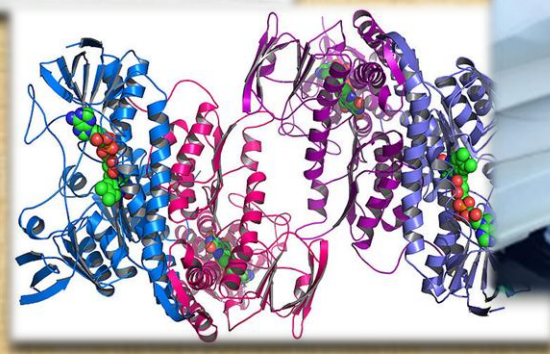




Estudio de la adherencia a la dieta sin gluten en pacientes celíacos pediátricos mediante la cuantificación de péptidos inmunogénicos del gluten en heces



Francisco Ángel Lao Domínguez

Grado en Farmacia
Departamento de Microbiología y Parasitología
Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla



TRABAJO FIN DE GRADO



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología y Parasitología

Grado en Farmacia

**Estudio de la adherencia a la dieta sin gluten en pacientes
celíacos pediátricos mediante la cuantificación de péptidos
inmunogénicos del gluten en heces**

TRABAJO FIN DE GRADO presentado por

FRANCISCO ÁNGEL LAO DOMÍNGUEZ

Este trabajo, **de carácter experimental**, se ha realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, bajo la dirección de **Isabel María Comino Montilla** y **Carolina Sousa Martín**.

Lugar y fecha de presentación: Sevilla, 5 de julio de 2016

Fdo: Carolina Sousa Martín

Fdo: Isabel M^a Comino Montilla

Fdo: Fco Ángel Lao Domínguez

RESUMEN

La enfermedad celíaca (EC) es un desorden clínico basado en una intolerancia al gluten presente en ciertos cereales como el trigo, la cebada, el centeno, la avena y sus derivados. El único tratamiento actualmente disponible para la EC es la dieta sin gluten (DSG), lo cual supone un auténtico reto para los pacientes ya que el gluten es frecuente en muchos productos alimentarios. El control de la adherencia a la DSG puede realizarse empleando varios métodos como marcadores serológicos, cuestionarios dietéticos, entrevistas o biopsias de repetición. Sin embargo, ninguno de ellos proporciona una medida fiable. Por ello, en trabajos previos, se ha desarrollado un nuevo método basado en la detección de péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) en heces. El objetivo de este trabajo es detectar el cumplimiento de la DSG en individuos celíacos pediátricos recién diagnosticados mediante la detección y cuantificación de GIP en las heces y comparar los resultados obtenidos mediante los marcadores serológicos. En el estudio participaron un total de 12 pacientes celíacos y 6 pacientes controles, todos en edad pediátrica. A los pacientes se les tomó muestras de heces y suero en 4 visitas (0, 6, 12, 18 meses aproximadamente) y se estudió GIP fecal y marcadores serológicos. En el diagnóstico, periodo en el que los pacientes celíacos consumían gluten, se detectó GIP en heces en todos ellos. No obstante, durante el seguimiento, un tercio de los pacientes muestra transgresiones en la DSG. Los marcadores serológicos no consiguieron detectar las transgresiones mostradas mediante GIP fecal en su totalidad. En conclusión, la detección de GIP en heces es un método eficaz y fiable, por lo que su inclusión en clínica permitiría el control de la DSG en los pacientes celíacos.

Palabras claves: enfermedad celíaca, dieta sin gluten, péptidos inmunogénicos del gluten.

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PATOGENIA	2
1.2. EPIDEMIOLOGÍA	3
1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS	4
1.3.1. Forma clásica	4
1.3.2. Otras formas de EC	5
1.3.2.1. Forma asintomática	5
1.3.2.2. Forma subclínica	5
1.3.2.3. Forma potencial	5
1.4. DIAGNÓSTICO	6
1.4.1. Marcadores serológicos	6
1.4.2. Marcadores genéticos	6
1.4.3. Biopsia intestinal: clasificación modificada de Marsh	7
1.4.4. Protocolo del diagnóstico	7
1.5. TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO	8
2. OBJETIVOS	10
3. MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO	11
3.2. MUESTRAS	12
3.2.1. Muestras serológicas	12
3.2.2. Muestras fecales	12
3.3. MATERIALES	12
3.3.1. Material para la inmunocromatografía	12
3.3.2. Material para ELISA	13
3.3.3. Programas	13
3.4. MÉTODOS	13
3.4.1. Extracción de GIP	13
3.4.2. Tiras inmunocromatográficas	13
3.4.3. ELISA sándwich	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
4.1. DETERMINACIÓN DE GIP EN HECES DE PACIENTES CELÍACOS	17
4.2. EVALUACIÓN DE MARCADORES SEROLÓGICOS EN PACIENTES CELÍACOS	22

5. CONCLUSIONES	26
6. BIBLIOGRAFÍA	27

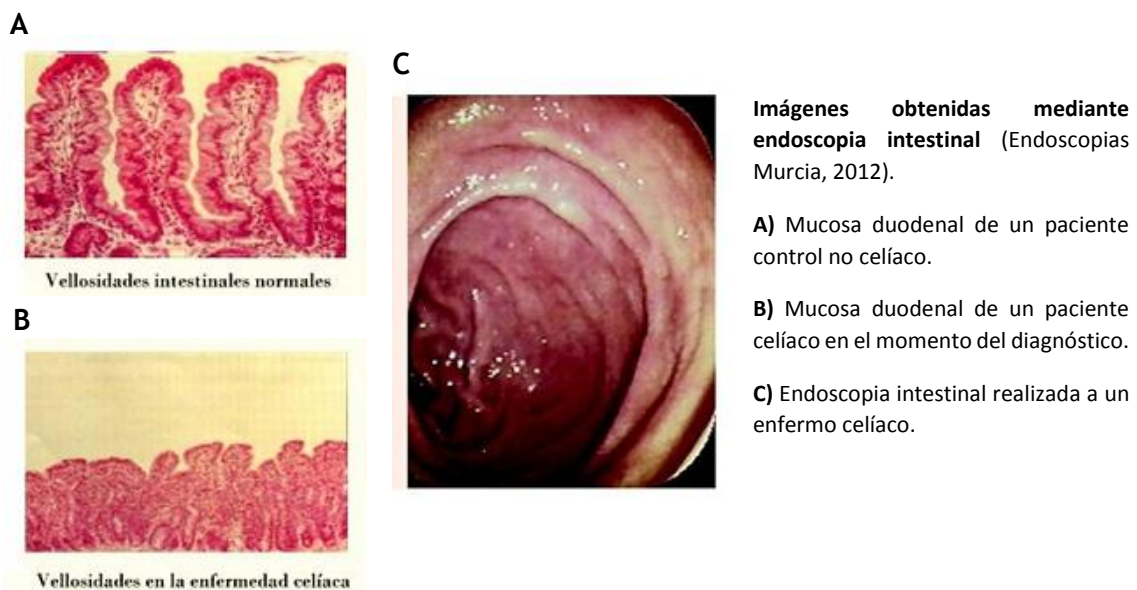
1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca (EC) es un desorden clínico basado en una intolerancia al gluten presente en ciertos cereales como el trigo, la cebada, el centeno, la avena y derivados. Dicha intolerancia se desarrolla mediante una reacción inmune en la que son reconocidos como antígenos péptidos del gluten en individuos genéticamente predispuestos (haplotipos HLA-DQ2/DQ8) (Sollid y Jabri, 2013). La respuesta inmune generada va a producir daños en el tejido intestinal (**Figura 1**), que pueden ir desde leves y reversibles hasta graves e irreversibles según la cantidad y tiempo de exposición al gluten.

Actualmente el único tratamiento de la EC es la eliminación del gluten de la dieta, hecho que supone un reto para los pacientes debido a la presencia de gluten en numerosos alimentos procesados, influyendo inevitablemente en la calidad de vida del paciente (Rocha y cols., 2016).

El problema en las transgresiones en la dieta, voluntarias o involuntarias, es que pueden implicar la aparición de síntomas intestinales y no intestinales que van a ir acompañados de un aumento del daño de la mucosa intestinal. Si este último es grave, puede llegar hasta tal punto en el que el daño sea irreparable y se genere un estado de EC refractaria, en el que el individuo deja de responder a la DSG y padece una inflamación crónica que se relaciona con una alta aparición de linfomas de origen intestinal (Rubio-Tapia y cols., 2013).

Figura 1

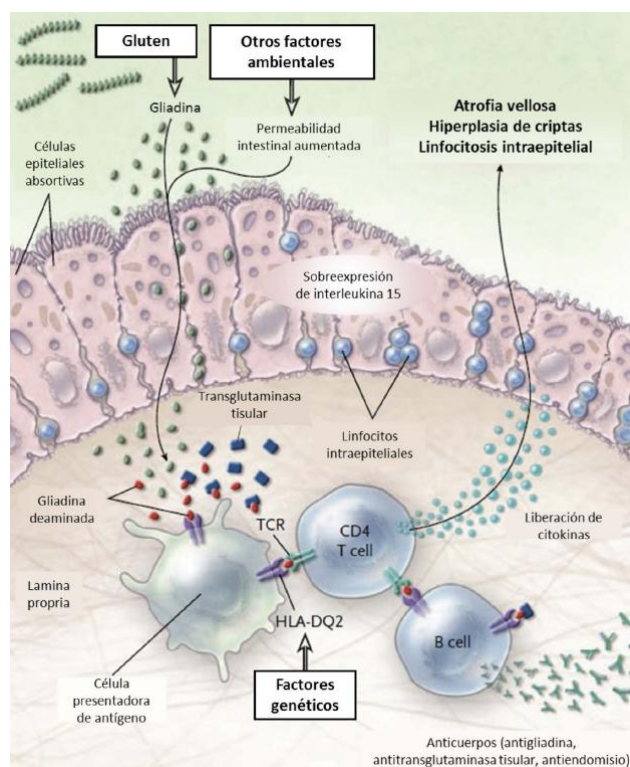


1.1. PATOGENIA

De acuerdo con la clasificación de Osborne de 1924 (Shewry y cols., 2002), las proteínas que forman la harina de trigo pueden clasificarse según su solubilidad en: albúminas, extraíbles con agua; globulinas, extraíbles en sales diluidas; gliadinas, extraíbles con soluciones de alcohol y gluteninas, extraíbles con ácido acético diluido. Estas dos últimas, gliadinas y gluteninas, son las principales proteínas que forman el gluten, siendo también conocidas como prolaminas por su alto contenido en prolina, aunque también contienen una gran cantidad de glutamina. Este hecho hace que las enzimas proteolíticas del aparato digestivo impidan la degradación total de estas, generando péptidos resistentes a la proteólisis que inducirán cambios en la mucosa intestinal debido a la respuesta inmune generada (**Figura 2**).

