

# **USO DE MARCADORES NO INVASIVOS PARA EL SEGUIMIENTO DE LA DIETA SIN GLUTEN EN PACIENTES CELÍACOS PEDIÁTRICOS**



**Verónica Segura Montero**

Grado en Farmacia

Departamento de Microbiología y Parasitología

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla







UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Facultad de Farmacia

Grado en Farmacia

Curso 2016/2017

## ***USO DE MARCADORES NO INVASIVOS PARA EL SEGUIMIENTO DE LA DIETA SIN GLUTEN EN PACIENTES CELÍACOS PEDIÁTRICOS***

**TRABAJO FIN DE GRADO** realizado por Verónica Segura Montero.

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

Lugar y fecha de presentación: Sevilla, 4 de julio de 2017.

Fdo: Dra. Isabel M<sup>a</sup> Comino Montilla

Fdo: Verónica Segura Montero



*“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”*

**Mahatma Gandhi**



## **RESUMEN**

El tratamiento actual de la enfermedad celíaca (EC) es una estricta dieta sin gluten (DSG) durante toda la vida. Es una enfermedad sistémica y controlada mediante entrevistas dietéticas y serología, aunque ninguno de estos métodos ofrece una medida sensible y específica del control de la dieta. Con estos antecedentes, el objetivo de este trabajo fue evaluar el contenido de los péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) en heces como un nuevo marcador no invasivo de monitorización de la DSG en pacientes celíacos pediátricos, y compararlo con los métodos serológicos.

Se realizó un estudio prospectivo de seguimiento clínico, no aleatorizado, ciego, multicéntrico, de ámbito nacional, con 64 pacientes recién diagnosticados de EC, a los que se les realizó un seguimiento de 4 visitas durante 2 años. Para evaluar la exposición al gluten se cuantificó GIP fecal y se comparó con los métodos serológicos: anti-transglutaminasa (anti-tTG) y antipéptido de gliadina desaminado (anti-DGP).

En la visita basal, antes de la DSG, el 96,9% de los pacientes mostraron resultados positivos para GIP. Tras el diagnóstico y comienzo de la DSG, un 20,3% de los pacientes presentaron niveles detectables de GIP en heces. Las transgresiones dietéticas fueron más frecuentes en niños mayores de 7 años, un 46,1% de ellos reincidentes. A pesar de la DSG, los anticuerpos anti-tTG permanecieron con concentraciones elevadas en un 48, 34 y 20% de los pacientes a los 6, 12 y 24 meses de seguimiento, respectivamente, frente al 13, 4,5 y 0% de anti-DGP positivo. Ambos métodos mostraron discordancia con respecto al GIP ( $p < 0,05$ ).

El análisis de GIP ha demostrado ser un método preciso y no invasivo que permite una evaluación directa de exposición al gluten. Este método ha revelado limitaciones de las técnicas serológicas, ya que estos marcadores pueden tardar meses incluso años en normalizarse después de instaurar la DSG.

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





## ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
AGA	Anticuerpo antigliadina
Anti-DGP	Anticuerpo antipéptido de gliadina desaminado
Anti-tTG	Anticuerpo anti-transglutaminasa tisular
AR	Alquilresorcinoles
CDs	Células dendríticas
CPA	Células presentadoras de antígenos
CRDe	Cuaderno de recogida de datos electrónico
CV	Coeficiente de variación
DCG	Dieta con gluten
DSG	Dieta sin gluten
EC	Enfermedad celíaca
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
EMA	Anticuerpo antiendomiso
ESPGHAN	<i>European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition</i>
Et al.	Y colaboradores
FACE	Federación de Asociaciones de Celíacos de España
g	Gramos
GIP	Péptidos inmunogénicos del gluten
HLA	Antígeno leucocitario humano
HRP	Peroxidasa del rábano
IELs	Linfocitos intraepiteliales
I-FABP	Proteínas de unión a ácidos grasos intestinales
IFN $\gamma$	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IL-15	Interleuquina 15
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
LOQ	Límite de cuantificación
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
NF-kB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minutos
Th1	Linfocitos T CD4 colaboradores tipo Th1
TMB	Tetrametilbencidina
tTG	Transglutaminasa tisular
UV	Ultravioleta
$\mu$ l	Microlitros
$\mu$ g	Microgramos
19-mer	Péptido de 19 aminoácidos
33-mer	Péptido de 33 aminoácidos



## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
1.1. PATOGENIA DE LA EC	5
1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA EC	7
1.3. CLÍNICA DE LA EC	8
1.4. DIAGNÓSTICO DE LA EC	9
1.4.1. Marcadores serológicos	9
1.4.2. Estudios genéticos	10
1.4.3. Biopsia e histología	11
1.5. TRATAMIENTO, SEGUIMIENTO Y ADHERENCIA EN LA EC	12
1.5.1. Método para la evaluación de la adherencia a la DSG	13
1.5.1.1. Respuesta clínica	13
1.5.1.2. Entrevistas y cuestionarios dietéticos	13
1.5.1.3. Métodos serológicos	13
1.5.1.4. Biopsia	13
1.5.1.5. Otros estudios	14
1.5.1.6. Cuantificación de GIP en heces	14
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>18</b>
3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y PARTICIPANTES	18
3.2. RECOGIDA DE MUESTRAS	18
3.2.1. Muestras serológicas	18
3.2.2. Muestras fecales	19
3.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS	19
3.3.1. Muestras serológicas	19
3.3.2. Muestras fecales	19
3.4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS	21
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>24</b>
4.1. ANÁLISIS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO	24
4.2. EVALUACIÓN DE LA ADHERENCIA A LA DSG EN PACIENTES PEDIÁTRICOS MEDIANTE DETERMINACIÓN DE GIP	25
4.2.1. Relación entre el contenido de GIP y la edad del paciente	27
4.2.2. Estudio de pacientes transgresores y reincidentes de la DSG	28
4.3. COMPARACIÓN DE GIP CON LOS MARCADORES SEROLÓGICOS	30
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>34</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>36</b>



## **1. INTRODUCCIÓN**

La enfermedad celíaca (EC) se definió por primera vez en el congreso que celebró la ESPGHAN (*The European Society for Paediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition*) en Interlaken (Suiza) en el año 1969, y fue publicada posteriormente en 1970 (Meewisse, 1970). Se estableció que era una enfermedad del intestino delgado proximal que se caracterizaba por una mucosa intestinal anormal, asociada a una intolerancia permanente al gluten. Su retirada de la dieta da lugar a una remisión clínica y anatomopatológica. Esta definición se pudo hacer a partir de una serie de descubrimientos previos que van desde el establecimiento del papel del gluten por el Dr. Dicke en el año 1950 (Dicke, 1950) hasta los trabajos de Sakula y Shiner, que confirmaron la atrofia vellositaria (Sakula y Shiner, 1957), y los de Rubin et al. (1962) que demostraron que el gluten es el responsable de la lesión histológica. Posteriormente, la enfermedad se va conociendo mejor y se establece su carácter familiar y la base genética se añade a lo largo de la década de los 70 (Stokes et al., 1972; Keuning et al., 1976).

A lo largo de estos más de 40 años se ha ido conociendo las peculiaridades de esta enfermedad mediante el establecimiento de unos criterios diagnósticos rígidos que han permitido diferenciarla bien de otros procesos que podían tener manifestaciones clínicas y patológicas similares. Durante los últimos 20 años, la percepción de la EC ha pasado de ser una rara enteropatía, a ser una enfermedad multiorgánica muy frecuente, con una fuerte predisposición genética (Mustalahti et al., 2010). En el año 2012, ESPGHAN, a la vista de los nuevos conocimientos, estableció una nuevas guías diagnósticas y definió de nuevo la EC como una enfermedad sistémica inmunomediada, provocada por el gluten y prolaminas relacionadas, en individuos genéticamente susceptibles que se caracteriza por la presencia de una combinación variable de: manifestaciones clínicas dependientes del gluten, anticuerpos específicos de la EC, haplotipos HLA DQ2 o DQ8 y enteropatía (Husby et al., 2012).

Esta enfermedad se desarrolla al ingerir gluten, que es la mayor reserva proteica del trigo y otros cereales similares. El único tratamiento existente a día de hoy para los pacientes celíacos es el seguimiento de una dieta estricta sin gluten (DSG) durante toda la vida (Ludvigsson et al., 2012).

