

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



# **Depósitos subepiteliales de Anticuerpos anti-TG2 como marcador inmunológico de la Enfermedad Celíaca**

ALUMNA: BLANCA BENAVENT RICART

TUTOR: RAFAEL SIRERA PEREZ

TUTORA EXTERNA: CARMEN RIBES KONINCKX

COTUTORA EXTERNA: MARÍA ROCA LLORENS

*Curso Académico: 2016-2017*

**VALENCIA, JULIO DE 2017**



## RESUMEN

### **Depósitos subepiteliales de Anticuerpos anti-TG2 como marcador inmunológico de la Enfermedad Celíaca.**

La enfermedad celíaca (EC) es una alteración sistémica de carácter autoinmune desencadenada por el consumo de gluten y prolaminas relacionadas, en individuos con predisposición genética caracterizada por una combinación variable de manifestaciones clínicas gluten-dependientes, anticuerpos específicos de EC, haplotipo HLA DQ2 y DQ8 y enteropatía. Se caracteriza por cambios histológicos a nivel de la mucosa del intestino delgado como atrofia vellositaria o hiperplasia de las criptas y provoca la secreción de autoanticuerpos dirigidos contra la transglutaminasa tisular de tipo 2 (TG2).

Actualmente el diagnóstico de EC se establece en base a 4 condiciones: la clínica o sintomatología del paciente, cambios y alteraciones a nivel de la mucosa intestinal, serología y HLA. Ante valores altos de autoanticuerpos, el diagnóstico en niños y adolescentes se puede realizar sin necesidad de biopsia intestinal (BI), apoyado en unos criterios estrictos que incluyen la positividad de anticuerpos anti-transglutaminasa tisular de tipo 2 (anti-TG2) y anticuerpos anti-endomisio (EMA) en el estudio serológico, según los nuevos criterios de la ESPHGAN 2012.

Las manifestaciones de la EC pueden variar desde formas clínicas a formas histológicas y serológicas, que en ocasiones pueden dificultar el diagnóstico: formas asintomáticas, una mucosa duodenal con apariencia normal y/o marcadores serológicos negativos. Así pues, en casos en los que haya dificultad para la evaluación del diagnóstico, son necesarios otros marcadores como la presencia de depósitos subepiteliales de anticuerpos antitransglutaminasa 2 de clase IgA (depósitos anti-TG2 IgA).

La detección de estos depósitos intestinales anti-TG2 parece ser una herramienta diagnóstica muy específica y sensible en pacientes celíacos. Así se ha descrito que individuos que presentan depósitos intestinales pero sin ninguna alteración histológica a nivel del intestino, terminan desarrollando la enfermedad. Sin embargo, se necesitan nuevos estudios que confirmen el papel como marcador predictivo en el posterior desarrollo de la EC. Para la determinación de los depósitos anti-TG2 se realizará un estudio de inmunofluorescencia con muestras de BI de pacientes previamente congeladas, incubándolas secuencialmente con anticuerpo monoclonal de ratón anti TG2, anticuerpo secundario anti inmunoglobulina de ratón conjugado con rodamina (TRICT), y posteriormente con anticuerpo policlonal de conejo anti IgA humana conjugado con FITC. Los autoanticuerpos forman depósitos debajo de la membrana basal epitelial y alrededor de la mucosa de los vasos sanguíneos y de las criptas y serán detectados mediante microscopía de fluorescencia o confocal por colocalización de anticuerpos de clase IgA (fluorescencia verde) con la TG2 (fluorescencia roja).

Los autoanticuerpos pueden ser detectados en el suero de pacientes celíacos que lleven una dieta normal con gluten y la dinámica de su desaparición tras iniciar una dieta exenta de gluten (DExG) varía según individuos, negativizándose tras 6 a 18 meses de dieta.

El objetivo del trabajo es evaluar el valor diagnóstico de la determinación de los depósitos subepiteliales de la anti-transglutaminasa tisular de tipo 2 (anti-TG2) en población pediátrica como marcador de la EC. Para ello, se incluirán pacientes de edad comprendida entre 0 y 16 años a los que se haya realizado Biopsia Intestinal y estudio de depósitos, con carácter retrospectivo. Se analizarán los resultados de los depósitos en relación con diferentes variables: diagnóstico final, serología (anti-TG2 IgA), predisposición genética HLA compatible y con el grado de lesión histológica.

**PALABRAS CLAVE:** Enfermedad Celíaca, depósitos subepiteliales de anticuerpos trasglutaminasa-tipo 2, gluten, biopsia intestinal, HLA.

## ABSTRACT

### **Subepithelial deposits of anti-TG2 antibodies as an immunological marker of Celiac Disease.**

Celiac disease (CD) is a systemic autoimmune disorder triggered by the consumption of gluten and related prolamins in individuals with genetic predisposition characterized by a variable combination of gluten-dependent clinical manifestations, EC specific antibodies, HLA DQ2 and DQ8 haplotypes, and Enteropathy. It is characterized by histological changes at the mucosal level of the small intestine such as villous atrophy and/or cryptic hyperplasia and causes secretion of autoantibodies directed against type 2 transglutaminase (TG2).

The diagnosis of CD is made based on 4 conditions: clinical symptoms, changes and alterations at the level of the intestinal mucosa, serology and HLA. The new diagnostic criteria of ESPHGAN 2012 allow skipping intestinal biopsy in children and adolescents if a number of conditions are met.

CD manifestations may vary from clinical to histological and serological forms, which can occasionally hinder the diagnosis: asymptomatic forms, an apparently normal duodenal mucosa and/or negative serological markers. Thus, in cases where there is difficulty in evaluating the diagnosis, there is a need for new markers such as the presence of subepithelial deposits of anti-transgenic antibodies 2 of the IgA class (anti-TG2 IgA deposits).

The detection of these anti-TG2 intestinal deposits seems to be a very specific and sensitive diagnostic tool in celiac patients, although they can also be detected in other gluten-related pathologies. Thus, it has been described that individuals who present intestinal deposits but without any histological alteration at the level of the intestine, end up developing the disease. However, further studies are needed to confirm the role of TTG dep as a predictive marker in the further development of CD. For the determination of anti-TG2 deposits, an immunofluorescence study will be performed with IB samples from previously frozen patients, incubating them sequentially with anti-TG2 mouse monoclonal antibody, secondary anti-mouse immunoglobulin conjugated with rhodamine (TRICT), and subsequently with Rabbit polyclonal anti-human IgA antibody conjugated to FITC. Autoantibodies form deposits under the epithelial basement membrane and around the mucosa of blood vessels

and crypts and will be detected by fluorescence or confocal microscopy by colocalization of IgA class antibodies (green fluorescence) with TG2 (red fluorescence).

Autoantibodies can also be detected in the serum of celiac patients who are on a normal gluten diet and can be present for a longer period even if they start a gluten-free diet (GFD). The relationship between the persistence of autoantibodies and the duration of GFD has been studied in organ culture to assess the gluten-dynamic toxicity of their disappearance after initiating a GFD varies by individuals, negativizing between 6 and 18 months after starting the diet.

The aim of the present study is to evaluate the diagnostic value of the determination of subepithelial deposits of type 2 anti-transglutaminase (anti-TG2) in the pediatric population as a marker of CD. This will include patients aged 0-16 years who have had an Intestinal Biopsy and a retrospective study of deposits. We will analyze the results of the deposits in relation to different variables: final diagnosis, serology (anti-TG2 IgA), genetic predisposition HLA compatible and the degree of histological lesion.

**KEY WORDS: Celiac disease, subepithelial deposits of transglutaminase-type 2 antibodies, gluten, intestinal biopsy, HLA.**



## **DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS**

**Quisiera agradecer a varias personas la ayuda que me han prestado en la realización de este Trabajo Fin de Grado. Entre ellas y en primer lugar a mi cotutora pero sobre todo amiga por todo lo que me ha enseñado, aconsejado y confiado en mí durante estos meses.**

**También a mi tutora del Hospital Universitari i Politècnic La Fe por darme la oportunidad de contar con su servicio para la realización del estudio así como para con la colaboración de otros proyectos.**

**A mi tutor de la Universitat Politècnica de Valencia, por estar dispuesto a instruirme y dedicarme su tiempo y su conocimiento.**

**Gracias a la nueva gente que he conocido, a Maria, Mar, Natalia y Sara por su cercanía y simpatía, que han hecho que los días en el laboratorio hayan estado cargados de alegría, y a Miguel por su compañía y encanto.**

**A mi familia, en especial a mis padres, por ser un apoyo constante e incondicional.**

**Y por último quiero agradecer al Servicio de Gastroenterología Pediátrica del Hospital Universitario y Politécnico La Fe, al Servicio de Microscopia y a la Unidad de Bioestadística del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe por hacer posible gran parte de este trabajo.**



## Índice

RESUMEN.....	1
Depósitos subepiteliales de Anticuerpos anti-TG2 como marcador inmunológico de la Enfermedad Celíaca. ....	1
ABSTRACT .....	2
Subepithelial deposits of anti-TG2 antibodies as an immunological marker of Celiac Disease. ....	2
DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS .....	4
1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	8
3. Material y métodos.....	9
3.1. Población de estudio.....	9
3.2. Metodología.....	10
3.2.1. Muestras duodenales obtenidas por cápsula/endoscopia.....	10
3.2.2. Protocolo de inmunofluorescencia doble para IgA in situ y TTG. ....	13
3.2.3. Lectura e interpretación de resultados de la muestra: .....	15
3.2.4. Análisis estadístico .....	15
4. Resultados.....	15
4.1. Proceso de elección de BI para el estudio .....	15
4.1.1. BI diagnósticas .....	20
4.1.2. BI de pacientes en remisión.....	21
5. Discusión.....	22
6. Conclusiones .....	24
7. Referencias bibliográficas .....	25
8. ANEXO 1.....	27

# 1. Introducción

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía crónica inmuno-mediada provocada por la ingesta del gluten y otras proteínas afines, que afecta a individuos genéticamente susceptibles. Entre las manifestaciones clínicas destacan la aparición de anticuerpos específicos de EC: los anticuerpos anti-transglutaminasa tisular (TG2), así como los anticuerpos anti-endomisio (EMA) y anticuerpos anti-péptidos deaminados de gliadina (DGP) y la enteropatía que da lugar a una atrofia vellositaria, infiltración linfocítica en el epitelio e hiperplasia de las criptas. En la actualidad el concepto EC se ha visto ampliado y la interacción entre el sistema inmunológico y el gluten puede producir lesiones a nivel de la piel (dermatitis herpetiforme), mucosa oral (estomatitis aftosa de repetición), articulaciones (algunas artritis) o hígado. Esta intolerancia se presenta de forma permanente, durante toda la vida, en individuos con predisposición genética que expresan moléculas HLA de clase II DQ2/DQ8. A pesar de que existen estudios retrospectivos que apuntaban que la presencia de factores ambientales tales como la ausencia de lactancia materna, la incorporación temprana de los cereales que contienen gluten o la ingesta de una gran cantidad de los mismos, estudios actuales (Vriezinga et al, 2014; Elena Lionetti et al, 2014) indican que la introducción tardía del gluten después de los doce meses solo retrasa su inicio y la lactancia materna a cualquier edad no proporciona protección contra su aparición. Además tampoco está claro que dependa de otros factores como el consumo excesivo de antibióticos, la feroterapia durante la gestación o las vacunaciones, por la modulación que producen sobre la inmunidad. El último estudio publicado en ratones llevado a cabo por Romain Bouziat et al. describe la posibilidad de que la infección por reovirus de la cepa T1L desencadenar respuestas inflamatorias a los antígenos del gluten y el consiguiente desarrollo de la enfermedad celíaca.