Concretamente, los péptidos resultantes de la hidrólisis producirán cambios en el epitelio intestinal y lámina propia debido a una

Figura 2



Mecanismo inmunopatológico de la EC. Representación gráfica del mecanismo inmunológico asociado a la patogenia de la EC. Los péptidos resultantes de la digestión del gluten van a atravesar las mucosas hasta la lámina propia en condiciones de permeabilidad intestinal aumentada. Estos péptidos serán deamidados y procesados por células presentadoras de antígenos, las cuales presentarán los péptidos a células T CD4+. Como consecuencia, liberará citoquinas que causan daño inflamatorio sobre las mucosas y se activará la producción de anticuerpos por parte de las células B.

intestinal y lámina propia debido a una respuesta inmune innata y adaptativa (Moscoso y Quera, 2015). Algunos de los péptidos tóxicos generados tras la hidrólisis inducen una respuesta inmune innata inespecífica caracterizada por la presencia de interleucina 15, la cual activará a los linfocitos intraepiteliales del tipo natural killer que causarán daño a los enterocitos (Abadie y Jabri, 2014). Este hecho sumado a una situación en la que hay un aumento de la permeabilidad intestinal facilita que los péptidos consigan atravesar el epitelio hasta alcanzar la lámina propia. En condiciones normales los péptidos grandes no pueden atravesar las mucosas debido a las fuertes uniones entre las células a través de las *tight junctions*, pero se ha comprobado que los mismos péptidos provocan un aumento de la permeabilidad mediante

la unión al receptor CXCR3 de la mucosa intestinal, lo cual induce la secreción de zonulina, proteína que regula la permeabilidad intestinal debilitando estas *tight junctions* (Lammers y cols., 2008; Fasano, 2011).

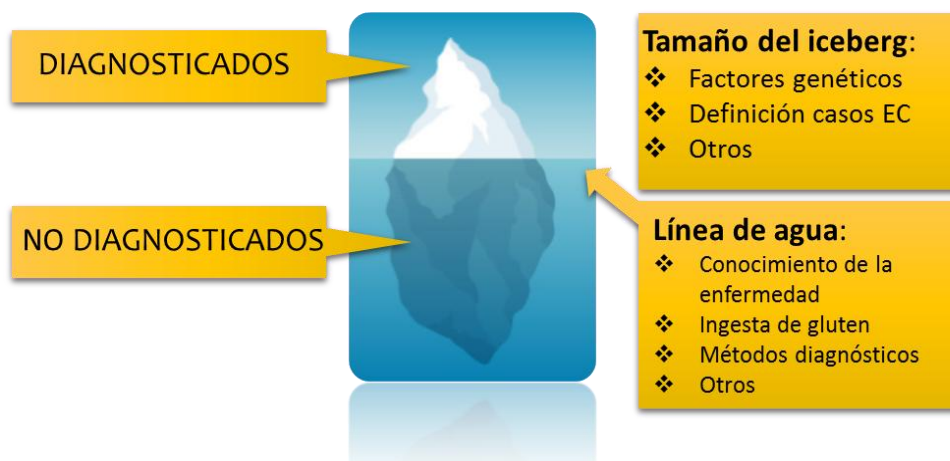
Los péptidos, una vez dentro, serán deamidados por la enzima transglutaminasa tisular. Adicionalmente, la interleucina 15 activará a las células dendríticas, que incrementarán en superficie la presencia de moléculas para realizar la presentación antigénica a través de HLA-DQ2/DQ8. Los péptidos son presentados entonces a la superficie de los linfocitos T CD4+, lo que dará lugar al aumento de la síntesis y liberación de citoquinas que generará atrofia vellositaria e hiperplasia de las criptas (**Figura 1**). Como consecuencia, se producirá la expansión de linfocitos B, con la consecuente producción de anticuerpos. De todos esos péptidos, se piensa que el más inmunogénico es el 33-mer de la α -2-gliadina (Shan y cols., 2002; Morón y cols., 2008).

1.2. EPIDEMIOLOGÍA

Normalmente la prevalencia de la EC suele definirse mediante el “modelo del iceberg” (**Figura 3**). La parte visible del iceberg se corresponde con los casos diagnosticados, mientras que la parte no visible o sumergida hace referencia a los pacientes no diagnosticados. La línea de agua que separa ambas partes dependerá de los factores que favorecen el diagnóstico (o no diagnóstico) de la enfermedad, como son la ingesta de gluten, conocimiento de la enfermedad, los métodos de diagnóstico disponibles, la intensidad de las manifestaciones clínicas, etc. Con este modelo se pretende hacer una llamada de atención a la gran cantidad de casos sin diagnosticar existentes y la necesidad de hacer más visible el iceberg (Fasano y Alessio, 2001).

Así pues, en las zonas donde predomina el genotipo HLA-DQ2/DQ8 existe una mayor prevalencia de la enfermedad, tal y como ocurre en América del Norte, la región norte de África y en Europa (Fasano y Alessio, 2001). La mejora de los métodos diagnósticos en estos últimos años ha permitido encontrar una mayor cantidad de casos de EC en la población. Con la introducción de los métodos de screening serológicos ha aumentado el número de diagnósticos realizados de la EC en todos los países, de tal forma que se estima que la prevalencia global de la enfermedad es del 1%. Dentro de Europa los porcentajes oscilan, mostrándose una prevalencia mayor en países como Finlandia (2,4%) y menor en otros como Alemania e Italia (0,3 y 0,7%, respectivamente). Además, se ha comprobado que la enfermedad se diagnostica entre 2 y 3 veces más en mujeres que en hombres, excepto en jóvenes y ancianos, donde se diagnostica de igual manera (Reilly y Green, 2012).

Figura 3



Modelo del iceberg de la EC. Representación gráfica de la epidemiología de la EC. La parte superior del iceberg representa los casos diagnosticados y detectados, que es menor que la no visible, es decir, los casos no diagnosticados que aún no se han puesto de manifiesto (Fasano y Alessio, 2001).

1.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

1.3.1. Forma clásica

Las manifestaciones clínicas de la EC (**Tabla 1**) varían mucho con la edad. Los lactantes y los niños pequeños generalmente presentan diarrea, distensión abdominal y retraso en el crecimiento, entre otros síntomas. Los adolescentes suelen presentar manifestaciones extraintestinales como talla baja y síntomas neurológicos (Casellas y cols., 2008).

Una gran proporción de pacientes pueden tener síntomas durante un largo periodo de tiempo y haber sufrido hospitalizaciones e incluso procedimientos quirúrgicos antes del diagnóstico de la EC. Así mismo, pueden ocurrir trastornos en la esfera reproductiva (menarquía tardía, menopausia precoz, abortos, infertilidad, impotencia, recién nacidos de bajo peso), osteopenia, hipoesplenismo, adenocarcinoma del intestino delgado o hepatitis reactiva (Casellas y cols., 2008).

Tabla 1

Manifestaciones clínicas de la EC (Moscoso y Quera, 2015).

SÍNTOMAS MENORES (transitorios, inespecíficos o aparentemente no relacionados):	SÍNTOMAS MAYORES (síntomas de malabsorción y desnutrición)
Dispepsia	Diarrea
Distensión abdominal	Esteatorrea
Alteraciones leves del tránsito intestinal similares a las de síndrome del intestino irritable	Baja de peso
Anemia de causa no precisada	Calambres
Fatiga aislada	Tetania
Hipertransaminasemia de causa no precisada	Edema periférico debido a alteraciones electrolíticas
Infertilidad	Hipoalbuminemia
Alteraciones neurológicas centrales y periféricas	
Osteoporosis	
Talla baja	
Defectos del esmalte dental	
Dermatitis herpetiforme	

Las personas con EC tienen además mayor riesgo de enfermedades inmunológicas comparadas con la población general. La asociación más típica es junto a la dermatitis herpetiforme, la cual se define como la expresión cutánea de la EC. De hecho, se ha comprobado que la dermatitis herpetiforme transcurre con un mecanismo parecido, apareciendo anticuerpos antitransglutaminasa epidérmica (Sárdy y cols. 2002). Otras enfermedades con las cuales aparece con cierta frecuencia son la diabetes mellitus tipo 1, tiroiditis autoinmune, síndrome de Down y síndrome de Turner. Un estudio realizado en Polonia ha llegado a establecer que la prevalencia de EC en personas con síndrome de Down llega a ser de un 5,4% (Szaflarska-Poplawska y cols., 2016).

1.3.2. Otras formas de EC

Uno de los aspectos destacables de la EC son sus múltiples formas de expresión. Estos casos son más frecuentes en escolares y adolescentes, destacando síntomas como la cefalea, aumento de transaminasas, estreñimiento, heces pastosas, osteopenia, ferropenia, llagas en la boca, etc. (Arranz y Garrote, 2011). En 2013 se estableció mediante un censo de expertos de Oslo los distintos términos que definen la EC (Ludvigsson y cols., 2013). Aunque se definen muchas formas de la EC, de entre todas ellas podemos destacar tres grupos:

1.3.2.1. Forma asintomática

En este caso la EC transcurre sin síntomas apreciables, pero sí que existe el daño de la mucosa intestinal típico de la enfermedad, siendo detectable mediante biopsia de la mucosa y marcadores serológicos.

1.3.2.2. Forma subclínica

Ocurre cuando el paciente, a pesar de ingerir gluten, no muestra o muestra levemente síntomas y en las pruebas diagnósticas no aparecen resultados concluyentes que confirmen la enfermedad.

1.3.2.3. Forma potencial

No muestran alteraciones histopatológicas de la mucosa asociadas a la EC, pero sí que presentan algún marcador serológico típico de la EC o un aumento de los linfocitos intraepiteliales, creyéndose que pueden desarrollar la enfermedad.