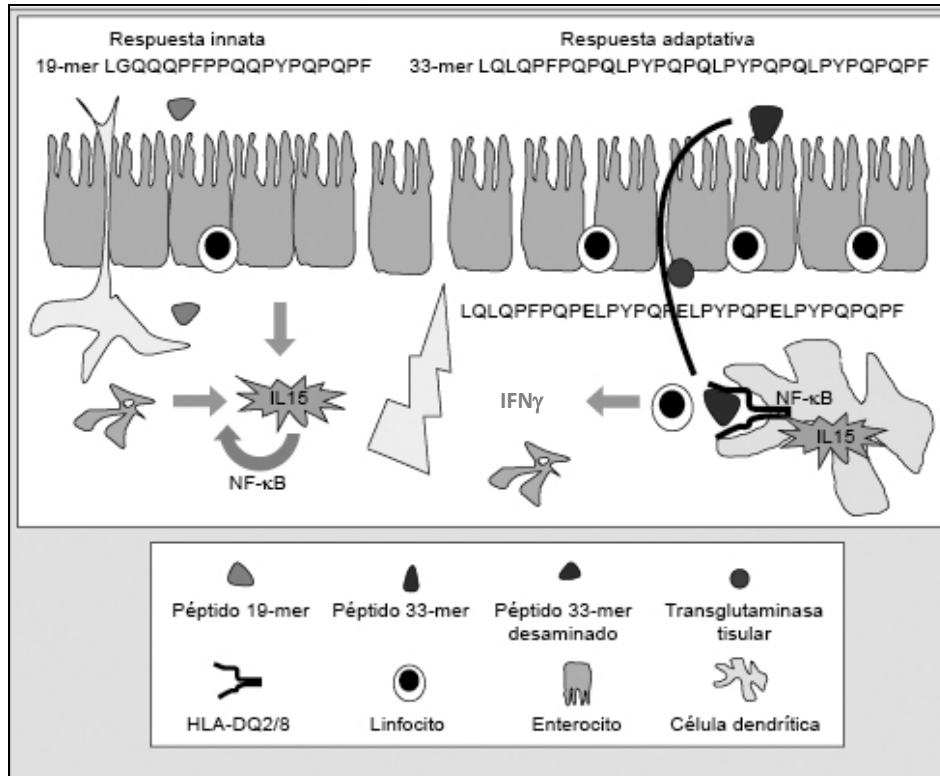
## **1.1. PATOGENIA DE LA EC**

---

El gluten es un conjunto de proteínas presentes en diferentes cereales como el trigo, el centeno, la cebada, la avena y sus derivados (Alaedini y Green, 2005; Comino et al., 2011). Estas proteínas pueden clasificarse según su solubilidad en gliadinas, solubles en alcohol, y gluteninas, solubles en ácido acético. También son conocidas como prolaminas por su alto contenido en prolinas (aproximadamente un 15% del total de aminoácidos y glutamina (aproximadamente un 35%) (Shewry y Halford, 2002). Este hecho hace que las enzimas proteolíticas del aparato digestivo impidan la degradación total de éstas, generando péptidos resistentes a la proteólisis que inducirán una respuesta inmune dando lugar a cambios en la mucosa y destruyendo las vellosidades intestinales (Moscoso y Quera, 2015).

El gluten tiene un efecto doble mediado por la inmunidad innata (efecto tóxico directo del gluten sobre el epitelio) y la inmunidad adaptativa o específica (a través de los linfocitos T CD4+ de la lámina propia o tejido adyacente) (Bernardo y Peña, 2012; **Figura 1**).

Algunos de los péptidos tóxicos generados tras la hidrólisis, como el 19-mer de la gliadina, que posee una secuencia de 19 aminoácidos, LGQQQPFPPQQPYPQPQPF, inducen una respuesta inmune innata inespecífica caracterizada por la presencia de interleuquina 15 (IL-15), la cual activa al factor nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B) en las células adyacentes, lo que a su vez induce más producción de IL-15. Además aumenta la producción de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) facilitándose un estrés oxidativo que retroalimenta a la respuesta innata (Abadie y Jabri, 2014), aumentándose la permeabilidad intestinal y como consecuencia los péptidos pasan a través del epitelio hasta alcanzar la lámina propia, donde se desencadena la respuesta adaptativa (Sander et al., 2005).



**Figura 1.** Mecanismos de las respuestas innata y adaptativa de la EC (Arranz, 2014). IFN $\gamma$ , interferón gamma; NF- $\kappa$ B, factor nuclear kappa beta; IL-15, interleuquina 15.