El tratamiento consiste en una DExG durante toda la vida que conduce a la desaparición de las lesiones enteropáticas, la normalización de la serología y la regeneración de la mucosa intestinal en la gran mayoría de los pacientes. Se recomienda tanto en pacientes sintomáticos como asintomáticos y con ello se consigue la mejoría de los síntomas a partir de las dos semanas aproximadamente y la recuperación total alrededor de los 2 años de inicio del mismo. De lo contrario puede derivar en complicaciones como fracturas óseas, infertilidad u osteopenia o enfermedades neoplásicas del tracto digestivo. Asimismo se están estudiando otras terapias alternativas como las estrategias farmacológicas que incluyen enzimas para inactivar los péptidos inmunogénicos del gluten, moduladores de la permeabilidad, desarrollo de vacunas que induzcan tolerancia al gluten, agentes que capturen el gluten en el lumen intestinal o inhibidores de TG2.

El gluten es una proteína presente en el trigo, la cebada y el centeno formada por las glicoproteínas gliadina y glutenina ricas en los aminoácidos prolina y glutamina responsables de ocasionar la reacción autoinmune e inducir pequeñas alteraciones en la mucosa intestinal. La gliadina contiene porciones peptídicas tóxicas que no son asimilables y que no se eliminan, dando lugar a la infiltración de la mucosa intestinal y a una característica respuesta autoinmune donde aumenta el nivel de anticuerpos intraepiteliales, útiles para el diagnóstico a través de técnicas que se explicaran más adelante. De forma singular, estos péptidos infiltran

la lámina propia generalmente en la mucosa de la parte superior del intestino delgado que sufre un aumento de la permeabilidad y se acumulan en el lumen intestinal porque son resistentes a la degradación gástrica y pancreática por las proteasas de la membrana del borde en cepillo del intestino humano. La hipótesis que hay vigente es que la reacción inflamatoria se desencadena en respuesta al ácido glutámico cargado negativamente, producido a partir de la transformación del péptido glutamina por la transglutaminasa tisular de tipo 2. Incluye una respuesta innata mediada por linfocitos intraepiteliales de la mucosa y una respuesta adaptativa mediada por linfocitos de la submucosa. Lo más curioso es la presencia en suero de (anticuerpos antigliadina) AGA, DGP y anti-TG2, pero también de linfocitos T gliadina-específicos que son los auténticos responsables de la respuesta inmune patológica a los péptidos de gluten. Estos proporcionan a los linfocitos B la cooperación necesaria para producir tanto DGP como anti-TG2.

Desde el punto de vista patogénico, la mayoría de modelos descritos de la EC consideran la enfermedad de base multifactorial, en la que se combinan tanto factores genéticos como ambientales, de modo que se requiere que ambos estén presentes para padecerla. Se ha visto que la EC se desarrolla necesariamente en personas que posean los alelos que codifican para las moléculas HLA-DQ2 o HLA-DQ8. Sin embargo, existen muchos sujetos con dichos alelos que no han desarrollado la enfermedad, por eso su presencia es necesaria pero no suficiente. La patogenia, ha experimentado un incremento de la prevalencia en los últimos treinta años y se considera una de las enfermedades genéticas más frecuentes entre la población caucásica que afecta a niños y adultos. Está presente en el 1% de la población europea considerándose inicialmente propia de esta zona por ser habitual una dieta rica en alimentos que contienen gluten. Por otro lado, debido a cambios globales en la dieta, actualmente es observada también en otros países de Asia, Sudamérica, Oriente Medio y África.

Las personas que se ven afectadas por la EC constituyen cada vez un porcentaje mayor de la población, esto es debido a que previamente, los datos se basaban solamente en los casos sintomáticos y diagnosticados, no teniendo en cuenta aquellos casos en los que no se presentaba sintomatología clínica y dando lugar a un enorme sesgo de las cifras reales. La explicación de esta situación fue interpretada por Richard Logan en 1991, quien describió la teoría del "iceberg celíaco". El iceberg completo simbolizaría la auténtica incidencia de la EC, mientras que la parte visible y la zona situada debajo del agua representarían los casos diagnosticados y no diagnosticados, respectivamente. Por ello se estudiaron grandes grupos de población, para detectar a los sujetos asintomáticos pero celíacos que aportaría datos más significativos de la prevalencia de la enfermedad y con una menor variabilidad (estudio de despistaje). El aumento en el número de casos diagnosticados de EC ha sido observado en paralelo con la epidemiología de otras enfermedades de base inmunológica como la diabetes mellitus tipo I, la hepatitis autoinmune o la tiroiditis. Esto junto con los cambios ambientales y del estilo de vida y la mejoría en los planes de detección ha hecho que los datos actualmente sean mucho más representativos. Asimismo, hay que tener en consideración que al tratarse de una enfermedad de base genética bien establecida, la distribución geográfica de los alelos de riesgo es un factor importante para el estudio, aunque debido a la heterogeneidad de los datos no se ha encontrado una correlación significativa entre la prevalencia de la EC y la

frecuencia de los genes que predisponen a esta enfermedad, pues en algunos países la frecuencia de los alelos de riesgo no coincide con la etnia dominante para EC. En estos polémicos casos, una posible explicación a la heterogeneidad es la diversa metodología empleada por distintos laboratorios y los rangos de edad considerados.

Durante más de 20 años se han mantenido los criterios y definición de EC previos que seguían manteniendo la realización de una primera biopsia como indispensable para el diagnóstico de la EC. Esto ha cambiado y los últimos estudios han demostrado, especialmente en la población pediátrica, una correlación positiva entre niveles elevados de TTG y gravedad de la lesión intestinal. Valores altos de TTG se encuentran relacionados generalmente con atrofas vellositarias de grado MARSH III. La reconsideración de los criterios de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición pediátrica (ESPGHAN) (Husby S, et al. 2012) (Figura 1) sirvió para aclarar una serie de cuestiones, hasta ese momento inciertas, como el papel que jugaban los antígenos del complejo de histocompatibilidad (HLA) o la finalidad de la BI en cuanto al valor diagnóstico. Se vio que un bajo porcentaje de los individuos HLA DQ2 o DQ8 desarrollaban la enfermedad, con lo que el empleo de esta pauta para la evaluación no era suficiente. Cuando todavía no estaba tan estudiada la enfermedad, su diagnóstico se basaba meramente en la sintomatología del paciente y por tanto se pensaba que afectaba a un bajo porcentaje de niños europeos, sin embargo esto no era del todo cierto y hoy en día ha cambiado esta idea, sabiendo que afecta a un alto porcentaje de personas tanto a niños como a adultos, explicando que se trata de una enfermedad con predisposición genética y bastante común. Los nuevos hallazgos han sugerido una diferenciación clave entre dos grupos de pacientes: sintomáticos y asintomáticos de riesgo, por los que se establecerán diferentes medidas diagnósticas.

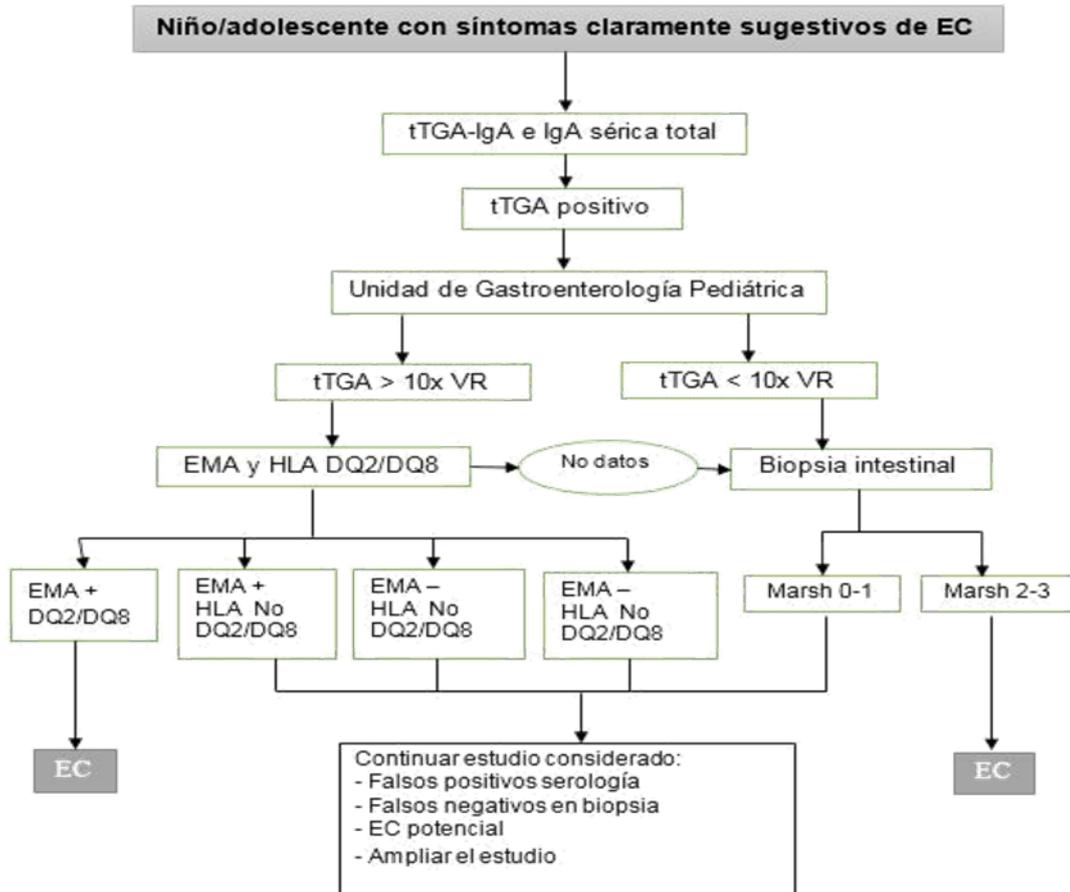


Figura 1. Aproximación diagnóstica en pacientes con sospecha de EC. Adaptada de: Ribes et al., 2017.