1.4. DIAGNÓSTICO

1.4.1. Marcadores serológicos

La clave del diagnóstico de la EC es la biopsia de la mucosa intestinal. Sin embargo, el empleo de los marcadores serológicos ayuda a identificar posibles casos de EC, sobre todo en caso de personas de alto riesgo (familiares de alto riesgo con la enfermedad), sin síntomas gastrointestinales y/o con enfermedades asociadas a la EC. Las pruebas serológicas están indicadas en aquellos casos de distensión o malestar abdominal sin causa conocida, diarrea crónica, anormalidades bioquímicas que podrían estar causadas por la malabsorción, familias en primer grado con diagnóstico de EC y enfermedades autoinmunes. Es por ello que su estudio supone el primer paso en el camino al diagnóstico de la EC. Los marcadores empleados para apoyar el diagnóstico son varios: anticuerpos antitransglutaminasa tisular humana (anti-tTG) tipo IgA e IgG, anticuerpos antiendomiso (EMA) tipo IgA, anticuerpos antigliadina (AGA) tipo IgA e IgG y anticuerpos antipéptidos de gliadina desamidados (anti-GDP) tipo IgA e IgG (Rubio-Tapia y cols., 2013).

Anti-tTG y EMA son los que presentan una mayor sensibilidad y especificidad. Aunque ambos son viables, en la práctica suele ser valorado preferentemente los anti-tTG tipo IgA por precisar un método más fácil, barato y rápido (Vargas Pérez y cols., 2005), aunque ello no excluye el estudio de EMA si se prefiere. Los AGA fueron los primeros en emplearse, pero actualmente se prefiere el uso de los otros marcadores mencionados por su mayor especificidad y sensibilidad (Rubio-Tapia y cols., 2013).

El marcador anti-DGP fue el último en descubrirse y el tipo IgG ha demostrado ser útil en el diagnóstico en los casos en los que el paciente sufre déficit de IgA (Barbato y cols., 2011), aunque no parece proporcionar más ventajas que anti-tTG y EMA en los casos comunes, excepto en niños (Sakly y cols. 2012; Rubio-Tapia y cols., 2013).

1.4.2. Marcadores genéticos

Se emplean en los casos en los que la serología no muestra datos claros sobre el diagnóstico, siendo estudiados los genes HLA-DQ2 y HLA-DQ8 anteriormente mencionados. Así pues, el marcador genético más predominante en la población celíaca es el HLA-DQ2, manifestándose en el 95% de ellos. Cabe decir que la molécula HLA-DQ2 puede estar expresada por dos alelos distintos, HLA-DQ2.2 y HLA-DQ2.5, con una aparición del 90% y 5% respectivamente. Como consecuencia, HLA-DQ8 aparece en el 5% restante (Stammaes y Sollid, 2015). Sin embargo, la obtención de resultados positivos no sugiere que el paciente padezca definitivamente la EC, ya

que el gen HLA-DQ2 aparece en el 30% de la población general y tan solo 1-2% de los portadores de HLA-DQ2/DQ8 llegan a desarrollar la EC. Por ello, aunque los genes HLA-DQ2/DQ8 son los principales factores predisponentes de EC, parece tener bastante importancia otros factores y genes no HLA que intervienen en la enfermedad (Arranz y Farré, 2008).

1.4.3. Biopsia intestinal: clasificación modificada de Marsh

Para la realización del diagnóstico de la EC se tienen en cuenta diversos parámetros como ya se ha mencionado, pero de entre todos ellos el que más cabe destacar es sin duda la comprobación del daño de las mucosas intestinales mediante biopsia. El sistema de clasificación más importante de las lesiones histopatológicas en el tejido intestinal para la EC se basa en la descripción realizada por Marsh (Marsh, 1992). Esta se basa en la observación de linfocitos intraepiteliales, el tamaño de las criptas y la atrofia de las vellosidades intestinales para clasificar el daño producido. Más tarde, otros autores modificaron dicha clasificación para hacerla más acorde a la práctica clínica (**Tabla 2**) (Husby y cols., 2012).

Tabla 2

Clasificación de Marsh-Oberhuber o de Marsh modificada. El tipo 0 corresponde a una mucosa normal, el tipo 1 a una lesión infiltrativa, el tipo 2 a una lesión hiperplásica y el tipo 3 a una lesión destructiva de distintos grados (Husby y cols., 2012).

	Tipo 0	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3a	Tipo 3b	Tipo 3c
LIE	≥ 25	≥ 40	≥ 40	≥ 25	≥ 25	≥ 25
Criptas	Normal	Normal	Hiperplasia	Hiperplasia	Hiperplasia	Mucosa plana
Vellosidades	Normal	Normal	Normal	Atrofia leve	Atrofia marcada	

LIE: nº linfocitos intraepiteliales por cada 100 células epiteliales.

1.4.4. Protocolo del diagnóstico

En niños y adolescentes deberá realizarse primero un estudio del marcador serológico anti-tTG tipo IgA. Se recomienda que se realice también un estudio de IgA total, ya que no debe descartarse la posibilidad de que el individuo sufra déficit de IgA. Si este es el caso, deberá estudiarse los marcadores serológicos de tipo IgG (como anti-tTG o anti-DGP, por ejemplo). Se prefiere emplear el marcador anti-DGP, ya sea tipo IgA o IgG, para pacientes que no muestren resultados concluyentes con otros marcadores o en niños menores de 2 años. Si los marcadores serológicos de tipo IgA en un individuo con valores de IgA total normales resultan ser negativos, debe descartarse el diagnóstico de EC, excepto en los casos de niños que padezcan una alta probabilidad de padecer la enfermedad (familiares de primer grado con la EC) o síntomas graves. En caso positivo, o de ocurrir alguna de las excepciones comentadas, se recomienda hacer

estudios de los marcadores genéticos y debe hacerse biopsias intestinales. El diagnóstico se confirma si en la biopsia aparecen lesiones tipo 2 – 3 (**Tabla 2**) y los marcadores muestran ser positivos para HLA-DQ2/DQ8. Es recomendable estudiar los marcadores genéticos para comprobar que, en caso de existir daño en las mucosas, realmente la patología se debe a la EC (Husby y cols., 2012).

En el caso de niños y adolescentes que sufran síntomas sugerentes de EC y que tengan valores de anti-tTG 10 veces por encima de los valores normales es posible realizar el diagnóstico sin llegar a realizar una biopsia, ya que en estas circunstancias se estima que el estado de las mucosas es de tipo Marsh 3. Para ello, deberá hacerse el estudio del anticuerpo EMA en una nueva prueba de sangre y si este da positivo se dará el diagnóstico por confirmado.

En adultos el procedimiento es semejante al descrito para niños con sintomatología, pero no debe abandonarse el diagnóstico en el caso de mostrar carencia en los marcadores de IgA con valores normales de IgA total, sino que debe continuarse midiendo marcadores de tipo IgG y, en caso negativo, proceder con los marcadores genéticos, reevaluar el diagnóstico y/o considerar medir la serología de nuevo. En el caso de los adultos la biopsia siempre debe hacerse para confirmar finalmente el diagnóstico (Moscoso y Quera, 2015).

1.5. TRATAMIENTO Y SEGUIMIENTO

El único tratamiento actualmente disponible para la EC es la DSG. La DSG consiste en la eliminación total del gluten de la dieta de por vida, lo cual supone un auténtico reto para los pacientes debido a las numerosas restricciones sociales y económicas que conlleva (Kinsey y cols., 2008; Missbach y cols., 2015; Rocha y cols., 2016). La manera en que la DSG condiciona la vida de los pacientes tiende a hacer que estos incumplan la dieta y como consecuencia reaparecen síntomas como dolor y diarrea. Además, las transgresiones continuas exponen a los pacientes a problemas de salud que se manifiestan a largo plazo, como infertilidad, osteoporosis e incluso cáncer intestinal (Dowd y cols., 2014). De hecho, el consumo de continuo de gluten, intencionado o no, en pacientes con EC ya diagnosticada es la principal causa de EC refractaria relacionada con una alta aparición de linfomas (Rubio-Tapia y cols., 2013)

Numerosas investigaciones trabajan en el desarrollo de tratamientos alternativos a la DSG. Se ha planteado el empleo de bacterias degradadoras de gluten y de proteasas que, administradas oralmente, actuarían sobre los péptidos procedentes del gluten no degradables por el organismo (Cerf-Bensussan y cols., 2007; Helmerhorst y Wei, 2014), el uso de polímeros secuestradores de péptidos del gluten (Pinier y cols., 2012) y el empleo de fármacos antiinflamatorios como la

budesonida (Ciacci y *cols.*, 2009; Brar y *cols.*, 2007). Todos estos tratamientos alternativos parecen prometedores, pero aún están en fase de estudio.

Por ello, es muy importante un control exhaustivo de la dieta. Dicho control de la adherencia a la DSG se puede realizar empleando varios métodos: marcadores serológicos basados en anticuerpos resultantes de la respuesta del organismo ante la presencia de gluten, como son los anticuerpos anti-tTG y los anticuerpos anti-DGP; seguimientos realizados por un nutricionista mediante cuestionarios o entrevistas al paciente e incluso la observación periódica del estado de la mucosa intestinal mediante biopsias. Sin embargo, ninguno de ellos ofrece una medida precisa del cumplimiento de la DSG. En cuanto a las entrevistas y cuestionarios, los pacientes no suelen describir con exactitud su nivel de adherencia, además de que es probable que existan transgresiones no intencionadas (Missbach y *cols.*, 2015). Por otro lado, las biopsias de repetición son métodos invasivos para el control de la DSG (Pietzak, 2005; Husby y *cols.*, 2012) por lo que los médicos suelen emplear la serología como método de seguimiento para monitorizar el cumplimiento de la dieta. No obstante, se ha comprobado que la serología tiene poca correlación con la curación de la mucosa intestinal y, por tanto, basarse solo en la serología como método de seguimiento no parece ser muy eficiente. (Vahedi y *cols.*, 2003; Leffler y *cols.* 2007; Kaukinen y *cols.*, 2007; Bannister y *cols.*, 2014; Vécsei y *cols.*, 2014; de Chaisemartin y *cols.*, 2015).

2. **OBJETIVOS**

La única terapia existente a día de hoy para los pacientes celíacos es una rigurosa DSG. Por lo tanto, una vez confirmado el diagnóstico de la EC se debe realizar un seguimiento clínico-analítico periódico del paciente con el fin de detectar posibles complicaciones y enfermedades asociadas que pueden aparecer en cualquier momento de la evolución de la enfermedad por la falta del cumplimiento de la dieta. El seguimiento de la adherencia a la DSG se basa fundamentalmente en la determinación periódica de marcadores serológicos de la enfermedad. Sin embargo, la respuesta de los distintos marcadores serológicos tras la dieta es muy variable. Los anticuerpos anti-DGP, EMA o anti-tTG han sido propuestos como indicadores del cumplimiento de la DSG. Sin embargo, los anticuerpos de clase IgA pueden tardar en normalizarse varios meses y los de clase IgG periodos superiores a un año después de que el antígeno haya desaparecido de la dieta. Además, se ha descrito que estos anticuerpos pueden perder sensibilidad para detectar pequeñas transgresiones dietéticas. En trabajos previos, Comino y cols. (2012) describieron un nuevo método para detectar y monitorizar la presencia de péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) en heces humanas de pacientes celíacos sobre la base de los anticuerpos anti-33-mer G12. Estos anticuerpos se obtuvieron frente a uno de los péptidos más tóxicos descritos para la EC, el péptido 33-mer de la α -2-gliadina.