Algunos péptidos inmunoadaptativos como el péptido 33-mer de la fracción  $\alpha$ -2 gliadina (residuos 57-59), LQLQPFPPQQLPYQPQLPYQPQLPYQPQPF, es muy resistente a la proteólisis y se considera el principal contribuyente de la inmunotoxicidad del gluten (Sollid, 2002; Schalk et al., 2017). Este péptido contiene 6 epítopos de reconocimiento de las células T, y ha proporcionado la luz sobre el mecanismo molecular de la intolerancia al gluten. Los péptidos una vez dentro, son desaminados por la enzima transglutaminasa tisular (tTG), como consecuencia, los aminoácidos de gliadina con carga positiva, se cargan negativamente y tienen más afinidad por las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8 (genes de susceptibilidad de la EC) de las células dendríticas (CDs). Estas moléculas presentadoras de antígenos (CPA) muestran el péptido desaminado a los linfocitos T CD4+ que se activan, dando lugar a una respuesta dominada por citoquinas pro-inflamatorias (Nilsen et al., 1998). Dichos linfocitos, realizan una respuesta Th1, que inducirá a las células del estroma a secretar factores de crecimiento keratinocítico y metaloproteasas de la matriz extracelular. Adicionalmente, el perfil Th1 se encargará de magnificar la lesión, además de atraer nuevas células pro-inflamatorias a la lámina propia. El efecto final será una linfocitosis intraepitelial, hiperplasia de las criptas y

aplanamiento de las vellosidades, desencadenantes de todas las manifestaciones clínicas de la EC (Bernardo y Peña, 2012; Sollid y Jabri, 2013; Vriezinga et al., 2015).

## 1.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA EC

---

La EC tiene una prevalencia del 1-3% de la población, afectando más a mujeres que a hombres (2:1). La prevalencia en España oscila entre 1/118 en la población infantil y 1/389 en la adulta (Arranz, 2011). Por lo general, es más frecuente en niños que en adultos aunque se dice que hay dos picos, entre 1-3 años en niños y 30-50 años en adultos (Arranz y Garrote, 2011). Esta enfermedad está presente no sólo en Europa y los países poblados por personas de ascendencia europea, sino también de Oriente Medio, Asia y Sudamérica (Arranz, 2011; Ludvigsson y Green, 2011; Mariné et al., 2011; Casellas, 2016; López, 2017). Esta prevalencia puede aumentar ya que un porcentaje importante de casos permanecen sin diagnosticar. Hay estudios que indican que por cada caso diagnosticado puede haber entre 7-11 casos sin diagnosticar (West et al., 2003; Catassi, 2005). Se ha demostrado que la epidemiología de la EC puede definirse mediante el “modelo del *iceberg*” (**Figura 2**). La parte de arriba del *iceberg* (más oscura) se corresponde con los casos diagnosticados (EC sintomática, formas clásicas y atípicas), mientras que la parte de abajo, hace referencia a las formas asintomáticas, en la que se incluye la EC silente, EC latente y EC potencial.

La EC es el resultado de la interacción del gluten con factores inmunológicos, genéticos y ambientales. Los factores ambientales representan un papel muy importante en el desarrollo de la EC, como es el efecto protector de la lactancia materna y la introducción del gluten en relación con el destete. Aunque el tiempo de lactancia materna no afecta al desarrollo de la enfermedad, se puntualiza que el gluten debe introducirse entre los cuatro y seis meses de vida (Mearin, 2015), y no debe sobrepasar los dos años, ya que daría lugar a un aumento de la incidencia, por pérdida de la tolerancia inmunitaria a los antígenos del gluten (Vaquero et al., 2015). También se ha confirmado que los niños nacidos por cesáreas tienen una prevalencia más alta de padecer la enfermedad (Kim, 2015). Recientemente, Bouziat et al., (2017) han demostrado que un tipo de Reovirus podría estar involucrado en el desarrollo de la EC debido a una pérdida de la tolerancia oral y a la activación de linfocitos Th1 frente al gluten.





**Figura 2.** Formas sintomáticas (casos diagnosticados) y asintomáticas (casos no diagnosticados) de la EC en el "modelo iceberg".

### 1.3. CLINICA DE LA EC

---

La EC presenta un amplio abanico de formas clínicas de expresión con síntomas muchas veces inespecíficos que no siempre son correctamente evaluados. El contacto de la mucosa intestinal con el gluten conduce a la aparición de un daño en la mucosa cuyo espectro oscila desde casos en los que únicamente se aprecia aumento de la población de linfocitos intraepiteliales (IELs) hasta formas avanzadas de atrofia vellositaria (Arranz y Garrote, 2016). La presentación clínica de la EC varía en función de la edad como se muestra en la **Tabla 1**. (Polanco, 2011; Vivas et al., 2015). En los niños lactantes predominan la sintomatología digestiva y la afectación nutricional, llamada forma de presentación clásica, pero existen formas de menor expresividad clínica denominadas, formas atípicas más comunes en adultos.