Actualmente hay 4 herramientas diagnósticas: sintomatología clínica de los pacientes, marcadores genéticos, marcadores serológicos y realización de biopsia duodenal:

- **Clínica:** La posibilidad de EC debe contemplarse en niños con síntomas clásicos de malabsorción intestinal y afectación nutricional, pero también ante una amplia variedad de síntomas no exclusivamente digestivos como la pérdida de peso, diarrea crónica, náuseas y vómitos, fatiga crónica, anemia o retraso puberal entre otros (ver tabla 1).

**Tabla 1. Sintomatología en pacientes con diagnóstico de EC.**

**Síntomas típicos:**

- Diarrea crónica
- Distensión abdominal
- Desnutrición
- Anorexia

**Síntomas atípicos:**

- Digestivos:
  - Dispepsia
  - Dolor abdominal recidivante
  - Vómitos recidivantes
  - Pirosis y regurgitación
  - Diarrea crónica de características funcionales
  - Síndrome del intestino irritable con predominio de diarrea
- Extradigestivos:
  - Anemia ferropénica
  - Osteopenia u osteoporosis
  - Dermatitis herpetiforme, hiperqueratosis folicular, erupciones cutáneas
  - Aftas bucales recidivantes
  - Hipertransaminasemia
  - Insuficiencia pancreática exocrina
  - Astenia, irritabilidad, ansiedad, depresión
  - Miopatía proximal, parestesias, tetania
  - Cefaleas, epilepsia, ataxia, neuropatía periférica
  - Alteraciones en el esmalte dental
  - Infertilidad, abortos recurrentes, amenorrea
  - Hipoesplenismo

*Adaptada de Vivas et al., 2011.*

Fruto de recientes investigaciones se ha determinado que las lesiones de la mucosa intestinal no son consecuencia indispensable para que el individuo padezca la enfermedad. Pacientes asintomáticos, pero potenciales, se caracterizan por poseer serología notoriamente positiva pero sin manifestación de lesiones fisiológicas. Estos normalmente son individuos que padecen otras enfermedades autoinmunes o que tienen familiares de primer grado con EC y que pertenecen por tanto a los grupos de riesgo en los que igualmente debe sospecharse la EC. Las lesiones de la mucosa intestinal se clasifican según el grado de MARSH, que puede tomar los valores de 0 a III, siendo característico de EC los Marsh II-III y considerándose los pacientes con lesiones de tipo 0-I y con serología positiva como potenciales y por tanto en los que se necesita una herramienta que ayude a confirmar la enfermedad.

• **Marcadores genéticos (HLA):** Existe una baja probabilidad de desarrollar la EC en individuos NO DQ2 y DQ8. Por otra parte, solo el 3% de los individuos con haplotipo positivo desarrolla la enfermedad y por tanto los marcadores genéticos tienen poca especificidad como herramienta diagnóstica, por lo que su estudio es especialmente útil para descartarla. Entre individuos portadores del HLA de riesgo, la presencia de dos copias de estos alelos aumenta la probabilidad a padecer la EC, hecho que puede ser explicado por la existencia de la

codominancia entre ambos, que aumenta la cantidad de moléculas dispuestas en la membrana celular de individuos homocigotos.

• **Marcadores serológicos:** La primera herramienta serológica útil para el diagnóstico fueron los AGA, sin embargo son detectados también en individuos sanos y en individuos que presentan otras formas de enteropatía no celíaca. El descubrimiento de los EMA y los anti-TG2 reemplazó el diagnóstico por AGA al tratarse de material con una sensibilidad similar pero especificidad superior. Posteriormente, el hallazgo de los linfocitos T DQ2/DQ8 relanzó el interés por los anticuerpos AGA, pero esta vez como anticuerpos DGP mucho más específicos de EC. De esta forma, serán los anticuerpos IgA anti-Tg2 y IgG anti-DGP los utilizados actualmente en la práctica mayoría de los casos para el diagnóstico de la enfermedad. Aun así, existe un reducido número de pacientes en los que se debe llevar a cabo un diagnóstico personalizado utilizando otros mecanismos como la citometría de flujo o la presencia de anticuerpos IgG anti-TG2 o IgA anti-DGP.

Los test serológicos de AAE tienen una especificidad de entre 98-100% siendo modelo de referencia de los Ac-EC-específicos y jugando un papel importante en la valoración de la enfermedad. En ausencia de anticuerpos de EC, el diagnóstico en niños es improbable.

• **Biopsias intestinales:** Inicialmente se estableció la regla de las 3 biopsias que tenía como objetivo diferenciar la EC de otras causas de enteropatía (BI diagnóstica, BI pre-provocación y BI post-provocación). Sin embargo, a partir de los nuevos criterios de la ESPGHAN 2012 se permite excluir la biopsia en sujetos sintomáticos con TG2-IgA > 10xVR, verificados por EMA y HLA DQ2 y/o DQ8 positivos, y solo en este supuesto en pacientes pediátricos y adolescentes. Aun así, esta metodología no está del todo extendida y se sigue realizando BI en la mayoría de pacientes pediátricos, pues permite su estudio a nivel histológico para evaluar el grado de lesión.

Tras la fijación de la muestra, se realizará una tinción con hematoxilina/eosina para su valoración por el anatomopatólogo. La BI se puede realizar mediante endoscopia o cápsula Crosby, en el primer caso se toma una sola muestra y en el segundo se tomarán varias. Parte de la biopsia cuando es realizada por cápsula o bien una de las 4 muestras de la biopsia en el caso de la técnica endoscópica se remitirá al laboratorio de análisis clínico donde se llevará a cabo la determinación de depósitos subepiteliales en la mucosa de anticuerpos específicos contra EC como ensayo complementario que ayudará en la diagnosis temprana de la enfermedad.

#### **Clasificación anatomopatológica de la mucosa intestinal según los grados de MARSH (figura 2):**

GRADO I: Lesión infiltrativa

- 1) Arquitectura morfológica de las vellosidades y radio de las criptas dentro de los valores normales.
- 2) Aumento del número de linfocitos intraepiteliales (más de 25-30 por 100 células epiteliales).

GRADO II: Lesión hiperplásica

- 1) Arquitectura morfológica de las vellosidades dentro de los límites normales. (como en el grado I)
- 2) Aumento del número de linfocitos intraepiteliales (más de 25-30 por 100 células epiteliales).
- 3) Hiperplasia de elementos glandulares → Regeneración de los elementos glandulares aumentada por la reducida actividad de la mucífera y el número de mitosis.

GRADO III: Lesión destructiva

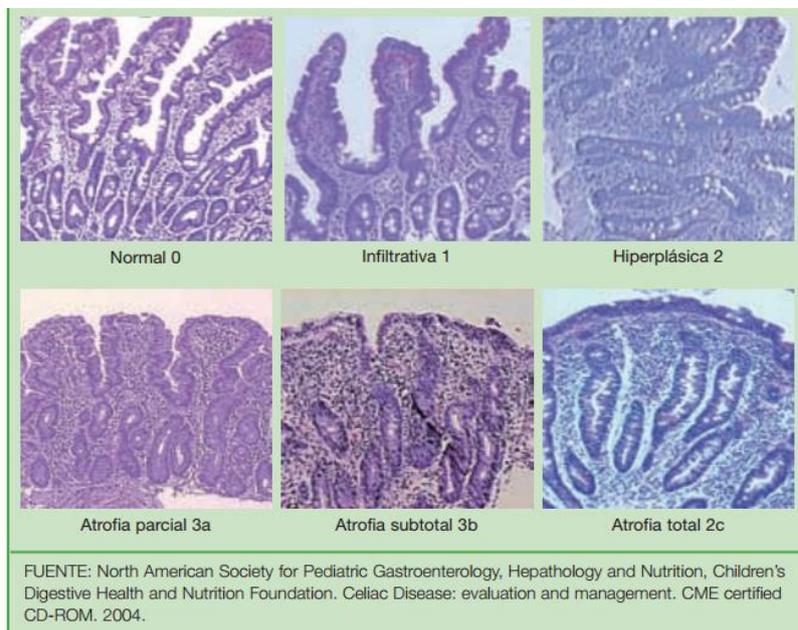
- 1) Diferentes grados de atrofia vellositaria asociada con hiperplasia glandular de las criptas.
- 2) Relación altura-superficie de los enterocitos reducida, bordes en forma de cepillo irregulares y vacuolas citoplasmáticas en algunos casos.
- 3) Incremento en el número de linfocitos intraepiteliales.

Esta categoría se subdivide a la vez en 3 grupos según el grado de atrofia vellositaria:

IIIa: Atrofia vellositaria leve e incremento patológico de los linfocitos intraepiteliales.

IIIb: Atrofia vellositaria moderada e incremento patológico de linfocitos intraepiteliales.

IIIc: Atrofia vellositaria total e incremento patológico de linfocitos intraepiteliales.



*Figura 2. Clasificación de Marsh de las lesiones del intestino delgado*

En los tres casos la lesión es considerada dinámica y progresiva hacia el grado máximo. Esta clasificación está reconocida universalmente para el diagnóstico de la enfermedad para simplificar y facilitar la labor de los anatomopatólogos.