En base a los antecedentes descritos, el **OBJETIVO GENERAL** de este Trabajo Fin de Grado fue detectar el cumplimiento de la DSG en una población de individuos celíacos pediátricos recién diagnosticados mediante la detección y cuantificación de GIP en las heces y comparar los resultados obtenidos con los marcadores serológicos. Este objetivo fue desarrollado en los siguientes **OBJETIVOS CONCRETOS**:

1. Detectar el cumplimiento de la DSG mediante tiras inmunocromatográficas en muestras de heces obtenidas de pacientes pediátricos en dieta normal con gluten en el momento del diagnóstico (visita 1) y durante las 3 visitas siguientes (visitas 2, 3 y 4 a los 6, 12 y 18 meses, respectivamente) de control en el hospital.
2. Cuantificar los niveles de GIP, mediante técnica ELISA, en muestras de heces obtenidas de pacientes pediátricos en dieta normal con gluten en el momento del diagnóstico (visita 1) y durante las 3 visitas siguientes (visitas 2, 3 y 4 a los 6, 12 y 18 meses, respectivamente) de control en el hospital.
3. Comparar los resultados obtenidos de GIP en las heces de estos pacientes con los niveles de los anticuerpos anti-tTG y anti-DGP IgA.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

En el estudio participaron un total de 12 pacientes celíacos en edad pediátrica (5 hombres y 7 mujeres, con edades comprendidas entre los 0 y 14 años) que fueron reclutados de 3 hospitales españoles: Hospital Universitario Virgen de Valme de Sevilla, Hospital Regional Carlos Haya de Málaga y Hospital Nuestra Señora de la Candelaria de Tenerife.

Estos pacientes fueron recién diagnosticados en base a una biopsia intestinal y/o marcadores serológicos y no habían iniciado aún el tratamiento de DSG en el momento de su inclusión en el estudio. A cada uno de ellos se les realizó 4 visitas a los 0, 6, 12 y 18 meses (\pm 2 meses en cada visita), recogiendo muestras de heces y suero en cada una (**Tabla 3 y 4**). En la visita 1 (0 meses) los participantes están en dieta normal con gluten y en el resto de visitas (de seguimiento) ya fueron instruidos para seguir una DSG.

Se emplearon como controles otros 6 participantes, también de edad pediátrica (3 hombres y 3 mujeres). De ellos, 3 fueron controles positivos, es decir, personas sanas sin la enfermedad y consumidoras de gluten (con edad comprendida entre 1 y 2 años). Como controles negativos se usaron a otros 3 participantes (con $<$ 6 meses), los cuales eran lactantes que en su dieta solo incluían leche de fórmula, de tal forma que nunca habían ingerido gluten. Por cada participante control se tomó una muestra de heces.

Tabla 3

Características de los pacientes celíacos y controles del estudio. Los 12 pacientes se muestran clasificados según su sexo y edad, al igual que los 6 individuos controles. La edad media fue calculada teniendo en cuenta la edad de cada individuo, no el grupo de edad.

	n	(%)
Pacientes totales	12	
Edad de incorporación		
0-3 años	3	25,00
4-12 años	7	58,33
>12 años	2	16,67
Edad media: 6,67		
Sexo		
Hombre	8	66,67
Mujer	4	33,33
Controles totales		
Edad de incorporación		
0-3 años	6	100,00
Edad media: 0,83		
Sexo		
Hombre	3	50,00
Mujer	3	50,00

Tabla 4

Características de los pacientes celíacos en el diagnóstico. Los criterios para el diagnóstico empleados fueron anti-tTG, EMA, biopsia de la mucosa intestinal (clasificación Marsh) y presencia de los alelos HLA-DQ2 o HLA-DQ8.

Paciente	Sexo	Edad (años)	Anti-tTG IgA	EMA	Biopsia	Genotipo
1	H	8	Dudoso	1/640	Marsh 3b	HLA DQ2
2	H	14	Positivo	1/320	Marsh 3c	HLA DQ2
3	M	10	Positivo	1/640	Marsh 3c	HLA DQ2
4	M	4	Positivo	1/640	Marsh 3a	HLA DQ2
5	M	2	Positivo	1/160	-	HLA DQ2
6	H	8	Positivo	1/320	Marsh 3b	HLA DQ8
7	M	4	Positivo	1/640	-	HLA DQ2
8	M	2	Positivo	-	Marsh 3a	HLA DQ2
9	H	11	Positivo	1/160	-	HLA DQ2
10	M	4	Positivo	1/160	Marsh 3b	HLA DQ2
11	M	0	Positivo	-	Marsh 3c	-
12	H	13	Positivo	-	Marsh 3a	HLA-DQ2

H: Hombre, M: Mujer.

3.2. MUESTRAS

3.2.1. Muestras serológicas

Se tomaron 2 viales de 3 mL con anticoagulante EDTA-K3 y se centrifugaron a 2000 g tras los 30 primeros minutos de su obtención. El plasma resultante se conservó a -80°C hasta su posterior procesamiento. Las muestras de suero se analizaron en los mismos hospitales en los que se realizó la toma de muestra y se determinó los niveles de anti-tTG IgA y anti-DGP IgA.

3.2.2. Muestras fecales

Los participantes fueron instruidos para que recogiesen entre 2 y 4 g de heces en recipientes sellados. Estas muestras se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis en el laboratorio.

3.3. MATERIALES

3.3.1. Materiales para la inmunocromatografía

Para el ensayo inmunocromatográfico se emplearon las tiras iVYCHECK GIP-Stool para detección rápida de gluten en heces (Biomedal, Sevilla, España) y placas multipocillos (Nunc de Roskilde, Dinamarca). La dilución y elución de las muestras se realizó con solución de dilución para inmunocromatografía, suministradas por el proveedor.

3.3.2. Material para ELISA

En la realización del ELISA se empleó el kit iVYLISA GIP-S (Biomedal S.L., Sevilla, España) con las siguientes soluciones y reactivos:

- 12 tiras multipocillos (8 pocillos/tira) tapizadas con el anticuerpo G12.
- Solución de lavado concentrada 10 veces.
- Solución de dilución para ELISA.
- Solución de extracción.
- Solución sustrato.
- Solución stop.
- Anticuerpo G12-HRP conjugado.
- 5 patrones: 50; 25; 6,25; 3,12 y 1,56 ng/mL de GIP.

3.3.3. Programas

Para el análisis estadístico se empleó el programa GraphPad 6.01 de Prism para Windows. La creación de tablas y gráficas se realizó con el programa Excel 2013 perteneciente al paquete de programas Office 2013 de Microsoft para Windows y el programa GraphPad 6.01.

3.4. MÉTODOS

3.4.1. Extracción de GIP

En primer lugar, se acondicionó las muestras de heces a temperatura ambiente. Tras ello, se procedió a la extracción de los GIP de las muestras añadiendo solución de extracción a las muestras según su peso, de tal manera que se empleó un volumen, en mL, equivalente a 9 veces la cantidad de muestra pesada en gramos. La solución de extracción con la muestra incluida se mezcló empleando un agitador tipo vortex (modelo Classic Advanced, de VELP Scientifica, Usmate-Velate, Italia).

Las muestras se incubaron a 50 °C durante 60 minutos en un baño termostático (modelo WB4, Biosan, Riga, Letonia), agitando periódicamente durante este intervalo de tiempo. Finalizado el periodo de tiempo las muestras fueron centrifugadas a 2.500 g durante 10 minutos (centrífuga modelo 5804R de Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Finalmente, se recuperó el sobrenadante.

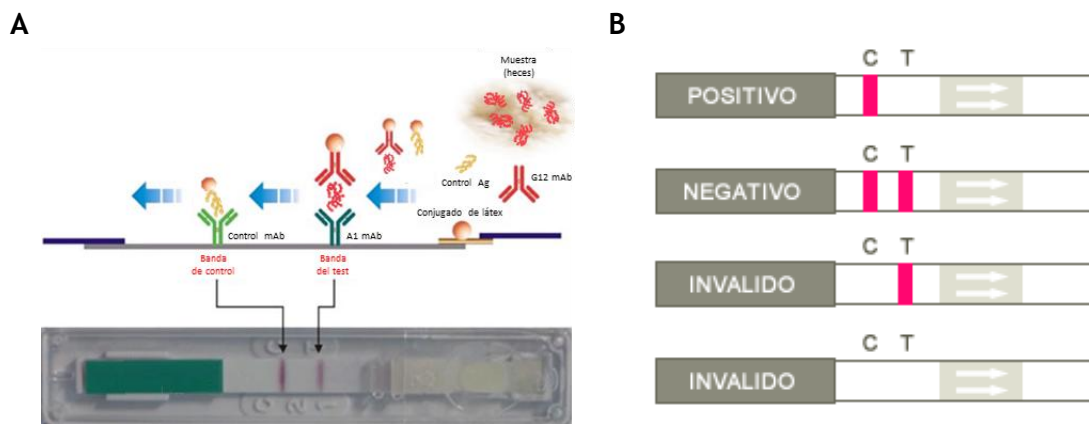
3.4.2. Tiras inmunocromatográficas

Finalizada la extracción se realizó el ensayo con las tiras inmunocromatográficas iVYCHECK GIP-Stool. Acondicionadas a temperatura ambiente la solución de dilución, se preparó una dilución 1:10 a partir de las muestras previamente extraídas. Se añadieron 30 µL de la extracción

de GIP y 270 μL de solución de dilución en un tubo de 1,5 mL y se agitó mediante agitador tipo vortex.

Como soporte para las tiras se empleó una placa multipocillos sin tapizar. Se añadieron 100 μL de cada muestra a los pocillos y se colocó una tira verticalmente en cada uno de ellos. La muestra ascendió por las tiras, siguiendo la representación gráfica mostrada en la **Figura 4A**. A los 10 minutos se dio por finalizada la prueba y se retiraron las tiras. Los resultados se leyeron siguiendo el esquema de la **Figura 4B**.

Figura 4



Técnica de inmunocromatografía.

