 8 pacientes presentaron depósitos intestinales anti-TG2 IgA, observándose una banda amarilla gruesa localizada por debajo de la membrana basal, a lo largo de las vellosidades y de las criptas, así como alrededor de los vasos de la mucosa. El paciente restante presentaba una lesión histológica tipo Marsh 3c, pero serología anti-TG2 negativa, junto con clínica sintomática de diarrea y dolor abdominal. Este último paciente, en la que en el momento de la realización de la BI, no se encontraron anti-TG2 a nivel sérico, presentó depósitos de intensidad débil y distribución parcheada.

**Tabla 11.** Características clínicas y de laboratorio de los 9 niños con diagnóstico de EC.

	Origen	Género	Madre EC	Lactancia materna	Edad diagnóstico de EC	HLA	Sintomatología clínica	Clasificación de biopsias	anti-TG2 IgA *	AAG IgA *	Depósitos subepiteliales de anti-TG2
1	Italia	Masculino	Si	Hasta 7 meses	2 años 10 meses	DQ2,5/otro		Marsh 3b	100	26.6	+
2	Italia	Femenino	Si	Hasta 13 meses	4 años y 4 meses	DQ2,5/DQ2,2		Marsh 3c	100	100	+
3	Italia	Femenino	<b>No</b>	Hasta los 14 meses	<b>1 año y 4 meses</b>	DQ2,5/otro	Diarrea, dolor abdominal	Marsh 3c	<b>0.2</b>	<b>7.8</b>	<b>+ débil</b>
4	España	Masculino	Si	Hasta los 19 meses	4 años y 3 meses	DQ2,2/DQ7	Estreñimiento y dolor abdominal	Marsh 3b	128	56	+
5	España	Masculino	<b>No</b>	Hasta los 6 meses	<b>1 año y 10 meses</b>	DQ2,5/DQ7	Diarrea, Distensión abdominal, Vómitos	Marsh 3b	100	100	+
6	España	Femenino	Si	Hasta los 8	3 años y 3 meses	DQ2,2/DQ7	Estreñimiento	Marsh 3a	128	999	+
7	España	Femenino	Si	Hasta los 15 meses	3 años y 4 meses	DQ2,5/otro		Marsh 3b	128	999	+
8	España	Masculino	Si	Hasta los 6 meses	2 años	DQ2,5/DQ2,5	Diarrea, Distensión abdominal	Marsh 3b	100	100	+
9	España	Femenino	Si	Hasta los 3 meses	2 años y 4 meses	DQ2,5/DQ2,2	Diarrea, Distensión abdominal, Otros	Marsh 3c	100	100	+

\*en el momento de la biopsia

### **5.5.3 Discusión**

En nuestro estudio 8/9 niños recibieron un diagnóstico definitivo de EC, en base a una lesión histológica tipo Marsh 3a-c y marcadores serológicos de EC positivos; en todos ellos se pudo observar la presencia de depósitos intestinales anti-TG2, tal y como se describen en trabajos previamente publicados (Korponay-Szabó et al, 2004; Koskinen et al., 2010; Salmi et al., 2010; Tosco et al., 2013). El hallazgo más llamativo es un paciente que en la biopsia, realizada a los 16 meses de edad, presentaba depósitos de anti-TG2 en la mucosa intestinal, pero no se detectaban anti-TG2 a nivel sérico; confirmando la hipótesis de que los autoanticuerpos de EC se depositan en la mucosa del intestino delgado morfológicamente normal, antes de que puedan detectarse en la circulación (Korponay-Szabo, 2004). Por ello la presencia de estos autoanticuerpos a nivel intestinal, refuerza el diagnóstico en casos dudosos, principalmente en EC seronegativa (Kaukinen K et al., 2005; Salmi et al., 2006). Los depósitos en este paciente, tenían una distribución parcheada, y una intensidad más débil que en el resto de los casos, tal y como muestran otros estudios (Salmi et al., 2006), donde los depósitos de anti-TG2 fueron detectables en pacientes con serología de EC negativa (EMA, anti-TG2). Esta distribución parcheada y menos intensa de los depósitos, también se ha encontrado frecuentemente en pacientes con EC potencial (Maglio et al., 2011; Tosco et al. 2008). Por último, podemos atribuir la negatividad de los anti-TG2 séricos en este paciente, a su corta edad, ya que, estudios realizados demuestran que en niños pequeños portadores del HLA DQ2 y/o DQ8 los anticuerpos AAG aparecen en un promedio de 11 meses, antes que los ATG2 y AAE (Lagerqvist, et al., 2008; Simell et al., 2007).

Por otra parte, detectamos depósitos, en la muestra de mucosa intestinal de 2 paciente menores de 2 años (casos 3 y 5), a pesar de que hay descrita una menor sensibilidad de los depósitos anti-TG2 a estas edades. Así, Maglio et al., refieren una sensibilidad de un 73% (Maglio et al., 2011), inferior a la reportada por la mayoría de los autores, que se aproxima al 100%.

En un estudio más amplio realizado en la cohorte del PreventCD, se estudiaron depósitos intestinales anti-TG2 en 62 niños (donde están incluidos los 9 niños de nuestro estudio) de 7 países diferentes. (Borrelli et al., 2017). Tal y como hemos encontrado nosotros, en todos los casos en los que se realizó un diagnóstico de EC, se observó la presencia de depósitos anti-TG2 IgA en estas etapas tempranas.

Igualmente, nuestra experiencia en la determinación de depósitos intestinales de anti-TG2 en población pediátrica con sospecha de EC, corrobora que se pueden encontrar depósitos de forma precoz, tanto en pacientes con anti-TG2 negativa, como en pacientes sin atrofia vellositaria pero con serología positiva (EC potencial), por lo que los depósitos serían útiles como apoyo diagnóstico en estos casos.

Cabe destacar que encontramos más casos de lactantes amamantados que desarrollaron EC, cuyas madres eran celiacas y seguían una DSG (7 niños) en comparación con los lactantes alimentados con LM de madres sin EC y DN (2 niños). A pesar de que 7 de los 9 niños que desarrollaron EC durante los 4 primeros años de vida, eran hijos de madres diagnosticadas de EC que seguían una DSG, en la cohorte global del PreventCD con 80 niños diagnosticados de EC, no se encontró relación entre el desarrollo temprano de EC y la presencia de ésta en uno o los dos padres, (Vriezinga et al., 2014). Además, estos 2 últimos niños de madres con DN, tuvieron un desarrollo más temprano de EC que el resto de niños, lo que podría deberse a que la mucosa del intestino de niños amamantados por madres con DN y consumo habitual de gluten, entrarían en contacto con péptidos de gluten a través de la LM, desde el primer mes de vida. Sin embargo, habría que llevar a cabo este estudio en una serie más amplia para poder establecer conclusiones robustas.

Se confirma en este estudio que los depósitos intestinales de anticuerpos anti-TG2 constituyen un evento precoz en el desarrollo de la respuesta inmunológica responsable de la EC, pudiendo preceder a la aparición de anti-TG2, incluso en lactantes pequeños, por lo que la determinación de depósitos podría ser utilizada como herramienta diagnóstica complementaria a edades tempranas.

## *6. CONCLUSIONES*

---

## **6 Conclusiones**

Partiendo de las hipótesis planteadas, y en base a los resultados obtenidos, podemos concluir que:

- Tras la optimización de la metodología para la separación del suero de las muestras de leche materna, se ha desarrollado un método para la detección de anticuerpos anti-gliadina en leche materna.
- Los anticuerpos anti-gliadina están presentes tanto en la leche materna de madres celiacas tras una dieta sin gluten, como en madres que no son celiacas y siguen una dieta normal, por lo que la dieta no sería un factor clave que influya en la presencia de anticuerpos anti-gliadina en leche materna. Si la presencia de estos anticuerpos tiene algún papel en la promoción de la adquisición de la tolerancia al gluten en el lactante, este estudio muestra que, a este respecto, los hijos de madres con enfermedad celiaca estarían en igualdad de condiciones que los niños de madres que no padecen la enfermedad.
- Existe una marcada tendencia a una disminución gradual en el contenido de IgA total en la leche materna de madres con enfermedad celiaca a lo largo de los meses, mientras que permanece estable en las madres que no padecen enfermedad celiaca. Esta disminución de las concentraciones de IgA en la leche materna podría reducir la protección a nivel de la mucosa del lactante, contribuyendo a la disbiosis y la respuesta proinflamatoria, ambos factores podrían eventualmente favorecer la pérdida de tolerancia al gluten.
- Los resultados obtenidos de los análisis del gluten en leche materna, no son concluyentes, siendo necesarias investigaciones adicionales que estudien los componentes que están interfiriendo en el análisis, así como el mecanismo responsable de la posible cantidad de gluten secretada por la glándula mamaria.
- Confirmamos que los depósitos intestinales de anticuerpos anti-TG2 constituyen un evento precoz en el desarrollo de la respuesta inmunológica responsable de la enfermedad celiaca, pudiendo preceder a la aparición de anticuerpos anti-TG2 a nivel sérico, incluso en lactantes pequeños.