Con respecto a lo explicado anteriormente, la realización de una biopsia duodenal es útil para valorar el grado de atrofia vellositaria y evitar diagnósticos incorrectos en los casos en los que por los motivos citados anteriormente no puede obviarse. Del mismo modo, en lesiones de bajo grado deben utilizarse métodos complementarios para el estudio de las biopsias como la citometría de flujo o la determinación de los depósitos subepiteliales de IgG-TG2 en la mucosa.

En estudios adicionales, los depósitos de Ac-TG2 han sido encontrados no solamente en el tracto intestinal, sino también a nivel extracelular en los nódulos linfáticos, hígado o tejido muscular. Evidencias clínicas y manifestaciones de la misma fuera del intestino han hecho que la EC pase a considerarse una enfermedad sistémica, no afectando exclusivamente al intestino delgado. Se ha demostrado que los depósitos de Ac-TG2 en el intestino delgado pueden ser detectados antes incluso de llegar a la circulación y por ello, su aparición es anterior a la lesión yeyunal que tiene como consecuencia la obstrucción subepitelial que lleva a la pérdida de las células epiteliales superficiales de la mucosa. También se ha expuesto que la deposición de estos anticuerpos es notablemente alta alrededor de los vasos sanguíneos, remodelándolos e influenciando en su función nutritiva y estructural.

En los últimos años han tomado importancia otras formas de manifestación clínica como puede ser la EC atípica y silente no diagnosticada y por tanto no tratada que explica el aumento de la morbilidad de la enfermedad reflejado en considerables publicaciones. La enfermedad no tratada puede derivar en una serie de complicaciones como retraso en la pubertad, incremento de la frecuencia de aberraciones cromosómicas, osteopenia y osteoporosis, enfermedades reumatológicas, anemias refractarias, alteración del desarrollo, desarrollo de linfoma de células T, hepatopatía, etc. que pueden manifestarse tanto en adolescentes como en adultos y con distinto nivel de impacto en la calidad de vida del paciente. En casos en los que mediante los criterios habituales el diagnóstico de EC ofrece dudas, como la evaluación de casos complejos y de formas latentes o potenciales, se investigará si la determinación de depósitos anti-TG2 IgA en mucosa es una herramienta eficaz en la práctica clínica.

## 2. Objetivos

La *hipótesis de trabajo* se basa en que los depósitos subepiteliales de anticuerpos anti-TG2 IgA son un marcador altamente específico para el diagnóstico de la Enfermedad Celíaca, pero pueden existir falsos positivos en pacientes con patologías autoinmunes como DM1.

### **OBJETIVOS CONCRETOS DE LA INVESTIGACIÓN PROPUESTA:**

Objetivo principal:

- El objetivo principal del estudio es valorar la utilidad de la detección de depósitos intestinales anti-TG2 IgA como herramienta complementaria en el diagnóstico de EC.

Objetivos secundarios:

- Valorar la eficacia de la determinación de depósitos anti-TG2 IgA en biopsias intestinales en una población pediátrica con patologías digestivas diversas como la IPLV, alergias alimentarias, esofagitis eosinofílica en las que se puede plantear el diagnóstico dudoso diferencial con la EC.
- Valorar la eficacia de la determinación de depósitos anti-TG2 IgA en biopsias intestinales en una población pediátrica con una enfermedad autoinmune, como diabetes mellitus tipo I.

### 3. Material y métodos

#### 3.1. Población de estudio

Se incluyen en el estudio todos los pacientes comprendidos entre 0 y 16 años de edad remitidos a la Unidad de Gastroenterología Pediátrica del Hospital La Fe a los que se les había realizado Biopsia Intestinal y estudio de depósitos, entre los años 1998-2017. Además se realizaron depósitos en una selección aleatoria de pacientes con serología positiva, histología Marsh tipo III y diagnóstico final de EC, de los que se disponía tanto de BI congelada como del consentimiento informado. Se analizarán dichos resultados en relación con diferentes variables: diagnóstico final, serología (anti-TG2 IgA), predisposición genética HLA compatible, grado de lesión histológica y clínica sintomática.

Criterios de inclusión /exclusión:

1. Niños con diagnóstico de EC confirmado: diagnosticados por criterios clínicos actualmente aceptados (ESPGHAN 1990 o ESPGHAN 2012): serología anti-TG2 IgA/EMA positiva, HLA compatible y con histología grado de MARSH III o 0-I (sin atrofia vellositaria).

*-Criterios de inclusión:*

- Niños con edades comprendidas entre 0 y 16 años con diagnóstico de EC.
- Niños con ingesta de gluten en el momento de la realización de la biopsia.

*-Criterios de exclusión:*

- Niños con DExG en el momento del Diagnóstico.
- Niños en los que el diagnóstico de EC no sea firme o se desestime en el periodo de seguimiento.

2. Grupo Control (No EC) con otras patologías como el reflujo gastroesofágico, alergia a las proteínas de leche de vaca no IgE mediada o Diabetes Mellitus tipo I.

*-Criterios de inclusión:*



- Niños con edades comprendidas entre 0 y 16 años con otra patología o en los que se haya descartado el diagnóstico de EC.
- Niños a los que se les ha realizado BI y en las que se ha realizado depósitos anti-TG2 IgA.

*-Criterios de exclusión:*

- Niños que no tengan un diagnóstico concreto.

3. Niños con diagnóstico de EC confirmado con más de 2 años de DExG: diagnosticados por criterios clínicos actualmente aceptados (ESPGHAN 1990 o ESPGHAN 2012).

*-Criterios de inclusión:*

- Niños con edades comprendidas entre 0 y 16 años con diagnóstico de EC.
- Niños con DExG el momento de la realización de la biopsia (pre-provocación).

*-Criterios de exclusión:*

- Niños en los que el diagnóstico de EC no sea firme o se desestime en el periodo de seguimiento.

## **3.2. Metodología**

A partir de una base de datos anonimizada iniciada en febrero de 1998 hasta la actualidad (2017), se analizarán datos referentes a la serología (anticuerpo anti-endomisio, anticuerpo antitransglutaminasa y anticuerpo antigliadina), histología de biopsia intestinal, resultados de depósitos de antiTG2 en muestras de biopsia intestinal y diagnóstico clínico de pacientes pediátricos que cumplan los criterios de inclusión del proyecto. Las muestras fueron recogidas tras haber obtenido el consentimiento informado de uno de los padres o tutores legales.

### **3.2.1. Muestras duodenales obtenidas por cápsula/endoscopia.**

#### **3.2.1.1. Congelación de muestras duodenales**

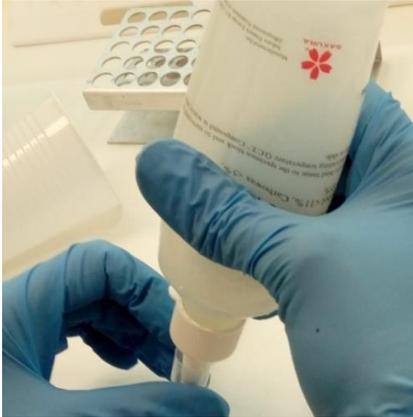
Material:

- Muestra de mucosa intestinal de paciente obtenida por método endoscópico o por cápsula.
- Caja de poliexpan o recipiente capaz de contener Nitrógeno Líquido.
- Nitrógeno líquido.
- O.C.T. (gel para inmersión de muestras para congelación).
- Suero fisiológico.

- Congelador con una temperatura que alcanza los  $-40^{\circ}\text{C}$  (Arcón Candy).
- Guantes.
- Ficha del paciente (de  $5\text{ cm}^2$  aproximadamente).
- Bolsa de plástico (aproximadamente de  $6\times 8\text{ cm.}$ ) con cierre y etiqueta para nombrar la muestra.
- Papel de aluminio, parafilm.
- Tijeras, pinzas, bisturí o aguja.
- Vidrio de reloj.
- Molde de plástico.
- Criostato de precisión '*Leica CM 1950, 50Hz*' para manipulación de material congelado.

Método:

1. En el momento de la obtención de la muestra, ésta se coloca sobre un vidrio de reloj y se humedece con suero fisiológico. A continuación, se cumplimenta una ficha con los datos del paciente.
2. Del mismo modo, se escriben los datos del paciente en la etiqueta de la bolsa de plástico donde se guardará la muestra y se recorta una porción de papel de aluminio y otra de parafilm de  $5\text{ cm}^2$  cada uno.
3. Se rellena de Nitrógeno líquido la caja de poliexpan para proceder a la correcta congelación de la muestra.
4. Se dispone una gota de O.C.T en el molde de plástico (Figura 3), sucesivamente se coloca la BI con la orientación y extensión adecuada (Figura 4) y se dispone sobre la misma otra gota de O.C.T para cubrirla.
5. Cuando el O.C.T se endurece (se vuelve blanco) se saca (ver figura 5) y se vuelve a sumergir todo en Nitrógeno líquido. Luego se saca y se deja calentar unos segundos entre las manos hasta que se consiga despegar la muestra del molde de plástico.
6. A continuación se envuelve con el papel de aluminio y después con el parafilm.
7. Se introduce en la bolsa de plástico junto con la ficha con los datos del paciente.
8. Se conserva la bolsa en el congelador a  $-40^{\circ}\text{C}$ .



*Figura 3. Introducción de OCT en molde de plástico para congelar la muestra de BI.*



*Figura 4. BI orientada en horizontal embebida en OCT.*



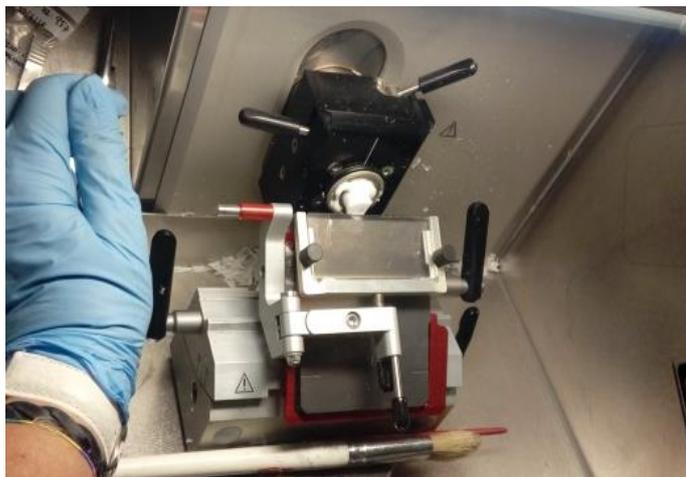
*Figura 5. Muestra recién congelada con NI en fase gas.*

### ***3.2.1.2. Realización de cortes en criostato***

Se cortaron las muestras de mucosa intestinal a  $5\mu\text{m}$  de grosor en criostato (Figuras 6 y 7) a una temperatura de  $-22^{\circ}\text{C}$  y se colocaron las muestras sobre cada una de las 10 secciones en las que se divide el portaobjetos (Figura 8; Anexo 1). Los cortes pueden ser almacenados durante 3 meses a  $-20^{\circ}\text{C}$  antes de realizar la tinción, mantenidas en envase de plástico al vacío, para evitar que se deterioren las mismas. En nuestro caso, se tiñeron las secciones de muestra cortadas en un período no superior a 1 semana.