- Forma clásica, predominan la sintomatología gastrointestinal, apareciendo los síntomas después de un tiempo de exposición al gluten, generalmente se manifiesta en lactantes de entre 8 y 24 meses de edad (**Tabla 1**). La sintomatología digestiva incluye diarrea malabsortiva, vómitos, cambios de carácter, malestar general, falta de apetito, palidez, cabello ralo, lesiones en la boca como úlceras o aftas bucales de repetición, malnutrición, etc. (Arranz y Garrote, 2016).

- **Forma atípica**, los síntomas atípicos pueden ser considerados hoy en día más comunes que los clásicos (Husby et al., 2012). Estas formas atípicas aparecen cuando las manifestaciones digestivas están ausentes. Los síntomas pueden ser estreñimiento, retraso de talla o de la pubertad, anemia, hipoplasia del esmalte dentario, aftas bucales recurrentes, calcificaciones intracraneales, hipertransaminasemia, episodios de pseudobstrucción, disminución de la densidad mineral ósea, síntomas neurológicos y psiquiátricos, sobrepeso/obesidad, entre las que predomina la anemia ferropénica (Murray et al., 2013).

## **1.4. DIAGNÓSTICO DE LA EC**

---

Ante una sospecha clínica de EC se realiza una anamnesis detallada al paciente unida a un examen físico cuidadoso. Esto permite establecer el diagnóstico en aquellos pacientes que cursan con sintomatología convencional (Arranz y Garrote, 2016), o bien, en los que, sin mostrar síntomas, pertenecen a grupos de riesgo, ya que tienen familiares de primer grado con dicha enfermedad (Freeman, 2010).

En los pacientes que presenten algunos síntomas y/o signos sugestivos de EC (**Tabla 1**), de forma prolongada y sin etiología conocida, se solicitarán los marcadores serológicos de elección para el cribado de EC y los marcadores genéticos. Sin embargo, la clave del diagnóstico está en la realización de la biopsia de la mucosa intestinal.

### **1.4.1. Marcadores serológicos**

Los marcadores serológicos son de gran utilidad como indicadores de EC. Ayudan a seleccionar a los individuos con mayor probabilidad de presentar la EC, siendo particularmente útiles en aquellos sin síntomas gastrointestinales, en aquellos con enfermedades asociadas a la EC y para el despistaje de familiares de primer grado de enfermos diagnosticados. Debe considerarse, no obstante, que la negatividad de estos marcadores no excluye definitivamente el diagnóstico, siendo necesario en ocasiones recurrir a otras pruebas (estudio genético) cuando la sospecha diagnóstica es elevada (Rubio-Tapia et al., 2013; Korporay-Szabó, 2015). En los niños y adolescente se realiza un estudio de los anticuerpos antitransglutaminasa tisular (anti-tTG) tipo IgA, total o parcial, aunque en el caso de déficit de IgA, se estudiarán los de tipo

IgG, sobre todo en niños menores de 2 años. Los marcadores que se utilizan para el diagnóstico y seguimiento se recogen en la **Tabla 2**.

**Tabla 1.** Síntomas, signos y alteraciones de la EC por edades.

	LACTANTES	PRESCOLARES-ADOLESCENTES	ADULTOS
<b>SÍNTOMAS</b>	Diarrea crónica	Anemia ferropénica	Malabsorción grave con esteatorrea
	Falta de apetito	Estreñimiento	Estreñimiento
	Vómitos	Dolor abdominal	Dispepsia
	Dolor abdominal recurrente	Menarquía retrasada o irregular	Pérdida de peso
	Laxitud e irritabilidad	Cefaleas	Infertilidad, abortos recurrentes
	Apatía	Artralgias	Diarrea crónica
	Tristeza	Hábito intestinal irregular	Vómitos recidivante sin causa aparente
<b>SIGNOS</b>	Malnutrición	Talla baja	Malnutrición
	Distensión abdominal	Aftas bucales	Aftas bucales
	Hipotrofia muscular	Hipoplasia del esmalte	Edemas periféricos
	Retraso estatural	Distensión abdominal	Neuropatía periférica
	Hipoproteinemia	Debilidad muscular	Osteopenia
	Anemia ferropénica	Artritis, osteopenia y queratosis folicular	Talla baja