## *7. BIBLIOGRAFÍA*

---

## **7 Bibliografía**

Agostoni, C., Decsi, T., Fewtrell, M., Goulet, O., Kolacek, S., Koletzko, B., Michaelsen, K.F., Moreno, L., Puntis, J., Rigo, J., et al.; ESPGHAN Committee on Nutrition. (2008). Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 46(1): 99-110.

Akobeng, A. K., Ramanan, A. V., Buchan, I., Heller, R. F. (2006). Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. *Archives of Disease in Childhood*, 91(1), 39-43.

Anderson, R.P., Degano, P., Godkin, A.J., Jewell, D.P., Hill, A.V. (2000). In vivo antigen challenge in celiac disease indentifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nature Medicine*, 6(3): 337-42.

Arranz, E., Montalvillo, E., Garrote, J.A. (2012). Inmunopatogenia de la enfermedad celíaca. En Rodrigo L y Peña AS, editores. Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca. p. 123-149. Barcelona, España: OmniaScience.

Aronsson, C. A., Lee, H., Koletzko, S., Uusitalo, U., Yang, J., Virtanen, S. M., Liu E., Lernmark Å., Norris J.M., Agardh D.; TEDDY Study Group. (2016). Effects of gluten intake on risk of celiac disease: A case-control study on a swedish birth cohort. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 14(3), 403-409. e3.

Ascher, H., Krantz, I., Rydberg, L., Nordin, P., Kristiansson, B. (1997). Influence of infant feeding and gluten intake on coeliac disease. *Archives of Disease in Childhood*, 76(2): 113-117.

Auricchio, S., Follo, D., de Ritis, G., Giunta, A., Marzorati, D., Prampolini, L., Ansaldi, N., Levi, P., Dall'Olio, D., Bossi, A., et al. (1983). Does breast feeding protect against the development of clinical symptoms of celiac disease in children? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 2(3): 428-33.

Belton, P. (2005). New approaches to study the molecular basis of the mechanical properties of gluten. *Journal of Cereal Science*, 41(2), 203-211.

Bland, J.M., Altman D.G. (2007). Agreement between methods of measurement with multiple observations per individual. *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 17:571-582.

Borrelli, M., Maglio, M., Korponay-Szabó, I.R., Vass, V., Mearin, M.L., Meijer, C., Niv-Drori, H., Ribes-Koninckx, C., Roca, M., Shamir, R., et al. (2018). Intestinal anti-

transglutaminase 2 immunoglobulin A deposits in children at risk for coeliac disease (CD): data from the PreventCD study. *Clin Exp Immunol.*, 191(3):311-317.

Bourgey, M., Calcagno, G., Tinto, N., Gennarelli, D., Margaritte-Jeannin, P., Greco, L., Limongelli, M.G., Esposito, O., Marano, C., Troncone, R., et al. (2007). HLA related genetic risk for coeliac disease. *Gut*, 56(8):1054-9.

Bouziat, R., Hinterleitner, R., Brown, J.J., Stencel-Baerenwald, J.E., Ikizler, M., Mayassi, T., Meisel, M., Kim, S.M., Discepolo, V., Pruijssers, A.J., et al. (2017). Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science*. 356(6333):44-50.

Brandtzaeg, P. (2002). The secretory immunoglobulin system: regulation and biological significance. In: Isaac C., Davis M., Hanson L.A., Wright A. (eds) Research Agenda for the Millenium: Integrating Population Outcomes, Biological Mechanisms and Research Methods in the Study of Human Milk and Lactation. San Diego: Kluwer Academic/Plenum Publ; 1-16.

Brandtzaeg, P. (2006). The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunology Letters*, 105(2): 127-39.

Bravo, F. (2011). Adherencia e impacto de la dieta sin gluten en niños con enfermedad celíaca. *Revista Chilena De Pediatría*, 82(3), 191-197.

Castaño, L., Blarduni, E., Ortiz, L., Núñez, J., Bilbao, J. R., Rica, I., Martul P., Vitoria J.C. (2004). Prospective population screening for celiac disease: High prevalence in the first 3 years of life. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 39(1), 80-84.

Catassi, C., Fabiani, E., Iacono, G., D'Agate, C., Francavilla, R., Biagi, F., Volta, U., Accomando, S., Picarelli, A., De Vitis, I., et al. (2007). A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(1), 160-166.

Catassi, C., Gatti, S., Fasano, A. (2014). The new epidemiology of celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 59 Suppl 1, S7-9.

Catassi, C., Gatti, S., Lionetti, E. (2015). World perspective and celiac disease epidemiology. *Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 33(2), 141-146.

Catassi, C., Räscht, IM., Fabiani, E., Rossini, M., Bordicchia, F., Candela, F., Coppa, GV., Giorgi, P.L. (1994). Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet*, 343: 200-03.

Cenit, M. C., Olivares, M., Codoñer-Franch, P., Sanz, Y. (2015). Intestinal microbiota and celiac disease: Cause, consequence or co-evolution? *Nutrients*, 7(8), 6900-6923.

Chirido, F.G., Rumbo, M., Añón, M.C., Fossati, C.A. (1998). Presence of high levels of non-degraded gliadin in breast milk from healthy mothers. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 33: 1186-1192.

Cilleruelo Pascual, M.L., Román Riechmann, E., Jiménez Jiménez, J., Rivero Martín, M.J., Barrio Torres, J., Castaño Pascual, A., Campelo Moreno, O., Fernández Rincón, A. (2002). Silent celiac disease: exploring the iceberg in the school-aged population. *Anales Españoles de Pediatría*, 57(4):321-6.

Clemente, M.G., De Virgiliis, D., Kang, J.S., Macatagney, R., Musu, M.P., Di Pierro, M.R., Drago, S., Congia, M., Fasano A. (2003). Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut*, 52 (2): 218-23.

Collado, M.C., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., Sanz, Y. (2009). Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *Journal of Clinical Pathology*, 62(3): 264-9.

Comino, I., de Lourdes Moreno, M., Sousa, C. (2015). Role of oats in celiac disease. *World Journal of Gastroenterology*, Nov 7; 21(41): 11825–11831.

Cong, Y., Feng, T., Fujihashi, K., Schoeb, T.R., Elson, C.O. (2009). A dominant, coordinated T regulatory cell-IgA response to the intestinal microbiota. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (46): 19256-19261.

Crespo-Escobar, P., Mearin, M. L., Hervas, D., Auricchio, R., Castillejo, G., Gyimesi, J., Martinez-Ojinaga, E., Werkstetter, K., Vriezinga, S.L., Korponay-Szabo, I.R., et al. (2017). The role of gluten consumption at an early age in celiac disease development: A further analysis of the prospective PreventCD cohort study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 105(4): 890-896.

Cruz, J.R., García, B., Urrutia, J.J., Carlsson, B., Hanson, L.A. (1981). Food antibodies in milk from Guatemalan women. *Journal of Pediatrics*, 99(4): 600–2.

Decker, E., Engelmann, G., Findeisen, A., Gerner, P., Laass, M., Ney, D., Posovszky, C., Hoy, L., Hornef, M.W. (2010). Cesarean delivery is associated with celiac disease but not inflammatory bowel disease in children. *Pediatrics*, 125: e1433-e1440.

De Andrés, A., Camarero, C., Roy, G. (2015). Distal duodenum versus duodenal bulb: intraepithelial lymphocytes have something to say in celiac disease diagnosis. *Dig Dis Sci.*, 60(4):1004-9.

De Palma, G., Capilla, A., Nadal, I., Nova, E., Pozo, T., Varea, V., Polanco, I., Castillejo, G., López, A., Garrote, et al. (2010). Interplay between human leukocyte antigen genes and the microbial colonization process of the newborn intestine. *Curr Issues Mol Biol.*; 12(1):1-10.

De Palma, G., Nadal, I., Medina, M., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., Sanz, Y. (2010). Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children. *BCM Microbiology*, 10:63.

Di Sabatino, A., Ciccocioppo, R., Cupelli, F., Cinque, B., Millimaggi, D., Clarkson, M.M., Paulli, M., Cifone, M.G., Corazza, G.R. (2006). Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut*, 55 (4): 469-77.

Di Cargo, R., De Angelis, M., De Pasquale, I., Ndagijimana, M., Vernocchi, P., Ricciuti, P., Gagliardi, F., Laghi, L., Crecchio, C., Guerzoni, M.E., et al. (2011). Duodenal and faecal microbiota of celiac children: molecular, phenotype and metabolome characterization. *BMC Microbiology*, 11: 219

Dieli-Crimi, R., Cénit, M.C., Núñez, C. (2015). The genetics of celiac disease: A comprehensive review of clinical implications. *Journal of Autoimmunity*, 64, 26-41.