*Figura 6. Criostato Leica CM 1950, 50 Hz.*



*Figura 7. Fijación de la muestra en el cabezal portamuestras.*

### 3.2.2. Protocolo de inmunofluorescencia doble para IgA in situ y TTG.

#### 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 tetraodamina (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 debido a su mayor fotoestabilidad o fluorescencia con características espectrales distintas. Este se empezó a usar a partir de 2014 hasta la actualidad y se observó que los resultados en cuanto a la especificidad de detección de los depósitos anti-TG2 mejoraba, así como su sensibilidad. Además, se utilizó una dilución más concentrada (1:50). Debido a la variabilidad de los protocolos de tinción según sobre qué tejido se aplique, la dilución apropiada del anticuerpo se determinará empíricamente. Los fragmentos de anticuerpos conjugados con fluoresceína son muchas veces preferibles al anticuerpo entero conjugado en técnicas de detección secundaria, pues la ausencia de la región constante (Fc) de los anticuerpos previene interacciones con membranas portadoras de receptores Fc, evitando la reactividad cruzada (ocurre cuando un anticuerpo secundario es capaz de reconocer distintos anticuerpos primarios dando lugar a falsos positivos). Para ello, los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> se preparan a partir de anticuerpos adsorbidos contra IgG humanas y suero y después se marcan con la molécula adecuada. El grado de marcaje para cada conjugado es generalmente de 2 a 6 fluoróforos en este caso por fragmento, mientras que para marcar un anticuerpo entero se requieren de 2 a 8 moléculas.
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) respectivamente dentro de la muestra; divisor de rayos dicróico que refleja la luz en la banda de excitación y la transmite en la banda de emisión; 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 (Figura 9).
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. Este equipo, es de gran utilidad y se empleó en el estudio de los depósitos de TG2 en mucosa intestinal, por aportar determinadas ventajas frente a la microscopia de fluorescencia convencional. Se realizaron estudios de colocalización de TTG e IgA utilizando como marcadores TRITC/Alexa y FITC. Se

capturaron y visualizaron imágenes de colocalización que permitían la determinación de la existencia o no 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. Por ello, el microscopio confocal se utilizó en muestras con baja intensidad de tinción o duda en la valoración de la determinación de depósitos anti-TG2 (Figura 10).

Método: Técnica de inmunofluorescencia doble.

1. Una vez las muestras estaban congeladas y cortadas, se prepararon las diluciones con los diferentes anticuerpos. Para ello se nombraron 3 tubos eppendorf con cada uno de los anticuerpos conjugados y se dispensaron 2 mL de PBS. Posteriormente se añadieron 10 $\mu$ L de Ab-CUB7402 (dilución 1:200), 17 $\mu$ L de Ab-TRITC (dilución 1:120), 50 $\mu$ L de Ab-FITC (dilución 1:40) en sus tubos correspondientes y se agitaron.
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 portas con papel absorbente. A continuación, se cubrieron las 10 secciones del porta con 20 $\mu$ L 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 portas con papel absorbente. Se cubrieron las 10 secciones del porta con 20 $\mu$ L de la dilución 1:120 de Ac de conejo anti-Ig de ratón (Ab-TRITC) 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 portas con papel absorbente. Se cubrieron las 3 secciones del porta con 20 $\mu$ L 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 portas con papel absorbente. Con la pipeta Pasteur, 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, sin embargo, los portas se podían mantener en una cámara fría (+5/+7 $^{\circ}$ C) durante una semana o congelarse a -20/-70 $^{\circ}$ C durante un año o año y medio.
10. Se observó 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.

### 3.2.3. Lectura e interpretación de resultados de la muestra:

Aunque se trata de una técnica sencilla, la lectura e interpretación se realiza a ciegas por dos técnicos expertos. 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 (+), positivo medio (++) y positivo fuerte (+++).

Se toman 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 (Figuras 13 y 14; Anexo 1).

Al observar la misma sección bajo el filtro correspondiente a la rodamina se podrá distinguir la TTG (rojo). En el caso de pacientes de EC el patrón de tinción de la TTG es coincidente al patrón de los depósitos extracelulares de IgA (verde) en determinadas localizaciones. Por tanto si observamos simultáneamente ambas tinciones percibiremos que los dos fluorocromos se solapan dando como resultado un color amarillo-naranjado. (Figura 11; Anexo 1).

### 3.2.4. Análisis estadístico

Con el objetivo de resumir la base de datos, se ha realizado un descriptivo mediante la mediana (1er, 3er cuartil) en el caso de las variables cuantitativas y mediante la frecuencia absoluta y relativa en el caso de las variables categóricas. La asociación entre las variables TTG en suero, Grado de Marsh de la BI y la escala de Intensidad de los depósitos anti-TG2 se ha llevado a cabo mediante modelos de regresión ordinal. Los análisis se han realizado con el software estadístico R (versión 3.4.0). Se ha considerado estadísticamente significativo un p-valor inferior a 0,05.

## 4. Resultados

### 4.1. Proceso de elección de BI para el estudio

Se realizó un diagrama en el que se puede observar paso a paso el procedimiento empleado para incluir y descartar las muestras de BI del estudio retrospectivo que se ha realizado (Figura 12). Se basó en BI cuyos depósitos anti-TG2 ya se habían realizado en años anteriores y BI cuyos depósitos fueron realizados durante la investigación.

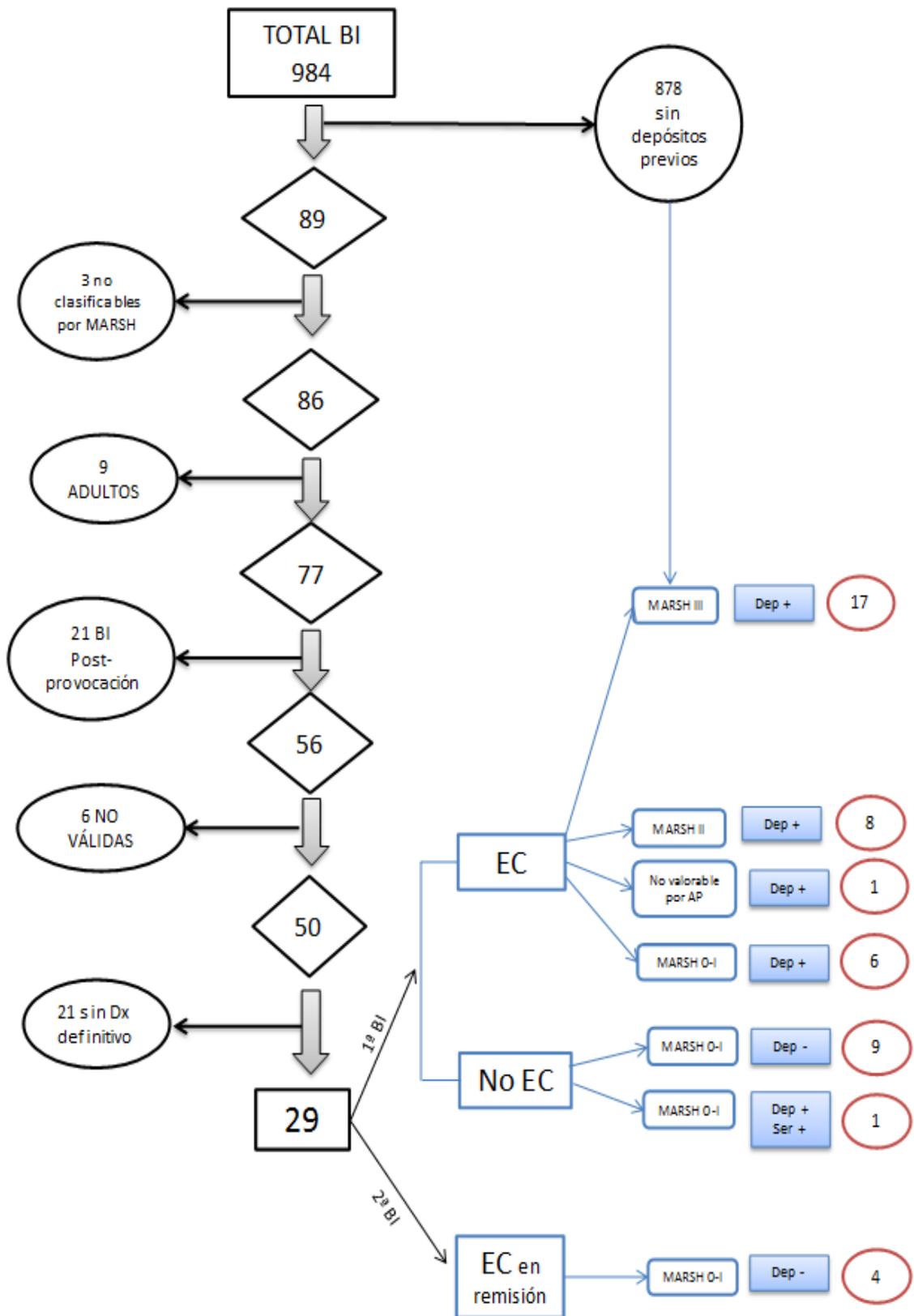


Figura 12. Población de estudio.

El estudio se basó en el análisis de biopsias de intestino delgado realizadas entre 1998 y 2017 en pacientes con sospecha de EC en los que se realizó la determinación de los depósitos anti-TG2. En la tabla 2 se muestra la edad media de la población y los parámetros diagnósticos evaluados.