A) Representa la técnica de inmunocromatografía: los GIP de la muestra se unen a unos anticuerpos (G12) marcados con latex específicos para estos y el complejo migra por la tira hasta encontrar anticuerpos adsorbidos (A1) que se unen al mismo antígeno por otro epítipo reteniendo el complejo (banda test). El antígeno control migra hasta una banda control donde hay anticuerpos que lo reconocen.

B) Posibles resultados del procedimiento. No se considerará válido un ensayo en el que no se muestre coloreada la banda control, ya que indica una elución incompleta. La banda test corresponde a T y la banda control a C.

3.4.3. ELISA sándwich

La concentración de GIP en heces se determinó mediante ELISA sándwich iVYLISA GIP-S Kit, el cual emplea el anticuerpo monoclonal anti-33-mer G12 que reconoce los péptidos semejantes al péptido 33-mer de la α -2-gliadina, uno de los péptidos más inmunogénicos del gluten (Morón y cols., 2008). El método empleado presenta una sensibilidad del 98,5 % y una especificidad del 100% (Comino y cols., en revisión).

El ensayo se realizó conforme al protocolo incluido en el kit iVYLISA GIP-S. Para comenzar se acondicionó los reactivos del ensayo a temperatura ambiente (a excepción del anticuerpo G12-HRP, mantenido a 4 °C) y se realizó una dilución 1:10 con agua destilada de la solución de lavado.

Para el ensayo se empleó una dilución 1:10 de las muestras previamente extraídas. Se añadieron 30 μL de sobrenadante de la extracción de GIP a 270 μL de la solución de dilución en tubos de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se mezcló mediante agitador tipo vortex.

Finalizada la preparación de la diluciones, se procedió a comenzar el ELISA sándwich (**Figura 5**). Se añadió entonces en la placa 100 μL de los distintos patrones y controles incluidos, así como de cada muestra diluida, todo ello por duplicado. Se prosiguió a su posterior incubación en oscuridad durante 60 minutos, a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, se realizaron 5

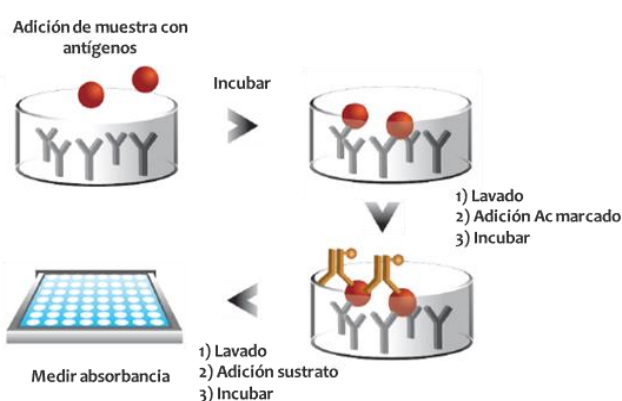
lavados de la placa empleando la solución de lavado en el lavador automático (Asys Atlantis de Biochrom, Cambridge, Reino Unido). Una vez finalizado el lavado, se añadió 100 μL del anticuerpo G12-HRP, se volvió a realizar una incubación empleando las mismas condiciones anteriores y se lavó de la misma manera. A la placa se le adicionaron 100 μL de solución de sustrato por

pocillo y se incubó durante 30 minutos en oscuridad, tras lo cual se añadió 100 μL de solución stop a todos los pocillos. Por último, se procedió a la lectura de absorbancia de la placa a 450 nm (lector Asys UVM340 de Biochrom, Cambridge, Reino Unido).

Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se calculó los valores medios de cada duplicado, desviación estándar y coeficiente de variación de cada muestra y se construyó una curva patrón representando la concentración de GIP (eje x) frente a los valores medios de absorbancia previamente obtenidos (eje y) (**Figura 6**).

Tras realizar la curva se procedió al cálculo de la concentración de GIP de cada muestra a partir de dicha ecuación. Posteriormente, el resultado obtenido se multiplicó por el factor de dilución (1:10) y el factor de extracción (1:10) empleados.

Figura 5



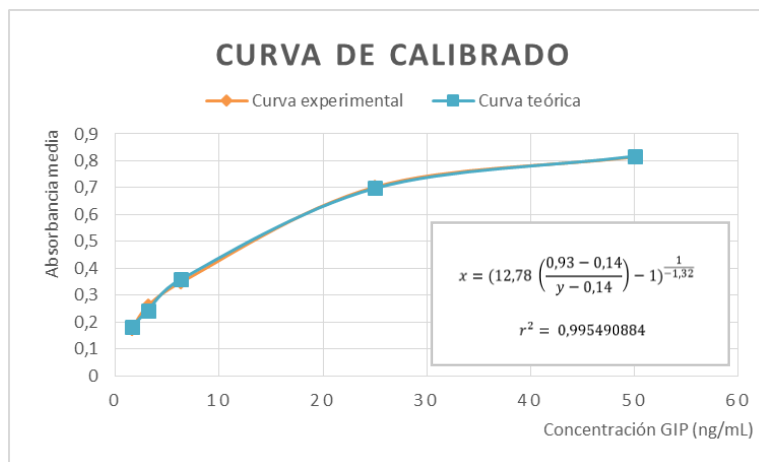
Representación gráfica de la técnica ELISA sándwich.

Figura 6

A

Eje X			Eje Y	
Concentración (ng/mL)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Media	C.V.%
50	0,789	0,840	0,815	4,43
25	0,701	0,705	0,703	0,40
6,25	0,347	0,348	0,348	0,20
3,13	0,263	0,261	0,262	0,54
1,56	0,160	0,190	0,175	12,12
Control negativo	0,171	0,169	0,170	0,83
Control positivo	1,034	1,019	1,027	1,03

B



Representación de la curva patrón.

A) Datos empleados para construir la curva. C.V.% es el coeficiente de variación.

B) Se representa la curva de calibrado obtenida mediante ELISA. La curva resultante (curva experimental) se ajustan con una curva sigmoidea proporcionada por el proveedor del kit (curva teórica) para comprobar su coeficiente de correlación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DETERMINACIÓN DE GIP EN HECES DE PACIENTES CELÍACOS

Los péptidos procedentes del gluten, y sobre todo los péptidos relacionados con el 33-mer de la α -2-gliadina, son resistentes a la digestión gastrointestinal, lo cual implica que una cantidad considerable del gluten ingerido es excretado a través de las heces. Como consecuencia, la detección de fracciones inmunotóxicas cuantificables de estas proteínas del gluten en las heces es indicativo del no cumplimiento de la DSG.

En este estudio se han analizado los niveles de GIP en pacientes celíacos desde el momento del diagnóstico (visita 1), en el que los pacientes se encontraban en dieta normal con gluten, y en su posterior seguimiento en DSG. Durante el periodo en DSG, los niveles de GIP fueron evaluados a los 6 (visita 2), 12 (visita 3) y 18 meses (visita 4). Así mismo, se incluyeron sujetos controles tanto consumidores de gluten (controles positivos), como no consumidores de gluten (lactantes que nunca habían consumido gluten).

Las tiras inmunocromatográficas permiten realizar la detección de GIP en heces de manera cualitativa y de una forma rápida y cómoda obteniendo resultados en unos minutos (**Figura 6**). Como ya se ha mencionado, las tiras iVYCHECK GIP-Stool emplean 2 anticuerpos (G12 y A1), ambos obtenidos frente al péptido 33-mer, pero con epítomos de reconocimiento distintos (Morón y cols., 2008a y 2008b). La facilidad de uso y la rapidez en la obtención de resultados sería beneficioso para la práctica clínica en el seguimiento de pacientes.

Los resultados de las tiras en los pacientes controles concuerda con lo que cabía de esperar: en el grupo de controles positivos, sujetos sanos consumidores de gluten, todos fueron positivos para GIP. Así mismo, en el grupo de controles negativos, lactantes que nunca han ingerido gluten, no se detectó GIP (**Tabla 5**).

Figura 6



Fotografía de las tiras inmunocromatográficas iVYCHECK GIP-Stool. A) Tiras con resultados negativos. B) Tiras con resultados positivos.

Tabla 5

Resultados obtenidos de GIP fecal, anti-tTG y anti-DGP en el grupo control. Los resultados mostrados se diferencian en 2 grupos: controles positivos y controles negativos.

Control	ELISA				TIRAS	ANTICUERPOS SÉRICOS			
	GIP (µg GIP/g muestra)	GIP (µg GIP/g muestra)	GIP (µg GIP/g muestra)	GIP Cualitativo	INMUNOCROMATO-GRÁFICAS	Anti-tTG IgA (U/mL)	Anti-tTG IgA Cualitativo	Anti-DGP IgA (U/mL)	Anti-DGP IgA Cualitativo
	Resultado 1	Resultado 2	Media		GIP Cualitativo				
Controles positivos									
1	> 5,00	> 5,00	> 5,00	Positivo	Positivo	0,40	Negativo	0,10	Negativo
2	0,72	0,60	0,66	Positivo	Positivo	0,10	Negativo	0,50	Negativo
3	3,91	> 5,00	-*	Positivo	Positivo	0,20	Negativo	0,40	Negativo
Controles negativos**									
4	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	-	-	-	-
5	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	-	-	-	-
6	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	-	-	-	-

*No se pudo realizar la media debido a que uno de los resultados fue > 5,00.

**En el grupo de controles negativos la serología no fue realizada.

Con respecto a los pacientes celíacos, en la primera visita todos los pacientes mostraron ser positivos. En las visitas 2, 3 y 4 los pacientes ya habían sido diagnosticados y eran conscientes de que debían seguir una DSG, por lo que valores positivos indicarían un incumplimiento del tratamiento. El conjunto de las tres visitas suponen un total de 36 muestras, de las cuales 5 fueron positivas para GIP y el resto, 31, fueron negativas (**Tabla 6**).

Las tiras inmunocromatográficas son una herramienta a tener en cuenta para el uso clínico debido a que la facilidad de uso y la rapidez en la obtención de resultados sería beneficioso para la práctica clínica en el seguimiento de pacientes.

Con el fin de cuantificar los niveles de GIP en cada una de las muestras anteriores se empleó la técnica ELISA. Se consideraron positivos aquellos valores > 0,3 µg GIP/g muestra, positivos débiles aquellos entre 0,3 y 0,16 µg GIP/g muestra y negativos aquellos < 0,16 µg GIP/g muestra (Comino y cols., en revisión). Mediante esta técnica los controles también mostraron los resultados esperados, de tal manera que se encontraron niveles de gluten por encima 0,3 µg GIP/g muestra en los controles positivos y no se detectó gluten en los controles negativos (**Tabla 5**).