Dubé, C., Rostom, A., Sy, R., Cranney, A., Saloojee, N., Garritty, C., Sampson, M., Zhang, L., Yazdi, F., Mamaladze, V., et al. (2005). The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk western european populations: A systematic review. *Gastroenterology*, 128 (4), S57-S67.

Dubois, P.C., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K.A., Romanos, J., Curtotti, A., Zhernakova, A., Heap, G.A., Adány, R., Aromaa A, et al. (2010). Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nature Genetics*, 42(4): 295-302.

Ebert, E.C. (2005). IL-15 converts human intestinal intraepithelial lymphocytes to CD94 producers of IFN-gamma and IL-10, the latter promoting Fas ligand-mediated cytotoxicity. *Immunology*, 115 (1): 118-26.

Emilsson, L., Magnus, M. C., Størdal, K. (2015). Perinatal risk factors for development of celiac disease in children, based on the prospective Norwegian mother and child cohort study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 13(5): 921-927.

Fälth-Magnusson, K. (1989). Breast milk antibodies to foods in relation to maternal diet, maternal atopy and the development of atopic disease in the baby. *International Archives of Allergy and Immunology*, 90(3):297-300.

Faria, A.M., Weiner, H.L. (2005). Oral tolerance. *Immunological Reviews*, 206: 232-59

Fasano, A., Berti, I., Gerarduzzi, T., Not, T., Colletti, R. B., Drago, S., Elitsur, Y., Green, P.H., Guandalini, S., Hill, I.D., et al. (2003). Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: A large multicenter study. *Archives of Internal Medicine*, 163(3): 286-292.

Fasano, A., Catassi, C. (2001). Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*, Feb; 120(3): 636-51.

Fasano, A., Catassi, C. (2012). Celiac disease. *New England Journal of Medicine*, 367 (25): 2419-2426.

Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A. (2001). Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*, 97 (1): 14-32.

Gao, X., McMahon, R.J., Woo, J.G., Davidson, B.S., Morrow, A.L., Zhang, Q. (2012). Temporal changes in milk proteomes reveal developing milk functions. *J Proteome Res*, 11: 3897-3907.

Garrote, J.A., Bernardo, D. (2011). La genética de la enfermedad celíaca. En Arranz E y Garrote JA, editores. *Enfermedad celíaca*. p 171-176. Madrid, España: Ergon.

Gatti, S., Rossi, M., Alfonsi, S., Mandolesi, A., Cobellis, G., Catassi, C. (2014). Beyond the Intestinal Celiac Mucosa: Diagnostic Role of Anti-TG2 Deposits, a Systematic Review. *Front Med (Lausanne)*, 2: 1:9.

Gianfrani, C., Auricchio, S., Troncone, R. (2005). Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Immunology Letters*, 99(2): 141-5.

Gibert, A., Espadaler, M., Angel Canela, M., Sanchez, A., Vaque, C., Rafecas, M. (2006). Consumption of gluten-free products: Should the threshold value for trace amounts of gluten be at 20, 100 or 200 p.p.m.? *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 18(11): 1187-1195.

Giersiepen, K., Lelgemann, M., Stuhldreher, N., Ronfani, L., Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, I.R. (2012). Accuracy of diagnostic antibody test for celiac

disease in children: summary of an evidence report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 54: 229-241.

Gonzalez-Galarza, F.F., Christmas, S., Middleton, D., Jones, A.R. (2011). Allele frequency net: A database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Research*, 39: 913-919

Greco, L., Romino, R., Coto, I., Di Cosmo, N., Percopo, S., Maglio, M., Paparo, F., Gasperi, V., Limongelli, M.G., Cotichini, R., et al.. (2002). The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*, 50 (5): 624-628.

Guandalini, S., Discepolo, V., Newland, C., Kupfer, S. (2014). Celiaquía. En Fasano A, editor. *Guía clínica para los trastornos asociados con el gluten*. p 7-40. Barcelona, España: Lippincott Williams & Wilkins.

Godkin, A., Friede, T., Davenport, M., Stevanovic, S., Willis, A., Jewell, D., Hill, A., Rammensee, H.G. (1997). Use of eluted peptide sequence data to identify the binding characteristics of peptides to the insulin-dependent diabetes mellitus susceptibility allele HLA-DQ8 (DQ3.2). *International Immunology*, 9: 905-911.

Greco, L., Auricchio, S., Mayer, M., Grimaldi, M. (1988). Case control study on nutritional risk factors in celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 7(3): 395-9.

Greco, L., Babron, M., Corazza, G., Percopo, S., Sica, R., Clot, F., Fulchignoni-Lataud, M.C., Zavattari, P., Momigliano-Richiardi, P., Casari, G., et al. (2001). Existence of a genetic risk factor on chromosome 5q in italian coeliac disease families. *Annals of Human Genetics*, 65(1): 35-41.

Gujral, N., Freeman, H. J., Thomson, A. (2012). Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. *World Journal of Gastroenterology*, 18 (42): 6036-6059.

Hanson, L.A. (1998). Breastfeeding provides passive and likely long-lasting active immunity. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 81(6): 523-33.

Hanson, L.A., Dahlman-Höglund, A., Karlsson, M., Lundin, S., Dahlgren, U., Telemo, E. (1999). Normal microbial flora of the gut and the immune system. In *Probiotics, other nutritional factors and intestinal microflora* (Ed. 42nd) pp. 217-28

Hanson, L.A., Korotkova, M. (2002). The role of breastfeeding in prevention of neonatal infection. *Seminars in Neonatology*, 7(4): 275–8.

Hanson, L.A., Korotkova, M., Haversen, L., Mattsby-Balzer, I., Hahn-Zoric, M., Silfverdal, S.A., Strandvik, B., Telemo, E. (2002). Breast-feeding, a complex support system for the offspring. *Peadiatr. Int.*, 44:347-52.

Hayat M, Cairns A, Dixon MF, O' Mahony. (2002). Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human duodenum: what is normal? *Journal of Clinical Pathology*. 55: 393-5.

Hill, I.D., Dirks, M., Liptak, G.S., Colletti, R.B., Fasano, A., Guandalini, S., Hoffenberg, E.J., Horvath, K., Murray, J.A., Pivor, M., et al., North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. (2005). Guideline for the diagnosis and treatment of celiac disease in children: recommendations of the North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 40: 1-19.

Hogen Esch, C.E., Rosén, A., Auricchio, R., Romanos, J., Chmielewska, A., Putter, H., Ivarsson, A., Szajewska, H., Koning, F., Wijmenga, C., et al. (2010). The PreventCD Study design: towards new strategies for the prevention of coeliac disease. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 22(12):1424-30.

Holopainen, P., Arvas, M., Sistonen, P., Mustalahti, K., Collin, P., Mäki, M., Partanen, J. (1999). CD28/CTLA4 gene region on chromosome 2q33 confers genetic susceptibility to celiac disease. A linkage and family-based association study. *Tissue Antigens*, 53(5), 470-475.

Hopman, E. (2008). *Gluten intake and gluten-free diet in the Netherlands*. ISBN 978-90-9023381-9.

Howdle, P.D., Corazza, G.R., Bullen, A.W., Losowsky, M.S. (1981). Gluten sensitivity of small intestinal mucosa in vitro: quantitative assessment of histologic change. *Gastroenterology*, 80: 442-50

Hüe, S., Mention, J.J., Monteiro, R.C., Zhang, S., Cellier, C., Schmitz, J., Verkarre, V, Fodil, N., Bahram, S., Cerf-Bensussan, N., et al. (2004). A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*, 21 (3): 367-77

Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I.R., Mearin, M.L., Phillips, A., Shamir, R., Troncone, R., Giersiepen, K., Branski, D., Catassi, C., et al.; ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the

diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2012 Jan; 54 (1):136-60.

Ivarsson, A., Hernell, O., Nystrom, L., Persson, L.A. (2003). Children born in the summer have increased risk for celiac disease. *Journal of Epidemiology and Community health*, 57: 36-9.

Ivarsson, A., Hernell, O., Stenlund, H., Persson, L. A. (2002). Breast-feeding protects against celiac disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(5), 914-921.

Ivarsson, A., Persson, L., Nyström, L., Ascher, H., Cavell, B., Danielsson, L., Dannaeus, A., Lindberg, T., Lindquist, B., Stenhammar, L., et al. (2000). Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatrica*, 89(2), 165-171.

Järvinen, K.M., Laine, S.T., Järvenpää, A.L., Suomalainen, H.K. (2000). Does low IgA in human milk predispose the infant to development of cow's milk allergy? *Pediatric Research*, 48(4):457-6.

Järvinen K.M., Westfall J.E., Seppo M.S., James A.K., Tsuang A.J., Feustel P.J., Sampson H.A., Berin C. (2014). Role of maternal elimination diets and human milk IgA in the development of cow's milk allergy in the infants. *Clin Exp Allergy*. 44(1):69-78.