**Tabla 2. Parámetros diagnósticos evaluados para los diferentes subgrupos de pacientes.**

Variable	n = 42
	Mean (SD)
	Median (1st, 3rd Q.)
Edades (meses)	82.93 (51.71)
	90 (30, 124.5)
Depósitos anti-TG2 IgA	
negativo	9 (21.4%)
positivo	33 (78.6%)
Intensidad depósitos	
0	10 (23.8%)
1	10 (23.8%)
2	14 (33.3%)
3	8 (19.1%)
Grado Marsh	
0	11 (26.2%)
1	5 (11.9%)
2	8 (19.0%)
3	17 (40.5%)
NV	1 (2.4%)
HLA	
C	39 (92.8%)
NC	1 (2.4%)
ND	2 (4.8%)
Dx final	
0	10 (23.8%)
1	26 (61.9%)
2	6 (14.3%)

Los valores 0, 1, 2 y 3 hacen referencia a la intensidad de los depósitos anti-TG2, siendo nulo o negativo para el valor 0, positivo de intensidad débil (1), media (2) y alta (3); y a la gravedad de la lesión de la mucosa intestinal en el caso del Grado de Marsh también en

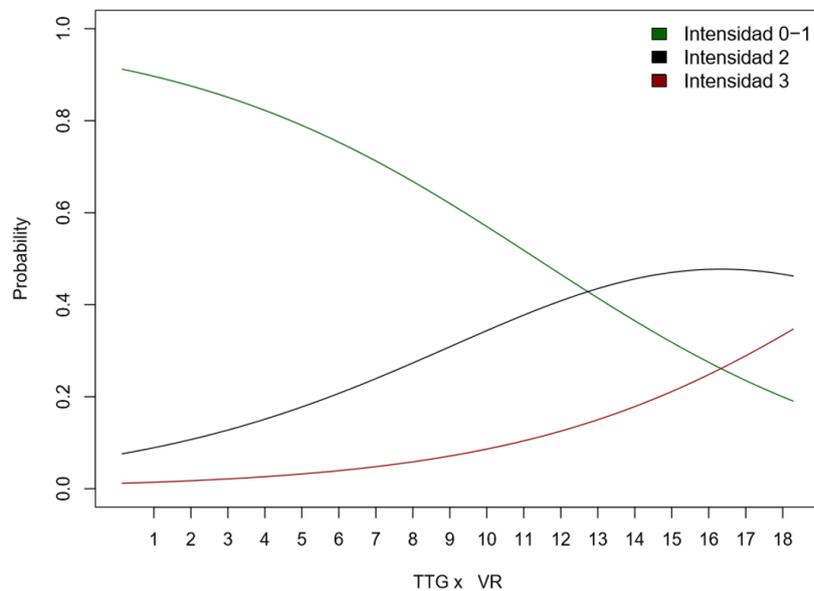
sentido creciente; C y NC explican si el individuo es compatible o no compatible para el HLA; 0, 1 y 2 describen si el individuo es no EC, EC o ECP respectivamente; y NV y ND explican los pacientes para los cuales no es posible valorar el Grado Marsh y de los cuales no existen datos.

Se observa que existe una asociación positiva entre intensidad de depósitos y los niveles de TTG en suero, a mayor intensidad de depósitos anti-TG2 IgA mayores niveles de TTG en suero; mientras que cuando se trata de intensidades 0 y 1, la intensidad de depósitos se vuelve negativa. La relación entre la intensidad de depósitos anti-TG2 y TTG en suero es significativa (Tabla 3; Figura 13).

*Tabla 3. Valores de asociación entre intensidad de depósitos anti- TG2 y TTG en suero.*

	OR	IC 95% OR	P-value
TTG	1.03	[1.017, 1.046]	<0.001

**Nota:** OR: regresión ordinal; IC: intervalo de confianza y P-value: valor que indica si el estudio es o no significativo.



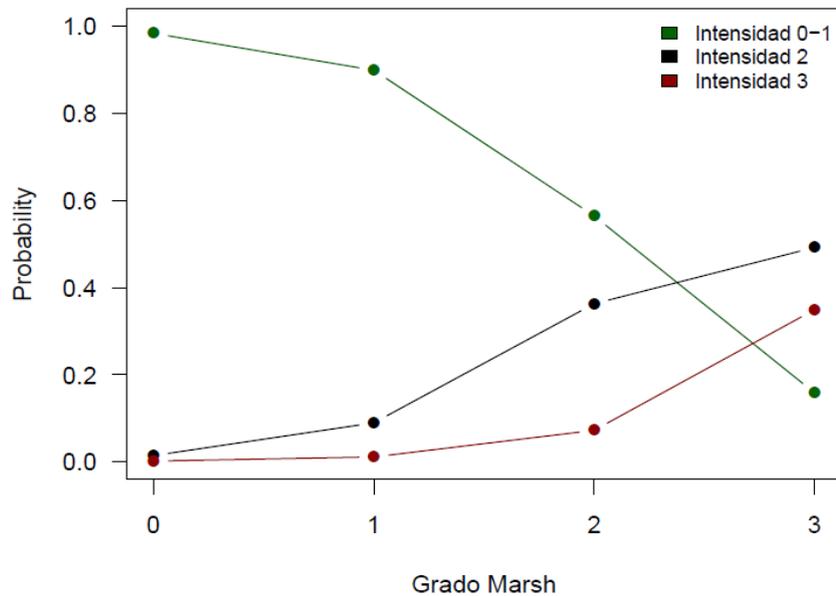
*Figura 13. Relación entre la intens.dad de depósitos anti-TG2 y TTG en suero*

Del mismo modo que en el gráfico anterior, una mayor intensidad de los depósitos anti-TG2 coincide con una lesión histológica mayor y por tanto mayor Grado de Marsh. Además, la

asociación entre el Grado Marsh y la intensidad de los depósitos es significativa (Tabla 4; Figura 14).

*Tabla 4. Valores de asociación entre intensidad de depósitos anti-TG2 y Grado Marsh.*

	OR	IC 95% OR	P-valor
Grado Marsh	6.889	[3.286, 17.453]	<0.001



*Figura 14. Relación entre la intensidad de depósitos anti-TG2 y Grado Marsh.*

Nuestra población se clasificó en 2 grupos: Individuos con diagnóstico de EC y pacientes no EC con un diagnóstico diferente, atendiendo a los criterios del tipo de lesión histológica de la mucosa intestinal propuesta por Marsh-Oberhubert, los marcadores específicos de EC positivos, clínica y HLA, según criterios diagnósticos.

#### 4.1.1. BI diagnósticas

##### • Grupo 1:

El primer grupo consta de 32 pacientes con **diagnóstico final de EC**, que a su vez se divide en dos subgrupos (Tabla 5).

1.1. **Consta de 25 sujetos con lesión histológica de la mucosa intestinal tipo Marsh II-III y 1 paciente con grado de Marsh no valorable en la BI.** Del total, 4 tenían menos de 2 años. Todos los niños tenían niveles de anti-TG2 mayores que el valor de corte (>7 U/mL), incluyendo los niños menores de 2 años. De los 4 niños  $\leq 2$  años, 2 presentaban niveles serológicos de anti-TG2 por debajo del límite de cuantificación superior (128 U/mL).

**En este grupo fueron encontrados evidentes depósitos anti-TG2:** en las secciones duodenales tratadas con la técnica de inmunofluorescencia doble aparecen depósitos específicos para TG2 distinguidos como finas bandas de un color amarillo-naranja con una clara localización por debajo de la membrana basal de las microvellosidades, alrededor de las criptas y de los vasos sanguíneos (Figura 15).

1.2. Está formado por **6 pacientes con lesión histológica de tipo Marsh 0-I, todos ellos con serología positiva** (EC potencial).

Todos presentaron **depósitos subepiteliales anti-TG2, 4 presentaron una tinción medio-fuerte, mientras que en los otros 2 se observaba una distribución irregular caracterizada por zonas con tinción débil** y zonas con elevada tinción junto con otras zonas que resultaban completamente negativas, de ellos 1 era menor de dos años.

##### • Grupo 2

El segundo grupo comprendía **10 pacientes control (no EC), que presentaban una mucosa intestinal de arquitectura normal (Marsh 0-I), 9 de ellos con marcadores serológicos negativos y 1 con marcadores serológicos positivos.** Estos pacientes recibieron diferentes diagnósticos como: alergia a las proteínas de la leche de vaca no IgE mediada (APLV), giardiasis o artritis idiopática juvenil (Tabla 5).

**En 9 de los 10 pacientes no se presentaron depósitos TG2, sin embargo, en el paciente con serología positiva y diagnóstico final de artritis idiopática juvenil, se presentaron depósitos TG2 en las localizaciones específicas.** En la mucosa intestinal de la mayoría de pacientes no celíacos se pudo observar tinción verde tan solo en el interior de las células plasmáticas y epiteliales, mientras que la TG2 (rojo) se localizaba por debajo de la membrana epitelial y alrededor de los vasos sanguíneos y no existía colocalización en las zonas específicas (Figura 16).

*Tabla 5. Presentación de los criterios diagnósticos de los pacientes con 1ª BI.*

	ATG2 /EMA	HISTOLOGIA BI	CLÍNICA	HLA	Dep-TG2	Dx
G1 (n=32)	32 +	17 Marsh III 9 Marsh II 6 Marsh 0-I	10 No síntomas 22 S. digestivos	32 DQ2/DQ8+	32 +	EC
G2 (n=11)	9 - 1 +	10 Marsh 0-I	2 No digestivos 8 S. digestivos	9 DQ2/DQ8+ 1 DQ2/DQ8 -	9 - 1 +	No EC

#### 4.1.2. BI de pacientes en remisión.

Por otro lado, se han tenido en cuenta 4 BI de pacientes con diagnóstico de EC en remisión, que llevaban más de 2 años de DExG. Como se observa, todos los individuos recuperan la normalidad serológica y los niveles de autoanticuerpos desaparecen. En la misma línea, **en 3 de ellos no se detectan depósitos anti-TG2, mientras que en uno sí son detectados** (Tabla 6).