Respecto a las muestras de los pacientes celíacos pediátricos de la visita 1, 10 pacientes mostraron ser positivos para GIP mientras que los 2 restantes fueron considerados positivos débiles. Así mismo, respecto a las 36 muestras totales del resto de visitas, 3 resultaron ser positivas para GIP, 4 fueron positivas débiles y las 29 restantes fueron negativas para GIP.

Tabla 6

Resultados obtenidos de GIP fecal, anti-tTG y anti-DGP en los pacientes celíacos del estudio tras el diagnóstico y en las distintas visitas de seguimiento.

Paciente	Visita	ELISA				TIRAS INMUNOCROMATOGRAFICAS		ANTICUERPOS SÉRICOS			
		GIP (µg GIP/g muestra) Resultado 1	GIP (µg GIP/g muestra) Resultado 2	GIP (µg GIP/g muestra) Media	GIP Cualitativo	GIP Cualitativo	Anti-tTG IgA (U/mL)	Anti-tTG IgA Cualitativo	Anti-DGP IgA (U/mL)	Anti-DGP IgA Cualitativo	
1	1	0,24	0,24	0,24	Positivo débil	Positivo	8,6	Dudoso	9,1	Dudoso	
	2	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	3,5	Negativo	3,2	Negativo	
	3	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	3,7	Negativo	2,1	Negativo	
	4	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	2,1	Negativo	1,8	Negativo	
2	1	> 5,00	> 5,00	> 5,00	Positivo	Positivo	48,0	Positivo	13,0	Positivo	
	2	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	1,5	Negativo	1,3	Negativo	
	3	0,16	0,16	0,16	Positivo débil	Negativo	0,5	Negativo	0,9	Negativo	
	4	0,22	0,22	0,22	Positivo débil	Negativo	1,4	Negativo	1,3	Negativo	
3	1	> 5,00	> 5,00	> 5,00	Positivo	Positivo	128,0	Positivo	95,0	Positivo	
	2	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	54	Positivo	2,3	Negativo	
	3	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	20	Positivo	1,3	Negativo	
	4	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	11	Positivo	1,1	Negativo	
4	1	1,00	> 5,00	.*	Positivo	Positivo	42,0	Positivo	2,8	Negativo	
	2	1,03	0,18	0,61	Positivo	Positivo	14	Positivo	1,6	Negativo	
	3	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	3,9	Negativo	2,1	Negativo	
	4	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	4,8	Negativo	1,4	Negativo	
5	1	0,23	0,20	0,21	Positivo débil	Positivo	128,0	Positivo	142,0	Positivo	
	2	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	5,2	Negativo	1,9	Negativo	
	3	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	5,2	Negativo	1,8	Negativo	
	4	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	1,9	Negativo	0,7	Negativo	
6	1	> 5,00	> 5,00	> 5,00	Positivo	Positivo	104,0	Positivo	12,0	Positivo	
	2	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	3,3	Negativo	0,6	Negativo	
	3	0,32	0,32	0,32	Positivo	Positivo	34	Positivo	6,5	Negativo	
	4	0,37	0,37	0,37	Positivo	Positivo	24	Positivo	6,9	Negativo	

7	1	0,43	0,60	0,52	Positivo	Positivo	128,0	Positivo	0	Negativo
	2	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	16,0	Positivo	1,6	Negativo
	3	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	11,0	Positivo	1,1	Negativo
	4	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	8,1	Dudoso	2,3	Negativo
8	1	> 5,00	> 5,00	> 5,00	Positivo	Positivo	16,0	Positivo	1,1	Negativo
	2	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	8,7	Dudoso	0,9	Negativo
	3	0,25	0,25	0,25	Positivo débil	Positivo	6,9	Negativo	0,6	Negativo
	4	< LQ	0,41	* -*	Positivo débil	Positivo	6,8	Negativo	0,4	Negativo
9	1	1,92	2,57	2,25	Positivo	Positivo	128,0	Positivo	81,0	Positivo
	2	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	24,0	Positivo	5,2	Negativo
	3	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	12,0	Positivo	2,8	Negativo
	4	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	9,2	Dudoso	2,4	Negativo
10	1	0,81	0,84	0,82	Positivo	Positivo	28,0	Positivo	10,0	Positivo
	2	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	2,6	Negativo	2,0	Negativo
	3	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	1,4	Negativo	1,2	Negativo
	4	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	1,1	Negativo	1,7	Negativo
11	1	> 5,00	> 5,00	> 5,00	Positivo	Positivo	146,0	Positivo	18,0	Positivo
	2	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	18,0	Positivo	9,9	Dudoso
	3	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	14,94	Positivo	5,4	Negativo
	4	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	9,6	Dudoso	1,9	Negativo
12	1	> 5,00	> 5,00	> 5,00	Positivo	Positivo	29,0	Positivo	1,8	Negativo
	2	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	12,0	Positivo	4,2	Negativo
	3	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	5,6	Negativo	1,0	Negativo
	4	< LQ	< LQ	< LQ	Negativo	Negativo	5,5	Negativo	1,0	Negativo

LQ: límite de cuantificación.

*No ha sido posible calcular el valor medio debido a que una de las absorbancias era > 5,00 o < LQ.

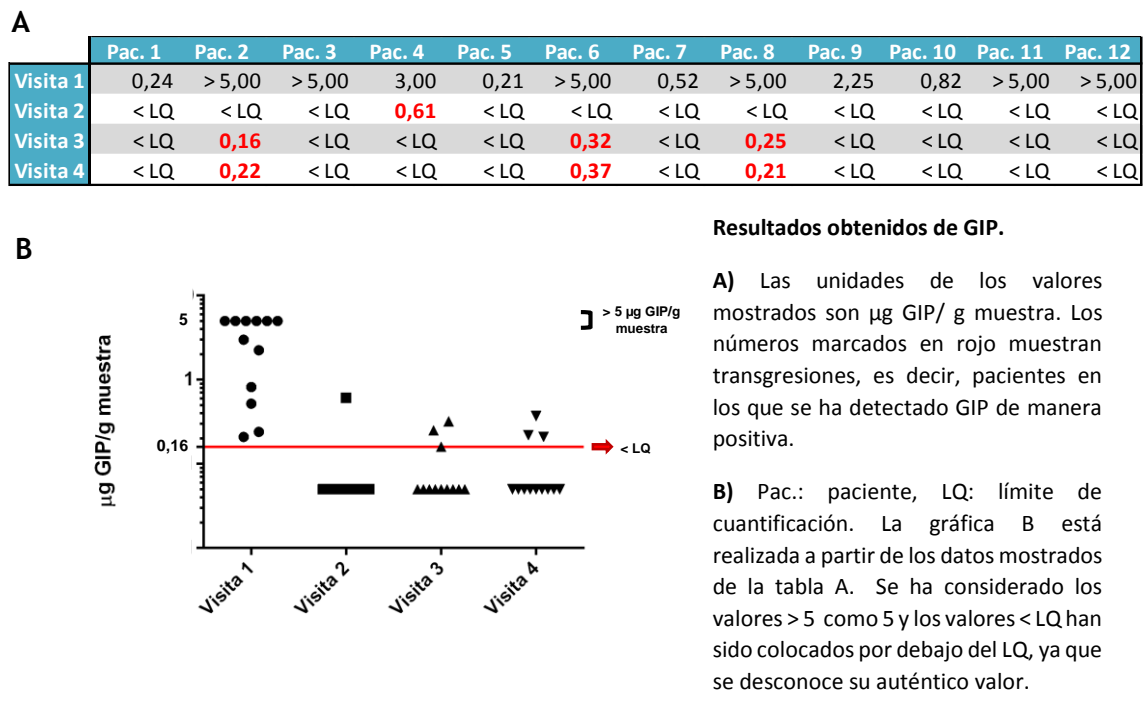
Comparando ambas técnicas, todos los resultados coinciden tanto para valores de GIP positivos como negativos, a excepción de 2 positivos débiles de ELISA (pertenecientes a las visitas 3 y 4 del paciente 2) que resultan ser negativos mediante tiras (**Tabla 6**). Observando el número de pacientes transgresores, mediante ELISA se ha conseguido detectar 4 transgresores, 3 de ellos también detectados mediante tiras.

Analizando más profundamente las transgresiones cometidas, de 12 pacientes, 4 mostraron un incumplimiento de la DSG, aunque en términos generales se produjo una reducción de la cantidad de gluten ingerido con respecto a la visita 1 (**Figura 7**). Así pues, como ya se ha comentado, respecto al total de pacientes un 33,3% ha mostrado incumplimiento de la DSG y el 66,6% restante parecen mostrar adherencia a la dieta. Los estudios de adherencia dietética en poblaciones pediátricas varían mucho respecto al porcentaje de incumplimiento, llegando a ser del 5 al 60% aproximadamente, incluso del 80% si contemplamos grupos concretos de edad (Rashid y cols., 2005; Bravo y Muñoz, 2011; Sarkhy y cols., 2015). El hecho de existir diferencias socioculturales, distintos periodos de estudio y la fiabilidad de los métodos empleados, hacen que el porcentaje varíe mucho en los diferentes estudios.

En los grupos pediátricos debe tenerse en cuenta además que la adherencia varía con la edad. Generalmente los niños menores (< 3 años) cumplen mejor la dieta porque son más dependientes de los padres en comparación con la adherencia de niños mayores y adolescentes que están menos controlados dietéticamente por sus padres y están más sujetos a las influencias sociales (MacCulloch y Rashid, 2014; Comino y cols., en revisión). En este estudio, 3 de los 4 pacientes que transgredieron tenían 14, 11 y 8 años, estando entre los niños mayores del grupo. En un estudio semejante al aquí presentado (Comino y cols., en revisión) se mostró un incumplimiento del 14,3% en niños de entre 0 y 3 años; 27,8% en niños de entre 4 y 12 años y hasta un 39,2% en > 13 años. En este estudio, se ha detectado que 1/3 de los pacientes incumplían la DSG.

La adherencia a la DSG es muy difícil, en gran parte debido a la gran abundancia de los cereales en la dieta de los países occidentales (pan y pasta, por ejemplo), a la presencia de gluten en los productos procesados y al mayor costo de los productos sin gluten (Kinsey y cols., 2008; Missbach y cols., 2015). Los enfermos con EC deben de tomar alimentos sin gluten, los cuales suelen ser productos de bastante menor palatabilidad comparados con los que contienen gluten. No obstante, aunque en los últimos años ha aumentado la disponibilidad de los productos libres de gluten, aún siguen siendo escasos en supermercados, restaurantes y otros tipos de locales que permitan comer fuera y dentro del hogar, dificultándose aún más el cumplimiento de la DSG (Singh y Whelan, 2011; Alzaben y cols., 2015).