Juto, P. and Holm, S. (1992). Gliadin-specific and cow's milk protein-specific IgA in human milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 15(2): 159-62.

Kahlenberg, F., Sanchez, D., Lachmann, I., Tuckova, L., Tlaskalova, H., Méndez, E., Mothes, T. (2006). Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides. *European Food Research and Technology*, 222: 78-82.

Kalliokoski S., Sulic A., Korponay-Szabó I.L., Szondy Z., Frias R., Perez M.A., Martucciello S., Roivainen A., Pelliniemi L.J., Esposito C., et al. (2013). Celiac Disease–Specific TG2-Targeted Autoantibodies Inhibit Angiogenesis Ex Vivo and In Vivo in Mice by Interfering with Endothelial Cell Dynamics. *PLoS One*, 8(6): e65887

Kapuscinska, A. (1987). Disease specificity and dynamics of changes in IgA class anti-endomyssial antibodies in celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 6: 529-534.

Karell, K., Louka, A.S., Moodie, S.J. (2003). HLA types in celiac disease patients nor carrying the DQA\*05-DQB\*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Humam Immunology*, 64: 459-477.

Kaukinen, K., Peräaho, M., Collin, P., Partanen, J., Woolley, N., Kaartinen, T., Nuutinen, T., Halttunen, T., Mäki, M., Korponay-Szabo, I. (2005). Small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in coeliac disease without villous atrophy: a prospective and randomized clinical study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 40: 564–72.

King, A.L., Ciclitira, P.J. (2000). Celiac disease: strongly heritable, oligogenic, but genetically complex. *Molecular Genetics and Metabolism*, 71 (1-2): 70-5.

Kondrashova, A., Mustalahti, K., Kaukinen, K., Viskari, H., Volodicheva, V., Haapala, A.M., Ilonen, J., Knip, M., Mäki, M., Hyöty, H; EpiVir Study Group. (2008). Lower economic status and inferior hygienic environment may protect against celiac disease. *Annals of Medicine*, 40 (3): 223-31.

Koning, F., Gilissen, L., Wijmenga, C. (1991). Gluten: a two-edged sword. Immuno-pathogenesis of celiac disease. *Springer Seminars in Immunopathology*, 27: 217-32.

Korponay-Szabo, I.R., Dahlbom, I., Laurita, K. (2003). Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for celiac disease in selective IgA deficiency. *Gut*, 52: 1567-1571.

Korponay-Szabó, I.R., Halttunen, T., Szalai, Z., Laurila, K., Király, R., Kovács, J.B., Fésüs, L., Mäki, M. (2004). In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut*, 53(5): 641-8.

Koskinen O., Collin P., Lindfors K., Laurila K., Mäki M., Kaukinen K. (2010) Usefulness of small-bowel mucosal transglutaminase-2 specific autoantibody deposits in the diagnosis and follow-up of celiac disease. *J Clin Gastroenterol.*, 44(7):483-8.

Kurien M., Evans K.E., Hopper A.D. (2012). Duodenal bulb biopses for diagnosing adult celiac disease: is there an optimal biopsy site? *Gastrointest Endosc.* 75, 1190-96.

Lagerqvist, C., Dahlbom, I., Hansson, T., Jidell, E., Juto, P., Olcén, P., Stenlund, H., Hernell, O., Ivarsson A. (2008) Antigliadin immunoglobulin a best in finding celiac disease in children younger than 18 months of age. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 47: 428-435.

La Vieille, S., Pulido O.M., Abbott, M., Koerner, T.B., Godefroy, S. (2016). Celiac Disease and Gluten-Free Oats: A Canadian Position Based on a Literature Review. *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 1870305.

Leffer, D.A., Schuppan, D. (2010). Update on serologic testing in celiac disease. *American Journal of Gastroenterology*, 105: 2520-2524

Lerma, J.C., Escobar, P.C., Simo, E.M., Aliaga, E.D., Miguel, B.P., Ribes-Koninckx, C. (2014). Low gluten consumption by young children from families with a history of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 58(5): e50.

Lionetti, E., Castellaneta, S., Francavilla, R., Pulvirenti, A., Tonutti, E., Amarri, S., Barbato, M., Barbera, C., Barera, G., Bellantoni, A. et al. (2014). Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. *New England Journal of Medicine*, 2:371(14): 1295-303, doi: 10.1056/NEJMoa1400697.

Logan RFA. (1992). Epidemiology of coeliac disease. In: Marsh MN, eds. *Coeliac disease*. Oxford, United Kingdom: Blackwell Scientific Publications, 192-214.

MacGillivray, D.M., Kollmann, T.R. (2014). The Role of Environmental Factors in Modulating Immune Responses in Early Life. *Frontiers in Immunology*, 5: 434.

Maglio M., Tosco A., Auricchio R., Paparo F., Colicchio B., Miele E., Rapacciuolo L., Troncone R. (2011). Intestinal deposits of anti-tissue transglutaminase IgA in childhood celiac disease. *Dig Liver Dis.*, 43(8):604-8.

Maiuri, L., Ciacci, C., Auricchio, S., Brown, V., Quaratino, S., Londei, M. (2000). Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*, 199 (4): 996-1006.

Maiuri, L., Ciacci, C., Ricciardelli, I., Vacca, L., Raia, V., Auricchio, S., Picard, J., Osman, M., Quaratino, S., Londei, M. (2003). Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*, 362 (9377): 30-7)

Maiuri, L., Ciacci, C., Vacca, L., Ricciardelli, I., Auricchio, S., Quaratino, S., Londei, M. (2001). IL-15 drives the specific migration of CD94+ and TCR-gammadelta+ intraepithelial lymphocytes in organ cultures of treated celiac patients. *American Journal of Gastroenterology*, 96 (1): 150-6.

Mårild, K., Kahrs, C.R., Tapia, G., Stene, L.C., Størdal, K. (2015). Infections and risk of celiac disease in childhood: a prospective nationwide cohort study. *American Journal of Gastroenterology*, 110(10): 1475-1484.

Mårild, K., Stephansson, O., Montgomery, S., Murray, J.A., Ludvigsson, J.F. (2012). Pregnancy outcome and risk of celiac disease in offspring: A nationwide case-control study. *Gastroenterology*, 142: 39-45, e3.

Mårild, K., Ye, W., Lebwohl, B., Green, P.H., Blaser, M.J., Card, T., Ludvigsson, J.F. (2013). Antibiotic exposure and the development of coeliac disease: a nationwide case-control study. *BMC Gastroenterology*, 13 109.

Marsh M.N., Loft D.E., Garner V.G., Gordon D. (1992). Time dose responses of celiac mucosae to graded oral challenges with Frazer's fraction III of gliadin. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 4: 667-73.

Marzari R., Sblattero D., Florian F., Tongiorgi, E., Not, T., Tommasini, A., Ventura, A., Bradbury, A. (2001). Molecular dissection of the tissue transglutaminase autoantibody response in celiac disease. *J Immunol*, 166:4170–6.

Mascart-Lemone, F., Donnen, P., Paluku, B., Brasseur, D., Van den Broeck, J., Vaerman, J.P., Hennart, P., Duchateau, J. (1991). Serum and breast milk antibodies to food antigens in African mothers and relation to their diet. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 310: 201-6.

Maynard, C.L., Elson, C.O., Hatton, R.D., Weaver C.T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415): 231-241.

Mena, M.C., Lombardía, M., Roca, M., Ribes-Koninckx, C., Albar, J.P. (2013). Analysis of gluten in human milk samples in coeliac and non-coeliac mothers. Proceedings of the 26th Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity, Leuven, Belgium. *Verlag Wissenschaftliche Scripten*, 39-44. ISBN: 978-3-938896-66-2.

Mena, M.C., Lombardia, M., Hernando, A., Méndez, E., Albar, J.P. (2012). Comprehensive analysis of gluten in processed foods using a new extraction method and a competitive ELISA based on the R5 antibody. *Talanta*, 91: 33-40.

Mendez, E., Vela, C., Immer, U., Janssen, F.W. (2005). Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 17: 1053-1063.

Mention, J.J., Ben Ahmed, M., Bègue, B., Barbe, U., Verkarre, V., Asnafi, V., Colombel, J.F., Cugnenc, P.H., Ruemmele, F.M., McIntyre, E., et al. (2003). Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*, 125 (3): 730-45.

Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz T.N., Raulet, D.H., Lanier, L.L., Groh, V., Spies, T., et al. (2004). Coordinated induction by

IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*, 21 (3): 357-66.

Meuwisse, G.W. (1970). Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 59: 461-4.

Miranda Diaz, M., Alonso Romero, L., De Castro Ochoa, M. (2012). Enfermedad celíaca: nuevos criterios diagnósticos. *Vox Paediatrica*, 19(2): 28-33.