*Tabla 6. Características serológicas e histológicas de pacientes con BI pre-provocación.*

Nº BI	Marcadores Serológicos	Histología MARSH	Dep-TG2
4 EC	ATG2 y EMA-	4 Marsh 0	1+ 3-

## 5. Discusión

En el presente estudio se aplicó a las muestras de biopsia de intestino delgado obtenidas de pacientes pediátricos el método de inmunofluorescencia doble publicado en el año 2004 por Korponay-szabò et al., en el que se muestra que el antígeno diana (TG2) in vivo de la EC se halla en forma de unión in situ de autoanticuerpos específicos.

Nuestros resultados confirman los datos encontrados en estudios publicados, donde depósitos anti-TG2 IgA son detectables en pacientes con EC al diagnóstico, mostrando que los depósitos tuvieron una sensibilidad del 100% en la EC no tratada, exceptuando únicamente a niños menores de 2 años donde la sensibilidad fue del 73%. En nuestro estudio, se detectaron depósitos anti-TG2 IgA en el 100% pacientes EC al diagnóstico, incluidos los 5 niños menores de 2 años.

En estudios previos, se han detectado depósitos TG2 IgA en la mucosa intestinal, así como de forma extracelular en otros órganos, indicativo de que el autoantígeno es ampliamente accesible a los autoanticuerpos producidos de forma sistémica. Evidencias clínicas señalan que la EC debe considerarse como una enfermedad sistémica y no como una patología que afecta solamente al tracto intestinal. También se conoce que los depósitos subepiteliales de anti-TG2 precede la formación de lesiones yeyunales inducidas por el gluten; este hecho puede observarse en los 6 pacientes EC potenciales, con serología positiva y sin lesión histológica en los que se detecta la presencia de depósitos.

La acumulación de estos depósitos subepiteliales está estrechamente relacionada con la mucosa que envuelve a los vasos sanguíneos, donde la deposición de inmunoglobulinas influye en la arquitectura y función nutritiva de los mismos. En consecuencia, la estructura de los vasos se ve afectada, y por ende la angiogénesis, afectando a la regeneración de la mucosa. Nuestros resultados se encuentran en la línea de lo anterior, ya que encontramos una asociación positiva entre la intensidad de los depósitos TG2, la lesión histológica y la TTG en suero; una mayor intensidad de los depósitos anti-TG2 coincide con una lesión histológica mayor y por tanto mayor Grado de Marsh.

En general, la desaparición de títulos de anticuerpos se consigue tras 6-18 meses de la exclusión del gluten de la dieta. De los 4 pacientes con diagnóstico de EC en remisión que llevaban más de 2 años de DExG, todos los individuos recuperaron la normalidad serológica. En 3 de ellos no se presentan depósitos anti-TG2, mientras que en uno permanecen. Es conocido que los autoanticuerpos se depositan en la mucosa del intestino delgado antes incluso de que puedan ser detectados en la circulación y tardan más tiempo en desaparecer de la mucosa.

Se ha investigado la mucosa intestinal de niños con autoanticuerpos asociados a EC pero con mucosa normal (Marsh 0-I). Son pacientes cuya presencia es cada vez más reconocida, representan el 14% de las BI realizadas que progresan hacia lesiones más severas. En este subgrupo de pacientes la positividad de los depósitos intestinales es menos clara, con lesión parcheada. Esta diferencia en la distribución puede deberse a un bajo título de anticuerpos

anti-TG2; de hecho, los niveles de anticuerpos anti-TG2 IgA en pacientes potenciales son menores que en aquellos con una clara atrofia vellositaria. Y además, existe una diferencia estadística significativa ( $p$ -valor $<0,01$ ) entre la intensidad de marcaje de depósitos anti-TG2 IgA observados en pacientes celíacos en fase activa de la enfermedad y los observados en pacientes EC potenciales según un estudio llevado a cabo por Maglio, M., Tosco, A., et al. Por ello, estos individuos representan un reto para el diagnóstico. Todos ellos tienen alelos HLA compatibles con EC y muchos de ellos pertenecen a grupos de riesgo con familiares de primer grado afectados, pacientes con diabetes mellitus tipo I (DM1) y sin presencia de síntomas. En este contexto sería importante la identificación de marcadores predictivos de la evolución hacia el daño de la mucosa intestinal.

Entre los individuos no EC, existe uno con depósitos positivos que sufre esclerodermia, una enfermedad crónica autoinmune caracterizada por afectación cutánea. De este modo puede darse un trastorno del aparato digestivo en forma de disfagia, reflujo gastroesofágico por endurecimiento del esófago y malabsorción de nutrientes que puede derivar en pérdida de peso y episodios repetidos de infecciones bacterianas intestinales. Además en su desarrollo hay una alteración inmunológica por la que se desarrollan autoanticuerpos contra péptidos del propio organismo, algunos de ellos contra la TG2, dando lugar a falsos positivos en relación con el diagnóstico de EC.

Puesto que los cambios histológicos en los órganos afectados no son específicos de EC, el estudio de los depósitos anti-TG2 por inmunofluorescencia directa es considerada una técnica útil en el diagnóstico diferencial de la celiaquía hasta que no se sepa ciertamente el mecanismo que la origina. Por tanto y de acuerdo con previos estudios, aunque los resultados obtenidos apoyan la idea de que los depósitos subepiteliales de IgA son específicos de EC y se conozca que la inmunidad humoral esté involucrada en la patogenia de la EC, se necesitan más estudios que confirmen estos hechos en un mayor número de pacientes.

## 7. Conclusiones

- La detección de depósitos intestinales anti-TG2 IgA **puede ser 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, aunque es una técnica sencilla, su lectura e interpretación requiere una infraestructura y nivel de pericia solo al alcance de laboratorios especializados.
- La detección de los depósitos anti-TG2 IgA **podría ayudar a establecer un diagnóstico diferencial entre EC y otras patologías digestivas** diversas como la IPLV, alergias alimentarias, esofagitis eosinofílica, así como a evitar las dificultades en la interpretación histológica de muestras procedentes de biopsias intestinales.
- En determinadas enfermedades autoinmunes como la esclerodermia pueden presentarse también depósitos anti-TG2, lo que debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados en estos pacientes.

## 7. Referencias bibliográficas

1. Abadie, V., Sollid, L.M., Barreiro, L.B., Jabri, B. (2011). Integra-tion of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol*, 29: 493-525.
2. Agarwal, J., Poddar, U., Yaccha, S.K., Srivastava, A. (2012). Refeeding síndrome in children in developing countries who have celiac disease. *J Ped Gastroenterol Nutr*, 54: 521-4.
3. Bourgey, M., Calcagno, G., Tinto, N., et al. (2007). HLA related genetic risk for coeliac disease. *Gut*, 56: 1054-9.
4. Brown, I., Mino-Kenudson, M., Deshpande, V., Lawers, G.Y. (2006). Intraepithelial lymphocytosis in architecturally preserved proximal small intestinal mucosa: an in-creasing diagnostic problem with a wide differential diagnosis. *Arch Pathol Lab Med*, 130: 1020-5.
5. Cilleruelo, M.L., Fernández Fernández, S., Jiménez Jiménez, J., Rayo, A.I., Hernando de Larramedi, C. Prevalence and natral history of celiac disease in a cohort of at-risk children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016; 62: 739-45.
6. Clouzeau-Girard, H., Rebouissoux, L., Taupin, J.L., Le Bail, B., et al. (2011). HLA-DQ genotyping combined with serological markers for the diagnosis of celiac di-sease: is intestinal biopsy still mandatory? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*; 52: 729-33
7. 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. *Frontiers in Medicine*, 1, 9. <http://doi.org/10.3389/fmed.2014.00009>.
8. Giersiepen, K., Lelgemann, M., Stuhldreher, N., Ronfani, L., Husby, S., Koletzko, S., et al. (2012). Accuracy of diagnostic antibody tests for coeliac disease in children: summary of an evidence report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 54: 229-41.
9. Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, I., Mearin, L., Phillips, A., Shamir, R., et al. (2012). European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis for coeliac disease in children and adolescents. An evidence-based approach. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 54: 136-60.
10. Kang, JY., Kang, AH., Green, A., Gwee, KA., Ho, KY., et al. (2013). Systematic review: worldwide variation in the freequency of coeliac disease and changes over time. *Aliment Pharmacol Ther*, 38: 226-45.
11. Klapp, G., Masip, E., Bolonio, M., Donat, E., Polo, B., Ramos, D., et al. (2013). Coeliac disease: The new proposed ESPGHAN diagnostic criteria do work well in a selected population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 56(3): 251-6.
12. Kurppa, K., Ashorn, M., Iltanen, S., et al. (2010). Celiac disease without villous atrophy in children: a prospective study. *J Pediatr*, 157: 373-80.
13. Lionetti, E., Castellaneta, S., Francavilla, R., et al. (2014). Introduction of gluten, HLAstatus, and the risk of celiac disease in children. *N Engl J Med*, 371:1295-303.
14. Maglio, M., Tosco, A., Auricchio, R., et al (2011). Intestinal deposits of anti-tissue tran-glutaminase IgA in childhood celiac disease. *Dig Liver Dis*, doi:10.1016/j.dld.2011.01.015.

15. Marsh, MN. (1990). Grains of truth: evolutionary changes in small intestinal mucosa in response to environmental antigen challenge. *Gut*, 31: 111-4.
16. Oberhuber, G., Granditsch, G., Vogelsang, H. (1999). The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 11: 1185-94.
17. Pais, WP., Duerksen, DR., Pettigrew, NM., Bernstein, CN. (2008). How many duodenal biopsy specimens are required to make a diagnosis of celiac disease?. *Gastrointest Endosc*, 67: 1082-7.
18. Polanco Allúe I. (2008). *Libro blanco de la enfermedad celíaca*. Editorial ICM. Madrid. 157 pp.
19. Polanco Allúe, I. (2017). *Nuevos criterios diagnósticos en el niño y en el adolescente. Enfermedad celíaca, presente y futuro*. Editorial Ergon. Madrid. 149 pp.
20. Romain, B., Reinhard, H., Judy, J. Brown, et al. (2017). Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science*, vol 356 ISSUE 6333.
21. Szajewska, H., Shamir, R., Chmielewska, A., Pieścik-Lech, M., Auricchio, R., Ivarsson, A., Kolacek, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, I., Mearin, ML., et al. PREVENTCD Study Group. (2015). Systematic review with meta-analysis: early infant feeding and coeliac disease-update. *Aliment Pharmacol Ther*. 41(11):1038-54. doi: 10.1111/apt.13163.
22. Taavela, J., Popp, A., Korponay-Szabo, IR., et al. (2016). Prospective Study on the Usefulness of Duodenal Bulb Biopsies in Celiac Disease Diagnosis in Children: Urging Caution. *Am. J Gastroenterol*, 111(1): 124-33.
23. Tosco, A., Maglio, M., Paparo, F., et al. (2008). Immunoglobuline A Anti-tissue Transglutaminase Antibody Deposits in the Small Intestinal Mucosa of Children With No Villous Atrophy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 47:293-298.
24. Vriezinga, SL., Auricchio, R., Bravi, E., Castillejo, G., Chmielewska, A., Crespo Escobar, P., Kolaček, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, IR., Mummert, E., et al. (2014). Randomized feeding Intervention in infants at high risk for celiac disease. *N Engl J Med*, 371(14):1304-15.