#### **1.4.2. Estudios genéticos**

Los estudios genéticos (HLA-DQ2/DQ8) son útiles en el manejo de la EC, dado que casi la totalidad de los pacientes celíacos son HLA-DQ2 o DQ8 positivos. El 90% de los pacientes con EC son HLA-DQ2 positivos, mientras que sólo lo expresan un 20-30% de los individuos de la población general. El resto de pacientes celíacos poseen variantes alélicas que codifican HLA-DQ8 sin HLA-DQ2 (6% del total) o un sólo alelo del HLA-DQ2. Por tanto, la ausencia de HLA-DQ2 y HLA-DQ8 hace que el diagnóstico de EC sea muy poco probable (Fassano y Catassi, 2012; Husby et al., 2012). El estudio genético tiene, por tanto, un alto valor predictivo negativo, permitiendo excluir la EC con un 99% de certeza (Arranz y Garrote, 2004).

**Tabla 2.** Uso de marcadores para el diagnóstico de la EC y su utilidad en el cribado de la EC.

Marcador	Tipo	Utilidad
Anticuerpos anti-transglutaminasa tisular (anti-tTG)	IgA e IgG	Son los de preferencia para el diagnóstico de la EC por su gran sensibilidad y especificidad.
Anticuerpos antiendomiso (EMA)	IgA	Útil en el diagnóstico confirmatorio de EC en niños.
Anticuerpos antigliadina (AGA)	IgA	En desuso en la actualidad.
Anticuerpos antipéptido de gliadina desaminado (anti-DGP)	IgA e IgG	Útil en diagnóstico en los casos de déficit de IgA y en niños.

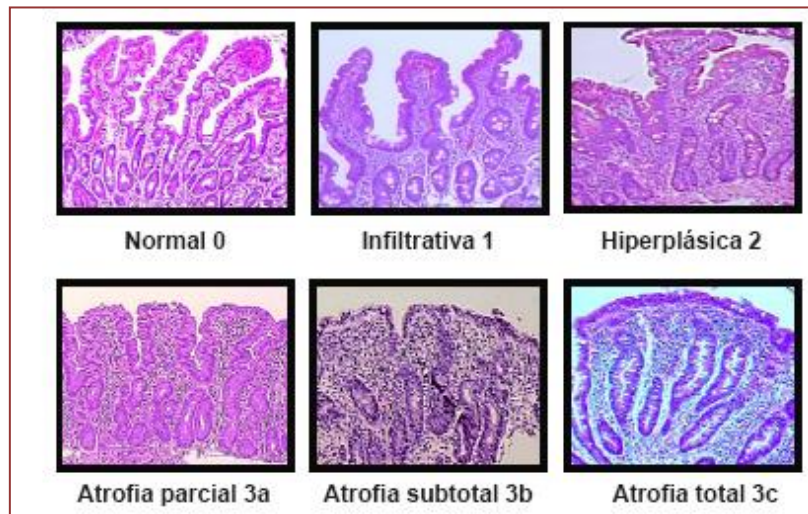
#### **1.4.3. Biopsia e histología**

La biopsia es la prueba de oro para establecer el diagnóstico definitivo, consiste en la práctica de una biopsia del duodeno proximal o del yeyuno (procedimiento más habitual en niños). Siempre debe de llevarse a cabo este procedimiento antes de proceder a la retirada del gluten de la dieta. El resultado del estudio anatomopatológico permite confirmar la existencia de lesiones compatibles y establecer el estadio de la lesión (Clasificación de Marsh). El espectro de lesiones histológicas que presentan estos pacientes es amplio y oscila desde formas de enteritis linfocíticas, donde únicamente se encuentra un incremento de la población de IELs (>25%) clasificado como Marsh 1, hasta formas de atrofia grave de la mucosa, clasificado como Marsh 3 (Husby y cols., 2012).

Cualquiera de las formas histológicas mencionadas es compatible con la enfermedad, pero ninguna de ellas es específica. De ahí la importancia del estudio serológico (**Tabla 2**) y del estudio genético (en caso de serología negativa y alta sospecha clínica), para reforzar el diagnóstico y la necesidad de verificar tanto la mejora clínica como la resolución de las lesiones un tiempo después de haber retirado el gluten de la dieta. Con frecuencia, la recuperación de éstas es lenta, por lo que la biopsia de confirmación no debería llevarse a cabo antes de 18-24 meses. En la Clasificación de Marsh (Marsh, 1992), modificada por Oberhuber (Oberhuber, 1999), de las lesiones del intestino delgado (**Figura 3**), los criterios anatomopatológicos de clasificación que se tienen en cuenta son:

- El aumento de IELs.