Mitt, K., Uibo, O. (1998). Low cereal intake in estonian infants: The possible explanation for the low frequency of coeliac disease in estonia. *European Journal of Clinical Nutrition*, 52(2), 85-88.

Molberg, O., McAdam, S.N., Körner, R., Quarsten, H., Kristiansen, C., Madsen, L., Fugger, L., Scott, H., Norén, O., Roepstorff, P., et al. (1998). Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nature Medicine*, 4: 713-7.)

Molberg, O., McAdam, S., Lundin, K.E., Kristiansen, C., Arentz-Hansen, H., Kett, K., Sollid, L.M. (2001). T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated in situ by endogenous tissue transglutaminase. *European Journal of Immunology*, 21: 1317-1323.

Molberg, O., McAdam, S.N., Sollid, L.M. (2000). Role of tissue transglutaminase in celiac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 30: 232-240.

Monsuur, A. J., de Bakker, P. I., Alizadeh, B. Z., Zhernakova, A., Bevova, M. R., Strengman, E., Franke, L., van't Slot, R., van Belzen, M.J., Lavrijsen, I.C., et al. (2005). Myosin IXB variant increases the risk of celiac disease and points toward a primary intestinal barrier defect. *Nature Genetics*, 37(12), 1341-1344.

Mowat, A.M. (2003). Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Reviews Immunology*, 3(4): 331-41.

Mueller N.T., Bakacs E., Combellick J., Grigoryan Z., Dominguez-Bello M.G. (2015). The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med.*, 21(2):109-17.

Mujico J.R., Dekking L., Kooy-Winkelaar Y., Verheijen R., van Wichen P., Streppel L., Sajic N., Drijfhout J.W., Koning F. (2012). Validation of a new enzyme-linked immunosorbent assay to detect the triggering proteins and peptides for celiac disease: interlaboratory study. *J AOAC Int.*, 95(1): 206-15.

Mustalahti, K., Catassi, C., Reunanen, A., Fabiani, E., Heier, M., McMillan, S., Murray, L., Metzger, M.H., Gasparin, M., Bravi, E., et al. (2010). The prevalence of celiac disease in europe: Results of a centralized, international mass screening project. *Annals of Medicine*, 42(8), 587-595.

Myléus A., Hernell O., Gothefors L., Hammarström M.L., Persson L.Å., Stenlund H., Ivarsson A. (2012). Early infections are associated with increased risk for celiac disease: an incident case-referent study. *BMC Pediatr.*, 12:194.

Myléus, A., Ivarsson, A., Webb, C., Danielsson, L., Hernell, O., Högberg, L., Karlsson, E., Lagerqvist, C., Norström, F., Rosén, A., et al. (2009). Celiac disease revealed in 3% of swedish 12-year-olds born during an epidemic. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 49(2), 170-176.

Nadal, I., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., Sanz, Y. (2007). Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *Journal of Medical Microbiology*, 56(12), 1669-1674.

Norris, J. M., Barriga, K., Hoffenberg, E. J., Taki, I., Miao, D., Haas, J. E., Emery, L.M., Sokol, R.J., Erlich, H.A., Eisenbarth, G.S., et al. (2005). Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *Jama*, 293(19): 2343-2351.

Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. (1999). The histopathology of celiac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 11: 1185-1194.

Olivares, M., Albrecht, S., De Palma, G., Ferrer, M.D., Castillejo, G., Schols, H.A., Sanz, Y. (2015). Human milk composition differs in healthy mothers and mothers with celiac disease. *European Journal of Nutrition*, 54(1):119-28.

Olivares, M., Neef, A., Castillejo, G., Palma, G. D., Varea, V., Capilla, A., Palau, F., Nova, E., Marcos, A., Polanco, I., et al. (2014). The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. *Gut*, 64(3): 406-417.

Olsson, C., Stenlund, H., Hörnell, A., Hernell, O., Ivarsson, A. (2009). Regional variation in celiac disease risk within sweden revealed by the nationwide prospective incidence register. *Acta Paediatrica*, 98 (2), 337-342.

Osman, A.A., Uhlig, H.H., Valdes, I., Amin, M., Méndez, E., Mothes, T. (2001). A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide

epitope in gliadins. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 13: 1189-1193.

Ozcan, T., Ozeke, T., Meral, A. (2000). Gliadin-specific IgA antibodies in breast milk. *Journal of International Medical Research*, 28(5): 234-40.

Palma, G.D., Capilla, A., Nova, E., Castillejo, G., Varea, V., Pozo, T., Garrote, J.A., Polanco, I., López, A., Ribes-Koninckx, C., et al. (2012). Influence of milk-feeding type and genetic risk of developing coeliac disease on intestinal microbiota of infants: the PROFICEL study. *PLoS ONE*, 7: e30791.

Pisapia, L., Camarca, A., Picascia, S., Bassi, V., Barba, P., Del Pozzo, G., Gianfrani, C. (2016). HLA-DQ2. 5 genes associated with celiac disease risk are preferentially expressed with respect to non-predisposing HLA genes: Implication for anti-gluten T cell response. *Journal of Autoimmunity*, 70, 63-72.

Plot L., Amital H. (2009). Infectious associations of Celiac disease. *Autoimmun Rev*, 8(4):316-9.

Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. (1990). Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Arch Dis Child*. 65(8): 909–911.

Ribes-Koninckx, C., Giliams, J.P., Polanco, I., Peña, A.S. (1984). IgA Antigliadin Antibodies in Celiac and Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 3, 676-682.

Ribes Koninckx, C., Serra, J. D., Villares, J. M., Martín, J. D., de Villasante, G. C., Allue, I. P. (2015). La introducción del gluten en la dieta del lactante. Recomendaciones de un grupo de expertos. *Anales De Pediatría*, 83. (5) pp. 355. e1-355. e7.

Riestra, S., Fernandez, E., Rodrigo, L., Garcia, S., Ocio, G. (2000). Prevalence of coeliac disease in the general population of northern Spain: Strategies of serologic screening. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 35(4), 398-402.

Riestra Menéndez, S. (2011). Epidemiología de la enfermedad celíaca. En Arranz E. y Garrote J.A., editores. *Enfermedad celíaca*. p 25-32. Madrid, España: Ergon.

Roca M., Vriezinga S.L., Crespo-Escobar P., Auricchio R., Hervás D., Castillejo G., Mena M.C., Polanco I., Troncone R., Mearin M.L., Ribes-Koninckx C.; PREVENT CD Study Group. (2017). Anti-gliadin antibodies in breast milk from celiac mothers on a gluten-free diet. *Eur J Nutr*. doi: 10.1007/s00394-017-1476-1.

Rogier, E.W., Frantz, A.L., Bruno, M.E., Wedlund, L., Cohen, D.A., Stromberg, A.J., Kaetzel, C.S. (2014). Secretory antibodies in breast milk promote long-term intestinal homeostasis by regulating the gut microbiota and host gene expression. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(8): 3074-3079

Rostom, A., Dubé, C., Cranney, A., Saloojee, N., Sy, R., Garritty, C., Sampson, M., Zhang, L., Yazdi, F., Mamaladze, V., et al. (2005). The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: A systematic review. *Gastroenterology*, 128: S38-S46.

Rumbo, M., Chirido, F.G., Añón, M.C., Fossati, C.A. (1998). Detection and characterization of antibodies specific to food antigens (gliadin, ovalbumin and beta-lactoglobulin) in human serum, saliva, colostrum and milk. *Clinical & Experimental Immunology*, 112(3): 453–8.

Salmi T.T., Collin P., Korponay-Szabó I.R., Laurila K., Partanen, J., Huhtala, H., Király, R., Lorand, L., Reunala, T., Mäki, M., et al. (2006). Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. *Gut*, 55:1746–53.

Salmi, T.T., Collin, P., Järvinen, O., Haimila, K., Partanen, J., Laurila, K., Korponay-Szabo, I.R., Huhtala, H., Reunala, T., Mäki, M., et al. (2006). Immunoglobulin A autoantibodies against transglutaminase 2 in the small intestinal mucosa predict forthcoming celiac disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 24:541–52.

Salmi T.T., Collin P., Reunala T., Mäki M., Kaukinen K. (2010). Diagnostic methods beyond conventional histology in coeliac disease diagnosis. *Dig Liver Dis.*, 42(1):28-32.

Sánchez, E., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Fernández-Murga, M.L., Sanz, Y. (2013). Duodenal-mucosal bacteria associated with celiac disease in children. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(18): 5472-5479.

Sanchez, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., Sanz, Y. (2012). Intestinal staphylococcus spp. and virulent features associated with coeliac disease. *Journal of Clinical Pathology*, 65(9), 830-834.

Sanz, Y., Sánchez, E., Marzotto, M., Calabuig, M., Torriani, S., Dellaglio, F. (2007). Differences in faecal bacterial communities in coeliac and healthy children as

detected by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 51(3): 562-568.