Figura 7



En cualquier caso, también debe tenerse en cuenta la posibilidad de que ciertas transgresiones puedan ser involuntarias, ya que es posible que el paciente o sus tutores estén empleando productos de los cuales no tienen conocimiento de que posean gluten (Missbach y cols., 2015). Recientemente, un estudio realizado en Canadá pone de manifiesto este hecho, donde personas adultas con una media de 6 años de tratamiento con DSG no supieron identificar entre aquellos alimentos claramente con gluten, claramente sin gluten o aquellos con posibilidad de contenerlo, a pesar de que la mayoría consideraba seguir una DSG adecuada (Silvester y cols., 2016).

4.2. EVALUACIÓN DE MARCADORES SEROLÓGICOS EN PACIENTES CELÍACOS

Como ya se ha explicado anteriormente, el estudio de los marcadores serológicos se emplea en el diagnóstico y seguimiento de la EC. Los marcadores serológicos son los más usados en el caso del seguimiento a pacientes celíacos a pesar de no haber demostrado ser totalmente fiables. Esto es debido a la carencia de métodos alternativos que permitan realizar seguimientos con mayor eficacia (Adriaanse y Leffler, 2015). Así pues, aunque anti-tTG IgA es el anticuerpo más empleado en el diagnóstico, su uso en el seguimiento es muy discutido. Anti-DGP IgA se considera que tiene menor valor diagnóstico que anti-tTG, pero parece ser más útil en el seguimiento de la EC (Monzani y cols., 2011).

En este trabajo se emplearon los anticuerpos anti-tTG y anti-DGP IgA para conocer las transgresiones dietéticas en los pacientes objeto de estudio. El rango de valores para la interpretación de los resultados cualitativos fue positivo si el valor fue de ≥ 10 U/mL, negativo si fue < 7 U/mL y dudoso en caso de estar entre 7 y 10 U/mL, para ambos anticuerpos.

Los controles positivos (pacientes sanos consumidores de gluten) mostraron una serología negativa tanto para anti-tTG como anti-DGP (**Tabla 5**). En el grupo de controles negativos (lactantes que nunca han ingerido gluten) no ha sido estudiada la serología debido a la corta edad de los pacientes (> 6 meses).

En el caso de los pacientes en estudio, cuando se realizó la visita 1, de 12 pacientes 1 de ellos era dudoso, siendo los 11 restantes positivos para anti-tTG. Por otro lado, una vez implantada la DSG (visita 2, 3 y 4), se observó una tendencia decreciente en los valores cuantitativos conforme transcurrían las visitas. Sin embargo, se observó una cantidad significativa de casos positivos en 6 pacientes para la visita 2, 4 para la visita 3 y 2 para la visita 4 (**Tabla 6**). Si observáramos este parámetro de manera independiente se podría afirmar que los pacientes han incumplido la dieta, pero se ha de tener en cuenta que los anticuerpo anti-tTG de IgA tardan al menos 6 o 12 meses en normalizarse tras la imposición de una DSG (Gidrewicz y cols., en prensa). Este hecho, se corrobora en los resultados obtenidos y sugiere que el empleo de anti-tTG como marcador de control de la adherencia no es un método fiable en los primeros años de tratamiento.

En cuanto a los resultados de anti-DGP, en la visita 1 se observó que de 12 pacientes, 4 mostraron resultados negativos para anti-DGP y 1 dudoso y, por lo tanto, hubo una mayor cantidad de negativos respecto a los valores de la visita 1 mostrados para anti-tTG. En las visitas 2, 3 y 4, todos los pacientes mostraron valores negativos, a excepción del paciente 11 en la visita 2 que mostró ser dudoso. Por tanto, no se ha detectado ninguna transgresión dietética por este método.

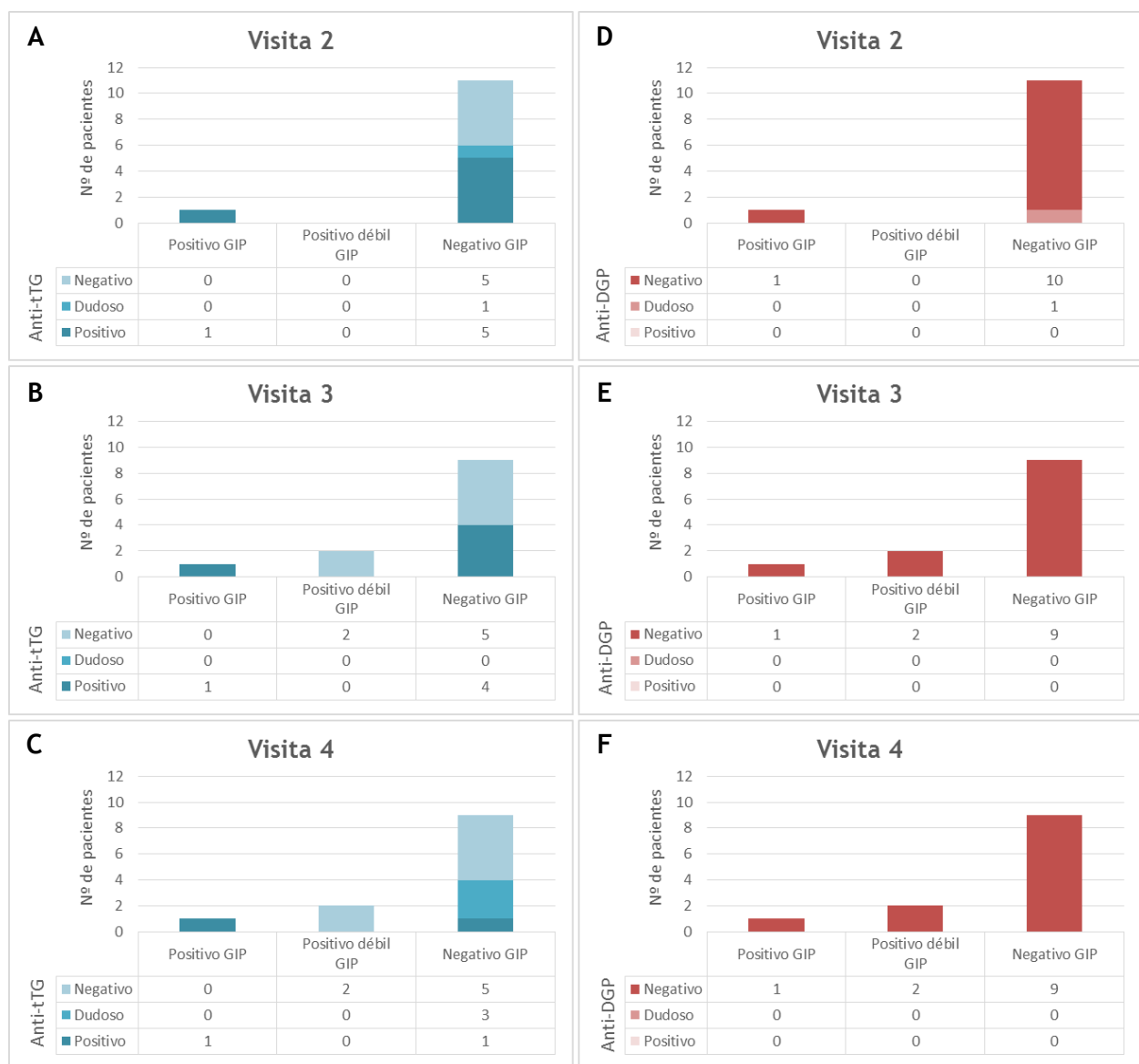
En contraste, los resultados obtenidos cuantificando GIP en heces mostraron que 4 pacientes transgredieron, 1 en la visita 2 y, 3 en la visita 3 y 4. En aquellas en las que las muestras de heces mostraron ser GIP positivo (3 muestras), anti-tTG coincidió en ser positivo. Por otro lado, en aquellas muestras en las que apareció GIP positivo débil (las 4 muestras restantes) anti-tTG fue negativo. En el caso de anti-DGP, todas las muestras fueron negativas. Como se observa, ninguno de los dos marcadores ha conseguido detectar todas las transgresiones detectadas según GIP fecal. Además, en el caso de anti-tTG debe tenerse en cuenta que en los positivos detectados influye el hecho de contar con pacientes recién diagnosticados en los que probablemente la serología aún no se ha normalizado (**Figura 10**).

Los métodos inmunológicos basados en los anticuerpos G12 y A1 son una herramienta no invasiva y más fiable que las pruebas serológicas para evaluar el cumplimiento de la DSG en los pacientes celíacos. La metodología que se describe en este trabajo, puede ser muy útil en:

- El diseño de ensayos clínicos relacionados con la enfermedad celíaca
- El seguimiento a corto plazo de la dieta sin gluten
- La evaluación de la eficacia de las terapias alternativas para esta enfermedad, y
- El diagnóstico de las transgresiones dietéticas debidas a contaminaciones involuntarias en los alimentos.

Las perspectivas futuras del trabajo realizado es, primero, aumentar el número de individuos pediátricos hasta llegar a un número adecuado para realizar un estudio estadístico y, segundo, realizar un estudio similar en una población celíaca adulta.

Figura 10



Resultados obtenidos de los marcadores serológicos en comparación con los valores obtenidos de GIP en las visitas 2, 3 y 4.

A, B, C) Representación de anti-tTG por visita respecto GIP.

D, E, F) Representación de anti-DGP por visita respecto GIP.

5. CONCLUSIONES

1. Las tiras inmunocromatográficas han demostrado ser una herramienta rápida y eficaz para comprobar la adherencia a la DSG en los pacientes celíacos.
2. La cuantificación de GIP en heces mediante la técnica ELISA ha permitido cuantificar el nivel de transgresiones realizadas por el paciente celíaco.
3. En el diagnóstico, periodo en el que los pacientes celíacos consumían gluten, se detectó GIP en heces en todos los casos. No obstante, durante el seguimiento, un tercio de los pacientes pediátricos incluidos mostraron transgresiones en la DSG.
4. La determinación de GIP en heces ha demostrado ser más eficaz que los métodos serológicos para el seguimiento de la DSG en los pacientes celíacos pediátricos.