- La hipertrofia de las criptas.
- La atrofia vellositaria.



**Figura 3.** Clasificación de Marsh, según las lesiones del intestino delgado (Polanco, 2011).

Según la ESPGHAN, en niños menores de < 2 años el diagnóstico se puede realizar sin la realización de biopsia siempre que se cumpla que los niveles de anticuerpos anti-tTG presenten un valor 10 veces mayor respecto al límite superior del considerado como normal y una genética compatible (DQ2 o DQ8 positivos) (Husby et al., 2012).

### **1.5. TRATAMIENTO, SEGUIMIENTO Y ADHERENCIA EN LA EC**

---

Actualmente, el único tratamiento eficaz para los pacientes celíacos es una DSG durante toda la vida, ya que esto tiene como objetivo aliviar los síntomas, lograr la recuperación de las mucosas y evitar las complicaciones asociadas con la EC. Sin embargo, aunque la adhesión a una DSG puede parecer simple, evitar completamente el gluten en la dieta occidental, es un desafío y puede afectar considerablemente a la calidad de vida del paciente. Las tasas de cumplimiento estimadas varían considerablemente (17-80%), dependiendo de la edad del paciente o de la edad de diagnóstico, entre otros factores. Pero hay que resaltar que, según la Comisión del *Codex Alimentarius*, en la actualidad un alimento "exento de gluten" no es aquel cuyo contenido en gluten es 0, sino el que contiene una cantidad de gluten inferior a 20 mg/Kg (ppm). Por tanto, entre un 32,6 y un 55,4% de los

pacientes incumplen el tratamiento, siendo la falta de rigurosidad en la dieta el motivo por el que resulta difícil controlar la enfermedad en estos pacientes (Silvester et al., 2007).

### **1.5.1 Métodos para la evaluación de la adherencia a la DSG**

#### **1.5.1.1. Respuesta clínica**

El seguimiento de los síntomas o las manifestaciones clínicas sirven para comprobar la mejoría y evolución de la EC. La respuesta clínica no podría ser un único método para monitorizar la adherencia a la DSG ya que un gran número de pacientes celíacos son asintomáticos o mínimamente sintomáticos y en estos casos no sería factible utilizar la respuesta clínica como método de evaluación.

#### **1.5.1.2. Entrevistas y cuestionarios dietéticos**

Las entrevistas y cuestionarios dietéticos se consideran un método poco objetivo ya que los individuos tienden a informar incorrectamente de su nivel de adherencia a la dieta, ya sea intencionadamente o no (Leffler et al., 2013; Comino et al., 2016).

#### **1.5.1.3. Métodos serológicos**

Los marcadores serológicos (anticuerpos anti-tTG y anti-DGP, ya sean IgA o IgG) son los métodos más usados en el diagnóstico y seguimiento de la DSG, sin embargo, proporcionan una medida indirecta y poco efectiva, ya que pueden tardar meses o incluso años en observarse una normalización de los mismos desde el inicio de la DSG, siendo difícil predecir una recuperación de la EC. Además, el nivel de estos marcadores serológicos a menudo no guarda relación con el estado de las vellosidades intestinales y, por tanto, basarse sólo en la serología como método de seguimiento no parece ser muy eficiente (Walker et al., 2011; Chaisemartin et al., 2015).

#### **1.5.1.4. Biopsias**

La realización de la biopsia del intestino delgado se usa para evaluar la curación de la mucosa pero es un procedimiento invasivo, costoso y poco práctico para la monitorización frecuente de la actividad o gravedad de la enfermedad (Buchanan et al., 2008). Aunque la normalización de las vellosidades del intestino delgado en múltiples biopsias es una evidencia definitiva de un correcto tratamiento en la EC, no hay consenso sobre la relevancia de las

biopsias de seguimiento, especialmente en pacientes asintomáticos en los que se observa mejoría clínica (Pietzak, 2005; Husby et al., 2012).