Sapone, A., Lammers, K. M., Casolaro, V., Cammarota, M., Giuliano, M. T., De Rosa, M., Stefanile, R., Mazzarella, G., Tolone, C., Russo, M.I., et al. (2011). Divergence of gut permeability and mucosal immune gene expression in two gluten-associated conditions: Celiac disease and gluten sensitivity. *BMC Medicine*, 9(1): 23.

Sellitto, M., Bai, G., Serena, G., Fricke, W. F., Sturgeon, C., Gajer, P., White, J.R., Koenig, S.S., Sakamoto, J., Boothe, D., et al. (2012). Proof of concept of microbiome-metabolome analysis and delayed gluten exposure on celiac disease autoimmunity in genetically at-risk infants. *PloS One*, 7(3), e33387.

Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L.M., Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* (New York, N.Y.), 297(5590), 2275-2279.

Shewry, P.R. Halford, N.G. (2002). Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53: 947-958.

Shewry, P.R., Halford, N.G., Lafiandra, D. (2003). Genetics of wheat gluten proteins. *Advances in Genetics*, 49, 111-184.

Simell, S., Hoppu, S., Hekkala, A., Simell, T., Stahlberg, M.R., Viander, M., Yrjänäinen, H., Grönlund, J., Markula, P., Simell, V., et al. (2007). Fate of five celiac disease-associated antibodies during normal diet in genetically at-risk children observed from birth in a natural history study. *American Journal of Gastroenterology*. 102: 2026-2035.

Singh, P., Arora, S., Lal, S., Strand, T. A., Makharia, G. K. (2015). Risk of celiac disease in the first-and second-degree relatives of patients with celiac disease: A systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 110(11): 1539-48.

Sollid, L.M. (2002). Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nature Reviews Immunology*, 2(9): 647-55.

Sollid, L.M. Lundin, K.E.A. (2009). Diagnosis and treatment of celiac disease. *Mucosal Immunology*.2(1):3-7. doi: 10.1038/mi.2008.74.

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., et al. (2006). Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol.*, 101(10):2333-40.

Stevens, F.M., Egan-Mitchell, B., Cryan, E., McCarthy, C.F., McNicholl, B. (1986). Decreasing incidence of coeliac disease. *Archives Disease in Childhood*, 62(5): 465-8.

Stordal, K., White, R. A., Eggesbo, M. (2013). Early feeding and risk of celiac disease in a prospective birth cohort. *Pediatrics*, 132(5): e1202-9.

Szajewska, H., Shamir, R., Chmielewska, A., Pięćcik-Lech, M., Auricchio, R., Ivarsson, A., Kolacek, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, I., Mearin, M.L., et al; PREVENTCD Study Group. (2015). Systematic review with meta-analysis: early infant feeding and coeliac disease-update 2015. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 41(11):1038-54. doi: 10.1111/apt.13163.

Szajewska, H., Shamir, R., Mearin, L., Ribes-Koninckx, C., Catassi, C., Domellöf, M., Fewtrell, M.S., Husby, S., Papadopoulou, A., Vandenplas, Y., et al. (2016). Gluten introduction and the risk of coeliac disease: A position paper by the european society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 62(3), 507-513.

Tallería Orriols, J.J., Blanco Quirós, A., Gómez Carrasco, J.A., Díez Fernández, T., Garrido, M. (1990). Correlation between IGA from colostrum and serum and IGA is closer than between salivary IGA and total IGA. *An Esp Pediatr.*, 33(1):31-5

Tosco, A., Aitoro, R., Auricchio, R., Ponticelli, D., Miele, E., Paparo, F., Greco, L., Troncone, R., Maglio, M. (2013). Intestinal anti-tissue transglutaminase antibodies in potential coeliac disease. *Clinical & Experimental Immunology.*, 171(1):69-75.

Tosco A., Maglio M., Paparo F. Rapacciuolo, L., Sannino, A., Miele, E., Barone, M.V., Auricchio, R., Troncone, R. (2008). Immunoglobulin A antitissue transglutaminase antibody deposits in the small intestinal mucosa of children with no villous atrophy. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 47:293–8.

Tosco, A., Salvati, M.V., Auricchio, R., Maglio, M., Borrelli, M., Coruzzo, A., Paparo, F., Boffardi, M., Esposito, A., D'adamo, G., et al. (2011). Natural history of potential celiac disease in children. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 9:320–5.

Troncone, R., Ferguson, A. (1991). Anti-gliadin antibodies. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 12: 150-158.

Troncone, R., Ivarsson, A., Szajewska, H., Mearin, L.M. (2008). On behalf of the members of the european multi-stakeholder platform on CD (CDEUSSA). Future research on Celiac disease. A position report from the European multi-stakeholder

platform on Celiac disease (CDEUSSA). *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 27:1030-43.

Troncone, R., Maurano, F., Auricchio, R. (1999). IgA antibodies to tissue transglutaminase: an effective diagnostic for celiac disease. *Journal of pediatrics*, 134 (2): 166-171.

Troncone, R., Scarcella, A., Donatiello, A., Cannataro, P., Tarabuso, A., Auricchio, S. (1987). Passage of gliadin into human breast milk. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 76: 453-456.

Valdes, I., Garcia, E., Llorente, M., Méndez E. (2003). Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology* 15: 465-474.

Van de Wal, Y., Kooy, Y., Van Veelen, P., Peña, S., Mearin, L., Papadopoulos, G., Koning, F. (1998). Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *Journal of Immunology*, 161: 1585-1588.

Van Overbeek, F.M., Uil-Dieterman, I.G., Mol, I.W., Köhler-Brands, L., Heymans, H.S., Mulder, C.J. (1997). The daily gluten intake in relatives of patients with coeliac disease compared with that of the general Dutch population. *European Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 9(11): 1097-9.

Vartdal, F., Johansen, B.H., Friede, T., Thorpe, C.J., Stevanović, S., Eriksen, J.E., Sletten, .K., Thorsby, E., Rammensee, H.G., Sollid, L.M. (1996). The peptide binding motif of the disease associated HLA-DQ (alpha 1\*0501, beta 1\* 0201) molecule. *European Journal of Immunology*, 26: 2764-2772.

Vriezinga, S.L., Auricchio, R., Bravi, E., Castillejo, G., Chmielewska, A., Crespo Escobar, P., Kolaček, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, I.R., Mummert, E., et al. (2014). Randomized feeding Intervention in infants at high risk for celiac disease. *New England Journal of Medicine*, 371(14): 1304-15.

Wacklin, P., Kaukinen, K., Tuovinen, E., Collin, P., Lindfors, K., Partanen, J., Mäki, M., Mättö, J. (2013). The duodenal microbiota composition of adult celiac disease patients is associated with the clinical manifestation of the disease. *Inflammatory Bowel Diseases*, 19(5): 934-41.

Wacklin, P., Laurikka, P., Lindfors, K., Collin, P., Salmi, T., Lähdeaho, M.L., Saavalainen, P., Mäki, M., Mättö, J., Kurppa, K., Kaukinen, K. (2014). Altered duodenal microbiota composition in celiac disease patients suffering from persistent symptoms

on a long-term gluten-free diet. *American Journal of Gastroenterology*, 109(12): 1933-1941.

Walker-Smith, J.A., Guandalini, S., Schmitz, J., Shmerling, D.H. et al. (1990). Revised criteria for diagnosis of coeliac disease. Report of Working Group of European Society of Paediatric Gastroenterology and Nutrition. *Archives Disease in Childhood*, 65(8): 909-911.

Wang, N., Truedsson, L., Elvin, K., Andersson, B.A., Rönnelid, J., Mincheva-Nilsson, L. Lindkvist, A., Ludvigsson, J.F., Hammarström, L., Dahle, C. (2014). Serological assessment for celiac disease in IgA deficient adults. *PLOS ONE*, 9 (4): e93180

Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24(2), 115-119.