6. **BIBLIOGRAFÍA**

- Abadie V, Jabri B. *IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology*. Immunological Reviews. 2014; 260 (1): 221-234.
- Adriaanse M, Leffler DA. *Serum Markers in the Clinical Management of Celiac Disease*. Digestive Diseases. 2015; 33 (2): 236–243.
- Alzaben AS, Turner J, Shirton L, Samuel TM, Persad R, Mager D. *Assessing Nutritional Quality and Adherence to the Gluten-free Diet in Children and Adolescents with Celiac Disease*. Revue Canadienne de la Pratique et de la Recherche en Diététique. 2015, 76 (2): 56–63.
- Arranz E, Farré C. *Enfermedad celíaca*. 1ª edición. Madrid: Ergón; 2008.
- Arranz E, Garrote JA. *Enfermedad celíaca: introducción al conocimiento actual de la enfermedad celíaca*. 2ª edición. Madrid: Ergón; 2011.
- Barbato M, Maiella G, Di Camillo C, Guida S, Valitutti F, Lastrucci G *et al*. *The anti-deamidated gliadin peptide antibodies unmask celiac disease in small children with chronic diarrhea*. Digestive and Liver Disease. 2011; 43 (6): 465–469.
- Bannister EG, Cameron DJ, Ng J, Chow CW, Oliver MR, Alex G *et al*. *Can celiac serology alone be used as a marker of duodenal mucosal recovery in children with celiac disease on a gluten-free diet?* The American Journal of Gastroenterology. 2014; 109 (9): 1478-1483.
- Brar P, Lee S, Lewis S, Egbuna I, Bhagat G, Green PH. *Budesonide in the treatment of refractory celiac disease*. American Journal of Gastroenterology. 2007; 102 (10): 2265-2269.
- Bravo F, Muñoz MP. *Adherencia e impacto de la dieta sin gluten en niños con enfermedad celíaca*. Revista Chilena de Pediatría. 2011; 82 (3): 191-197.
- Casellas F, Rodrigo L, Vivancos JL, Riestra S, Pantiga C, Baudet JS *et al*. *Factors that impact health-related quality of life in adults with celiac disease: a multicenter study*. World Journal of Gastroenterology. 2008; 14 (1): 46-52.
- Ciacci C, Maiuri L, Russo I, Tortora R, Bucci C, Cappello C *et al*. *Efficacy of budesonide therapy in the early phase of treatment of adult coeliac disease patients with malabsorption: an in vivo/in vitro pilot study*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2009; 36 (12): 1170-1176.
- Comino I, Fernández-Bañares F, Esteve M, Ortigosa L, Castillejo G, Fambuena B *et al*. *Fecal gluten peptides reveal limitations of serological test and food questionnaires for monitoring gluten-free diet in celiac disease patients*. American Journal of Gastroenterology. En revisión.

- de Chaisemartin L, Meatchi T, Malamut G, Fernani-Oukil F, Hosking F, Rault D *et al.* *Application of Deamidated Gliadin Antibodies in the Follow-Up of Treated Celiac Disease.* PLoS One. 2015; 10 (8): e0136745.
- Dowd AJ, Tamminen KA, Jung ME, Case S, McEwan D, Beauchamp MR. *Motives for adherence to a gluten-free diet: a qualitative investigation involving adults with coeliac disease.* Journal of Human Nutrition and Dietetics. 2014; 27 (6): 542–549.
- Endoscopias Murcia. *Enfermedad celíaca.* 2012 [en línea]. [Consultado en mayo 2016]. Disponible en: <http://www.endoscopiasmurcia.es/descripcion-general-enfermedad-cel% C3% ADaca-1.html>
- Fasano A. *Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer.* Physiological Reviews. 2011; 91 (1): 151-175.
- Gidrewicz, D, Trevenen CL, Lyon M, Butzner JD. *Normalization Time of Celiac Serology in Children on a Gluten-free Diet.* Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition. 2016; en prensa.
- Helmerhorst EJ, Wei G. *Experimental Strategy to Discover Microbes with Gluten-degrading Enzyme Activities.* Proceedings SPIE International Society of Optical Engineering. 2014; 9112: 91120D.
- Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R *et al.* *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease.* Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 2012; 54 (1): 136-160.
- Kaukinen K, Peräaho M, Lindfors K, Partanen J, Woolley N, Pikkarainen P *et al.* *Persistent small bowel mucosal villous atrophy without symptoms in coeliac disease.* Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 2007; 25 (10): 1237-1245.
- Kinsey L, Burden ST, Bannerman E. *A dietary survey to determine if patients with coeliac disease are meeting current healthy eating guidelines and how their diet compares to that of the British general population.* European Journal of Clinical Nutrition. 2008, 62 (11): 1333–1342.
- Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C, Thomas K *et al.* *Gliadin Induces an Increase in Intestinal Permeability and Zonulin Release by Binding to the Chemokine Receptor CXCR3.* Gastroenterology. 2008; 135 (1): 194-204.
- Leffler DA, Edwards George JB, Dennis M, Cook EF, Schuppan D, Kelly CP. *A prospective comparative study of five measures of gluten-free diet adherence in adults with coeliac disease.* Alimentary Pharmacology & Therapeutics. 2007; 26 (9):1227-1235.

- Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH *et al.* *The Oslo definitions for coeliac disease and related terms.* Gut. 2013; 62 (1): 43-52.
- MacCulloch K, Rashid M. *Factors affecting adherence to a gluten-free diet in children with celiac disease.* Paediatrics & Child Health. 2014; 19 (6): 305-309.
- Marsh MN. *Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue').* Gastroenterology. 1992; 102 (1): 330-354.
- Missbach B, Schwingshack L, Billmann A, Mystek A, Hickelsberger M, Bauer G *et al.* *Gluten-free food database: the nutritional quality and cost of packaged gluten-free foods.* PeerJ. 2015; 3: e1337.
- Monzani A, Rapa A, Fonio P, Tognato E, Panigati L, Oderda G. *Use of deamidated gliadin peptide antibodies to monitor diet compliance in childhood celiac disease.* Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 2011; 53: 55-60.
- Morón B, Cebolla A, Manyani H, Álvarez-Maqueda M, Megías M, Thomas MC *et al.* *Sensitive detection of cereal fractions that are toxic to celiac disease patients by using monoclonal antibodies to a main immunogenic wheat peptide.* The American Journal of Clinical Nutrition. 2008a; 87 (2): 405-414.
- Morón B, Bethune MT, Comino I, Manyani H, Ferragud M, López MC *et al.* *Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide.* PLoS One. 2008b; 3 (5): e2294.
- Moscoso F, Quera R. *Enfermedad celíaca: revisión.* Revista Médica Clínica Las Condes. 2015; 26 (5): 613-627.
- Pietzak MM. *Follow-up of patients with celiac disease: achieving compliance with treatment.* Gastroenterology. 2005; 128 (4 Suppl 1): S135-S141.
- Pinier M, Fuhrmann G, Galipeau HJ, Rivard N, Murray JA, David CS *et al.* *The Copolymer P(HEMA-co-SS) Binds Gluten and Reduces Immune Response in Gluten-Sensitized Mice and Human Tissues.* Gastroenterology. 2012; 142 (2): 316-325.
- Rashid M, Cranney A, Zarkadas M, Graham ID, Switzer C, Case S *et al.* *Celiac disease: evaluation of the diagnosis and dietary compliance in Canadian children.* Pediatrics. 2005; 116 (6): e754-e759.
- Reilly NR, Green PH. *Epidemiology and clinical presentations of celiac disease.* Seminars in Immunopathology. 2012; 34 (4): 473-478.
- Rocha S, Gandolfi L, Santos JE. *The psychosocial impacts caused by diagnosis and treatment of Coeliac Disease.* Revista da Escola de Enfermagem da USP. 2016; 50 (1): 65-70.

- Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA. *ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease*. American Journal of Gastroenterology. 2013; 108 (5): 656-676.
- Rubio-Tapia A, Murray JA. *Classification and Management of Refractory Celiac Disease*. Gut. 2010; 59 (4): 547–557.
- Sakly W, Mankaï A, Ghdes A, Achour A, Thabet Y, Ghedira I. *Performance of anti-deamidated gliadin peptides antibodies in celiac disease diagnosis*. Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology. 2012; 36 (6): 598-603.
- Sárdy M, Kárpáti S, Merkl B, Paulsson M, Smyth N. *Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis*. The Journal of Experimental Medicine. 2002; 195 (6): 747-757.
- Sarkhy AA, El Mouzan MI, Saeed E, Alanazi A, Alghamdi S, Anil S et al. *Clinical Characteristics of Celiac Disease and Dietary Adherence to Gluten-Free Diet among Saudi Children*. Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition. 2015; 18 (1): 23-29.
- Shan L, Molberg Ø, Parrot I, Hausch F, Filiz F, Gray GM *et al*. Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. Science. 2002; 297 (5590): 2275-2279.
- Shewry PR, Beaudoin F, Jenkins J, Griffiths-Jones S, Mills EN. *Plant protein families and their relationships to food allergy*. Biochemical Family Transactions. 2002; 30 (6): 906-910.
- Silvester JA, Weiten D, Graff LA, Walker JR, Duerksen DR. *Is it gluten-free? Relationship between self-reported gluten-free diet adherence and knowledge of gluten content of foods*. Nutrition. 2016; 32 (7-8): 777-783.
- Singh J, Whelan K. *Limited availability and higher cost of gluten-free food*. Journal of Human Nutrition and Dietetics. 2011; 24 (5): 479–486.
- Sollid LM, Jabri B. *Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease*. Nature Reviews Immunology. 2013; 13 (4): 294-302.
- Stammaes J, Sollid LM. *Celiac disease: Autoimmunity in response to food antigen*. Seminars in Immunology. 2015; 27 (5): 343-352.
- Szaflarska-Poplawska A, Soroczyńska-Wrzeszcz A, Barg E, Józefczuk J, Korczowski B, Grzybowska-Chlebowczyk U *et al*. *Assessment of coeliac disease prevalence in patients with Down syndrome in Poland – a multi-centre study*. Przegląd Gastroenterologiczny. 2016; 11 (1): 41-46.

- Vargas Pérez ML, Melero Ruiz J, Fernández de Mera JJ, González Roiz C, Catalina Fernández I, Romero Albillos A. *Marcadores serológicos y genéticos en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad celíaca*. Anales de Pediatría. 2005; 62 (5): 412-419.
- Vahedi K, Mascart F, Mary JY, LaberrenneJE, Bouhnik Y, Morin MC et al. *Reliability of Antitransglutaminase Antibodies as Predictors of Gluten-Free Diet Compliance in Adult Celiac Disease*. The American Journal of Gastroenterology. 2003; 98 (5): 1079–1087.
- Vécsei E, Steinwendner S, Kogler H, Innerhofer A, Hammer K, Haas OA. *Follow-up of pediatric celiac disease: value of antibodies in predicting mucosal healing, a prospective cohort study*. BMC Gastroenterology. 2014; 14: 28.