## 8. ANEXO 1



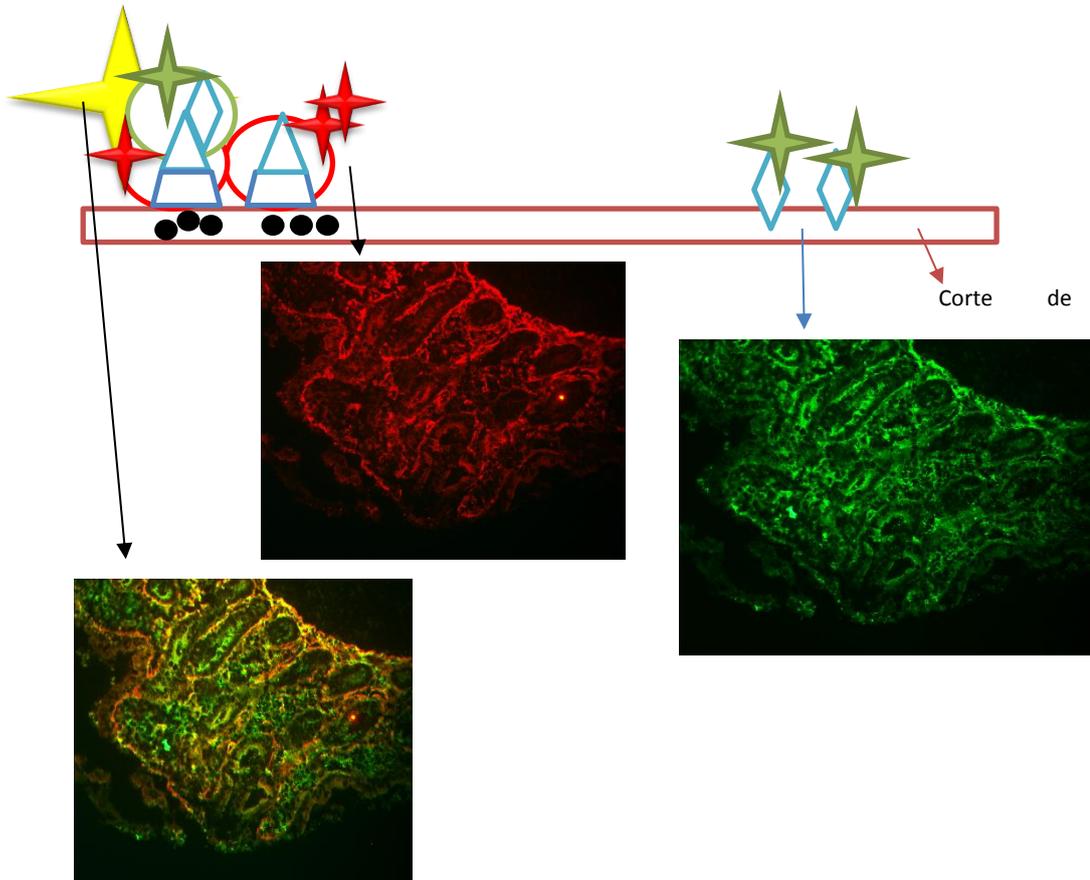
*Figura 9. Microscopio de fluorescència Motich BA400.*



*Figura 10. Microscopio confocal Espectral Leica TCS-SP5.*

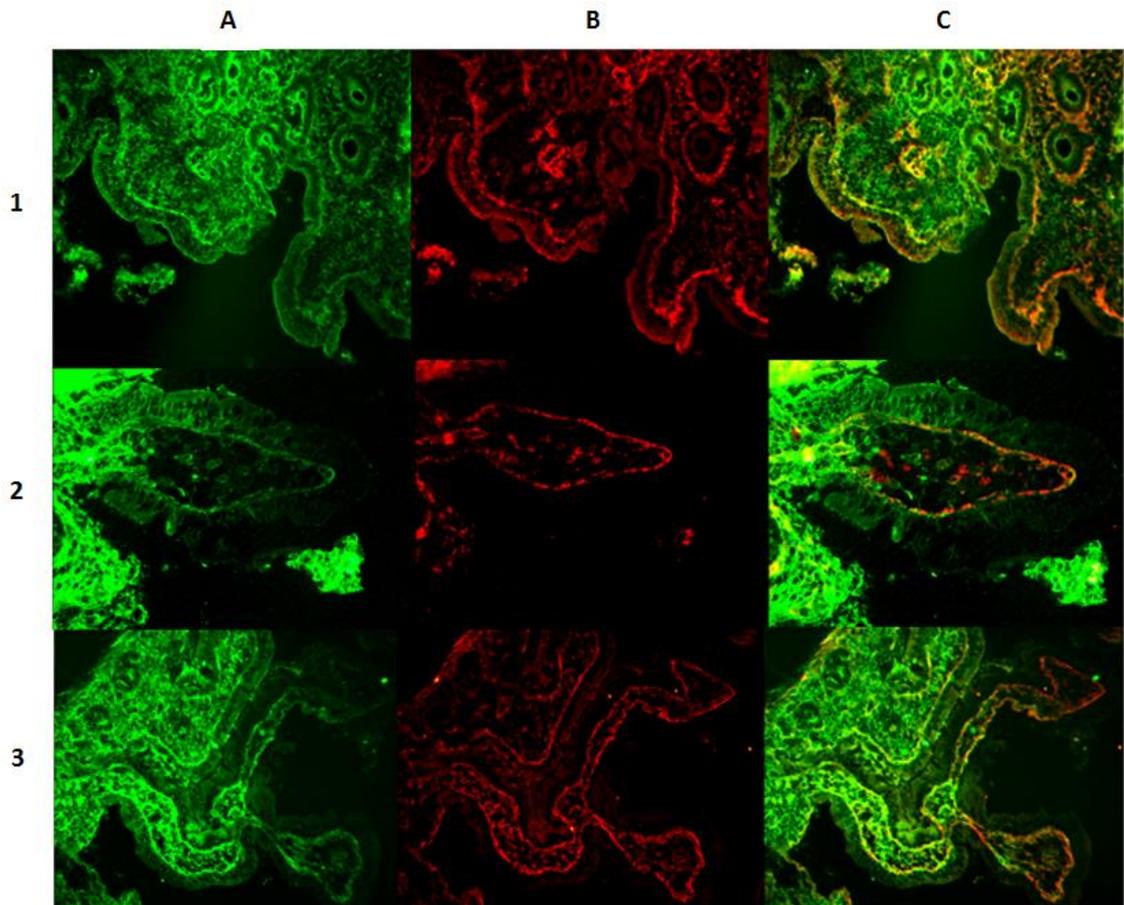


*Figura 8. portaobjectos "SuperFrostPlus" de 10 pocillos en cada qual se colocarán cortes seriados de BI.*

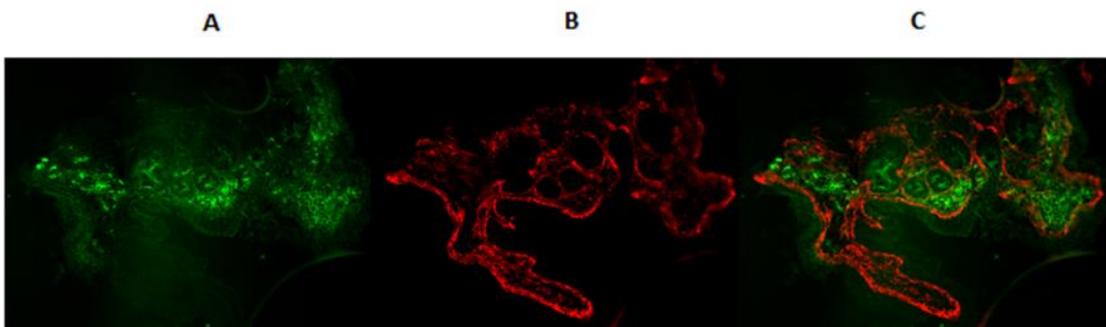


-  = TG2 → transglutaminasa tisular
-  = Anticuerpo monoclonal de ratón anti-TG2, Ac **CUB7402**
-  = Anticuerpo de conejo anti Ig de ratón, Ac **ALEXA**
-  = Anticuerpo de conejo anti-IgA, Ac **FITC**
-  = Fluorescencia verde
-  = Fluorescencia roja
-  = IgA extracelular colocalizará con TG2; es decir, cuando se da la superposición de ambas fluorescencias por presencia de depósitos de TTG.

Figura 11. Esquema de la doble tinción.



*Figura 15. Cortes de mucosa intestinal de pacientes con EC no tratada y atrofia de la mucosa tipo Marsh III (1), Marsh II (2), Mars0-1 (3). Se observa presencia de depósitos TG2 (amarillo-anaranjado) en las localizaciones específicas: por debajo de la membrana basal, y alrededor de las criptas y vasos sanguíneos (1, 2 y 3). (A) Corte bajo luz de longitud de onda de 495nm 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 la imagen bajo filtro azul y la imagen bajo filtro verde.*



*Figura 16. Cortes de mucosa intestinal de pacientes no celíacos e histología Marsh 0-1. Ausencia de depósitos TG2-IgA. (A) Corte bajo luz de longitud de onda de 495nm 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 la imagen bajo filtro azul y la imagen bajo filtro verde.*