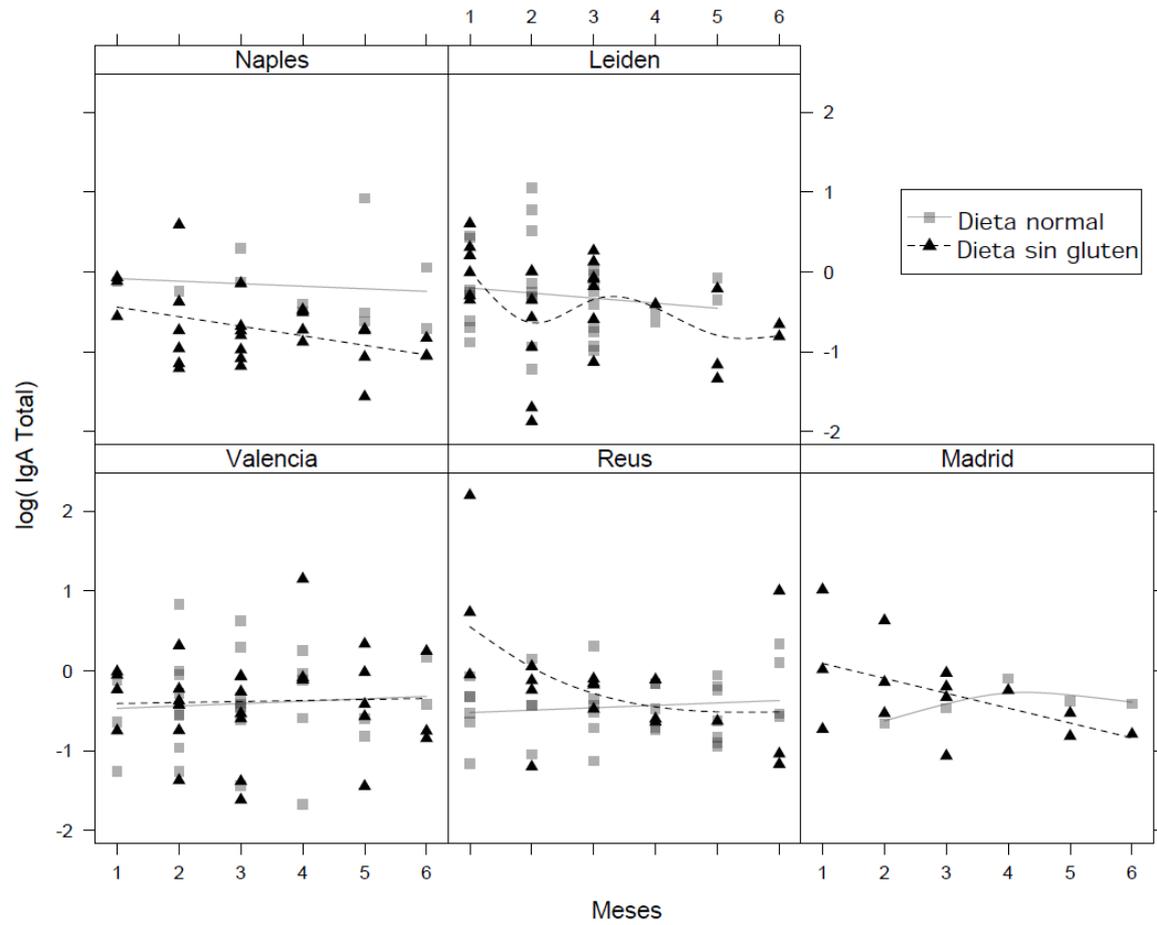
Wolters, V.M. Wijmenga, C. (2008). Genetic background of celiac disease and its clinical implications. *The American Journal of Gastroenterology*, 103(1), 190-195.

## *8. ANEXOS*

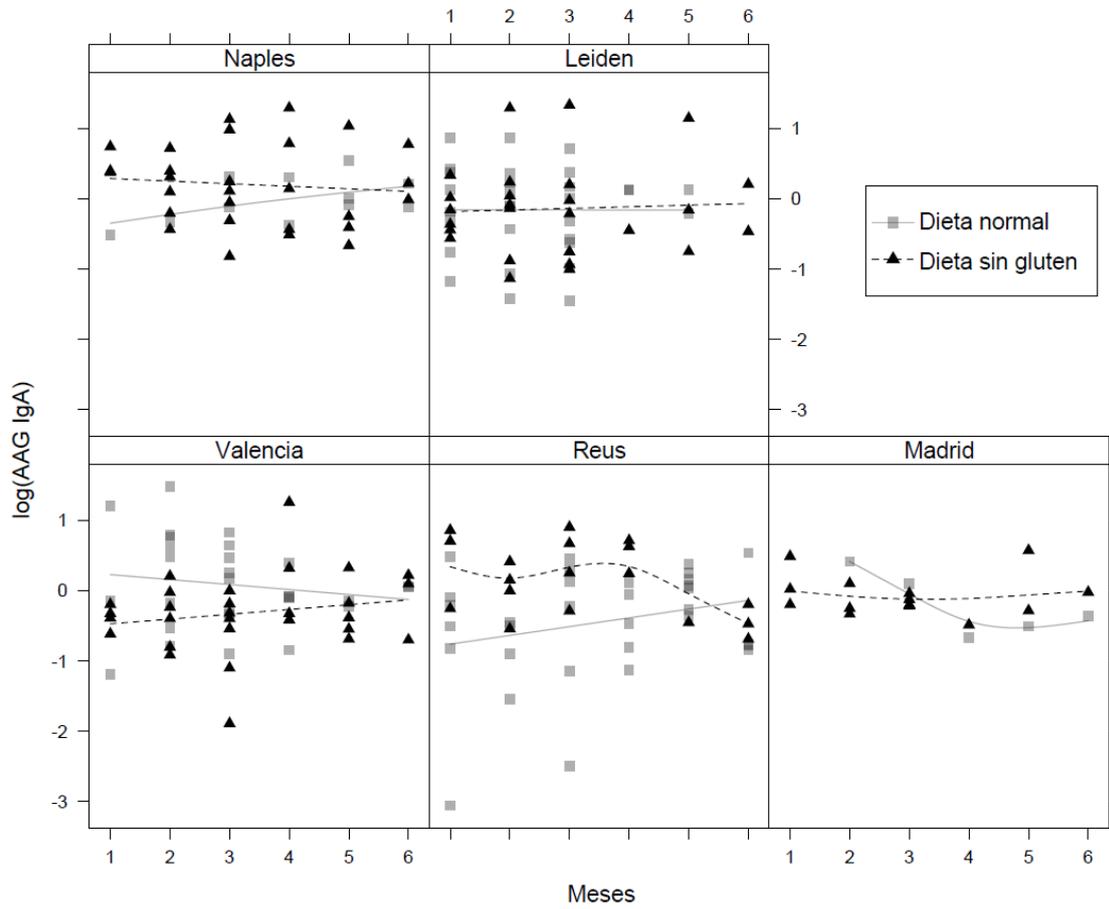
---

## 8 Anexos

**Anexo 1.** Evolución mensual de los valores de IgA total por país y grupo de dieta. Las líneas representan tendencias ajustadas mediante una función de suavizado (splines).



**Anexo 2.** Evolución mensual de los valores de AAG-IgA por país y grupo de dieta. Las líneas representan tendencias ajustadas mediante una función de suavizado (splines).



### **Anexo 3. Procedimiento para la extracción de gluten (Mena et al. 2012)**

#### **Aqueous ethanol and cocktail extraction**

Samples (0.25 g) were weighed and transferred to a propylene tube. They were then extracted with 10 ml of 60% aqueous ethanol (v/v) or the cocktail solution, based on reducing 2-mercaptoethanol (Sigma M-6250, St. Louis, MO, USA) and (Fluka 50940, Buchs, Switzerland) reagents in phosphate buffered saline (PBS) as previously described (patent WO 02/092633 A1).

#### **UPEX extraction**

The gluten extraction procedure described here is based on reducing Tris (2-carboxyethyl)-phosphine (TCEP) (Sigma 32497LJ, St. Louis, MO, USA) and anionic surfactant N-lauroylsarcosine (Sarkosyl) (Aldrich 61745, St. Louis, MO, USA) reagents in PBS (patent WO 2011/07039 A2).

- (1) A 0.25-g sample of a ground food was weighed and transferred to a 10-ml polypropylene tube.
- (2) A 2.5-ml aliquot of the UPEX solution (5 mM TCEP, 2% N-lauroylsarcosine in PBS, pH 7) was added to the tube containing the sample. For preventing inactivation of the reducing agent, we prepared UPEX solution immediately before to use it.
- (3) The tubes were closed tightly and the caps were covered with film to avoid evaporation.
- (4) The contents of the tubes were mixed thoroughly by vortexing (5–10 s) and the tubes were placed in a rack.
- (5) The tubes were incubated in an oven (Heraeus) at 50°C for 40 min.
- (6) The tubes were allowed to cool for 5 min at room temperature.
- (7) A 7.5-ml aliquot of 80% ethanol/water (v/v) was added and the samples were thoroughly dispersed by vortexing for 10–60 s (until total dispersion of the sample was achieved) and then incubated for 1 h at room temperature in a rotary (head-overhead) shaker (Labinco B.V. model L26) at 45 turns/min.
- (8) The tubes were centrifuged in a bench-top centrifuge (Eppendorf model 5810) for 10 min at 2500 g at room temperature.
- (9) Using fresh Pasteur pipettes, the supernatant from each tube was transferred to a clean 10-ml polypropylene tube. The solution was then ready for the analysis by the different techniques. The analyses were performed within 24 h of extraction.

**Anexo 4: Protocolo ELISA Competitivo** (Mena et al., 2012)

A 96-well microplate (EIA/RIA flat bottom polystyrene microwell plate without a lid [Product 3590, Corning, NY, USA]) was coated with 100  $\mu$ l of gliadins at 50 ng/ml in 50 mM sodium carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6), for 2 h at room temperature. The wells were then washed 3 times with 370  $\mu$ l of PBS containing 0.05% Tween 20 (v/v) (Sigma, St Louis, MO, USA) (PBS-T), pH 7.4.

To block unoccupied binding sites and to prevent possible non-specific adsorption, we performed a subsequent incubation with 300  $\mu$ l of the blocking buffer (1% bovine serum albumin fraction V [BSA] [Sigma Chemical Co., USA] in PBS-T) for 1 h at room temperature. Afterwards, the microplate was washed three times as described above and then the standard antigen solutions or samples were added to each well.

The samples consisted of 50  $\mu$ l of sample extracts diluted in PBS-T plus 1% BSA (dilution buffer) at an appropriate dilution, which were dispensed into the plate wells in duplicate. In addition, both duplicates were also diluted 1/2 with dilution buffer to get 4 quantification points for every sample. The standard solution was prepared from a stock solution of 0.5 mg/ml of gliadins; it was diluted 1:6400 in dilution buffer to 78.13 ng/ml, then serially diluted to 0.61 ng/ml and dispensed into the plate wells in duplicate. The horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit IgG was obtained from monoclonal antibody R5 (R5-HRP). Afterwards, a 50- $\mu$ l aliquot of the purified antibody R5-HRP (1:50,000 in PBS-T) was added to each sample well, mixed thoroughly and incubated for 1 h at room temperature.

After washing 6 times with PBS-T, the wells were filled with 100  $\mu$ l of K-Blue™ substrate 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)(Neogen, Kentucky, USA). After incubation for 10 min at room temperature in darkness, 50  $\mu$ l of H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.5 M were added to each well to stop the enzyme reaction.

Next, the immunoassay optical density absorbance of each well was measured with a Microplate Reader at 450 nm. A computer with a spreadsheet program to convert optical densities to concentrations (Biorad program Microplate Manager® 5.2.1) was used for analysing the results.

The microplate was placed in a humid box (moist chamber) during all of the incubation procedures to avoid evaporation.

**Anexo 5. Protocolo ELISA-R5 Sandwich** (Mendez et al., 2005; Valdes et al., 2003)

Polystyrene enzyme immuno-assay/radio immuno-assay (EIA/RIA) flat-bottomed plates (Corning Incorporated, Acton, Massachusetts, USA) were coated overnight at 48°C with 0.3 µg of R5 monoclonal antibody in 100 µl of 50mM sodium carbonate/bicarbonate (pH 9.6). Plates were washed three times with PBS containing 0.05% Tween-20 (Sigma) (PBST) and blocked with PBS-T plus 1% BSA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) (blocking solution) for 1 h at 37°C. Plates were washed again three times in PBS-T and incubated for 1 h with 100-µl sample extract dilutions and gliadin standard diluted in PBS-T from 100 to 0.78 ng/ml using 1:2 serial dilutions. After washing three times with PBS-T, 100 µl of R5-HRP (1:20000 in PBS-T) was added, and the plates were incubated for 1 h at room temperature. Plates were washed again six times with PBS-T, and 100 µl of K-blue 39,39,59,59 tetramethylbenzidine (TMB) Max (Neogen, Lexington, Kentucky, USA) was added. The reaction was stopped 10 min later with 50 µl 2.5-M sulphuric acid. Absorbance at 450 nm was measured in a microplate reader.

**Anexo 6. Protocolo de inmunofluorescencia doble para IgA in situ y TG2.****Materiales:**

1. Anticuerpo monoclonal de ratón Anti-Transglutaminasa tisular (clon CUB7402) (mouse mab IgG1/kappa) (labvision, Neomarkers, Fremont, USA, CA).
2. Anticuerpo policlonal de conejo Anti-IgA humana conjugado con Fluoresceína Isotiocianato (FITC), (clon F0204) (Dako A/S, Glostrup, Denmark).
3. Anticuerpo de conejo Anti-Ig de ratón conjugado con el isotiocianato de tetradamina (TRITC), (clon R0270) (Dako A/S, Glostrup, Denmark. El TRITC es un derivado de la Rodamina, compuesto orgánico heterocíclico fluorescente, modificado con un grupo funcional isotiocianato, reactivo frente a los grupos amino de las proteínas. La molécula tiene un espectro característico de excitación a 532 nm y de emisión a 578 nm.
4. El fragmento F (ab')<sub>2</sub> de anticuerpo IgG anti-ratón aislado de cabra marcado con un nuevo derivado de la Rodamina, ALEXA FLUOR(R) 594 (INVITROGEN Cód: A11020) se sustituyó por el anterior, desde 2016, debido a su mayor fotoestabilidad con características espectrales distintas. Se utiliza a una dilución 1:50.
5. Microscopio de fluorescencia, basado en una serie de filtros ópticos. Filtro de excitación que selecciona las longitudes de onda 495 y 552 nm a la fluoresceína (FITC) y rodamina (TRITC); y filtro de emisión que permite pasar solo las longitudes de onda de interés emitidas por el fluoróforo específico en cada caso (519 y 578 para FITC y TRITC respectivamente). Se utiliza para aplicaciones de la investigación por su alto grado de sensibilidad, especificidad y resolución que permite realizar estudios de colocalización.
6. Microscopio Confocal Espectral Leica TCS-SP5, equipado con sistema AOBS y láseres de Ar (458, 476, 488, 496,514) HeNe 543, HeNe 594, HeNe 633. Se capturaron y visualizaron imágenes de colocalización que permitían la determinación de depósitos de TG2-IgA con una mayor seguridad, particularmente en muestras con escasos depósitos. Se obtuvieron imágenes con mayor resolución tanto lateral como axial y una notable mejora del contraste, gracias al barrido puntual y a la supresión de la luz dispersa.

**Método: Técnica de inmunofluorescencia doble.**

1. Una vez las muestras estaban congeladas y cortadas, se prepararon las diluciones con los diferentes anticuerpos: Ab-CUB7402 (dilución 1:200), Ab-TRITC (dilución 1:120) ó Ab-ALEXA (1:50) y Ab-FITC (dilución 1:40).
2. Se realizó una técnica de lavado por inmersión de los portas en PBS, dos veces durante 5 minutos.
3. Se eliminó el exceso de PBS y se secaron los portaobjetos con papel absorbente. A continuación, se cubrió cada sección con 20µl de la dilución 1:200 de Ab monoclonal de ratón anti-TG2 (CUB7402). Se incubó en cámara húmeda oscura durante 15 minutos.
4. Se realizó lavado igual que en paso 2.
5. Se eliminó el exceso de PBS y se secaron los portaobjetos con papel absorbente. Se cubrió cada sección con 20µl de la dilución 1:120 de Ac de conejo anti-Ig de ratón (Ab-TRICT) o dilución 1:50 en el caso del reactivo ALEXA. Se incubó en cámara húmeda oscura durante 15 minutos.
6. Se realizó lavado igual que en paso 2.
7. Se eliminó el exceso de PBS y se secaron los portaobjetos con papel absorbente. Se cubrieron las secciones con 20µl de la dilución 1:40 de Ab-FITC Ab de conejo anti IgA. Se incubó en cámara húmeda oscura durante 15 minutos.
8. Se realizó lavado igual que en paso 2.
9. Se eliminó el exceso de PBS y se secaron los portaobjetos con papel absorbente. Se dispuso una gota de medio de montaje sobre cada una de las secciones del portaobjetos y se cubrieron las secciones con un cubreobjetos. Se procede a su lectura inmediata.
10. Se observaron los cortes bajo filtro azul para FITC, excitado con una luz a una longitud de onda de 495 nm y que emite una luz de color verde cuya longitud de onda es de 519 nm para la observación de los depósitos de IgA; y bajo filtro verde para TRITC, que es excitado a una luz de longitud de onda de 552 nm y que emite una luz de color rojo cuya longitud de onda es de 578 nm para TG2, con el microscopio de fluorescencia y/o con el microscopio confocal.

**Lectura e interpretación de resultados de la muestra:**

Se valoró la presencia de los depósitos anti-TG2 IgA considerando el patrón y la intensidad de fluorescencia. Se realizó una clasificación semicuantitativa de menor a mayor intensidad: negativo (-), positivo débil (+d), positivo (+).

Se tomaron imágenes con el microscopio de fluorescencia y se analizan bajo un software de análisis de imagen "Motic Images Plus 2.0" y/o con el microscopio confocal que permite obtener una imagen inmediata.

Al observar la misma sección bajo el filtro correspondiente a la rodamina se podrá distinguir la TG2 (rojo), si este patrón es coincidente con el patrón de los depósitos extracelulares de IgA (verde) en determinadas localizaciones, observamos simultáneamente ambos fluorocromos solapados dando como resultado un color amarillo-naranjado.