#### 1.5.1.5. Otros estudios

Otros estudios sugirieron como marcadores adecuados de monitorización de la DSG el test de la calprotectina fecal (Ertekin et al., 2010), la cuantificación de los niveles de alquilresorcinoles (AR) en plasma, la cantidad de regenerar el gen de la proteína (REG) I $\alpha$  (Lind et al., 2016) y también otros como son la cuantificación de la proteína de unión a ácidos grasos intestinales (I-FABP) o la citrulina. No obstante, ninguno de estos métodos sirve para medir con exactitud el cumplimiento dietético, ya que son métodos indirectos, poco efectivos y no son específicos de EC.

#### 1.5.1.6. Cuantificación de GIP en heces

Recientemente se ha descrito un nuevo método para monitorizar la adherencia a la DSG mediante la detección de péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) (Comino et al., 2012; Comino et al., 2016). Estos péptidos son fragmentos de proteínas del gluten, resistentes a la digestión gastrointestinal y que originan una cascada de reacciones inmunológicas en el paciente celíaco (Comino et al., 2012). La determinación de GIP se puede simplificar cuantificando los péptidos similares a los encontrados en la secuencia del 33-mer de la  $\alpha$ -gliadina, péptido inmunogénico dominante del gluten presente en los cereales tóxicos para los pacientes celíacos, que reaccionan con los anticuerpos monoclonales G12 y A1 (Morón et al., 2008a; Morón et al., 2008b). Los GIP son resistentes a la digestión gastrointestinal lo que asegura que una cantidad significativa del gluten ingerido sea excretado en las heces. Por consiguiente, la recuperación de cantidades detectables de la fracción inmunotóxica en heces indica que el gluten ha pasado a través del tracto digestivo y, por lo tanto, que el gluten ha sido consumido (Comino et al., 2012; Moreno et al., 2015; Comino et al., 2016).

Este método es fiable, seguro y accesible y permite verificar si el paciente celíaco está siguiendo o no la dieta exenta de gluten, (Comino et al., 2016) incluso permitiendo diagnosticar la existencia de un tipo raro de esta enfermedad a la que se le denomina 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 et al., 2013).





## **2. OBJETIVOS**

El tratamiento actual de la EC es una DSG durante toda la vida del paciente con el fin de aliviar los síntomas, lograr la recuperación de la mucosa, y evitar complicaciones de la enfermedad. Una vez confirmado el diagnóstico de EC y establecida la DSG, es conveniente la realización de un seguimiento clínico-analítico periódico del paciente con el fin de detectar posibles complicaciones y enfermedades asociadas que puedan aparecer en cualquier momento de la evolución de la EC. Sin embargo, ninguno de los métodos disponibles hasta el momento ofrece una medida sensible y específica del control dietético. Las técnicas más ampliamente usadas para este fin, los anticuerpos serológicos, han revelado limitaciones para el control de la DSG en pacientes celíacos pediátricos. En cambio, el análisis de GIP ha demostrado ser un método preciso y no invasivo que permite una evaluación directa y cuantitativa del consumo del gluten poco después de la ingesta.

En base a esto el **OBJETIVO GENERAL** de este Trabajo Fin de Grado fue evaluar el contenido de GIP en heces como un marcador no invasivo de monitorización de la DSG en pacientes celíacos pediátricos de reciente diagnóstico y compararlo con los métodos serológicos tradicionales, Este objetivo fue desarrollado en los siguientes **OBJETIVOS CONCRETOS**:

- 1.** Cuantificar los niveles de GIP, mediante técnica ELISA, en muestras de heces obtenidas de pacientes pediátricos en dieta con gluten (DCG) en el momento de diagnóstico (visita basal) y durante las 3 visitas siguientes (visitas a los 6, 12 y 24 meses).
- 2.** Comparar los resultados obtenidos mediante los GIP con los métodos serológicos anti-tTG y anti-DGP en las distintas visitas de seguimiento a los 0, 6, 12 y 24 meses.



## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. DISEÑO DEL ESTUDIO Y PARTICIPANTES

---

En este trabajo se realizó un estudio prospectivo de seguimiento clínico, no aleatorizado, ciego, multicéntrico y de ámbito nacional, en el que participaron 64 pacientes pediátricos de recién diagnóstico de EC menores de 18 años y a los que se les realizó un seguimiento a los 0, 6, 12 y 24 meses. En el momento de la inclusión en el estudio los pacientes se encontraban en dieta normal con gluten

La recogida de muestra se llevó a cabo en los siguientes centros hospitalarios: Hospital Nuestra Señora de la Candelaria (Tenerife), Hospital Regional Carlos Haya (Málaga), Hospital Universitario y Politécnico de La Fe (Valencia), Hospital Universitario Virgen del Rocío (Sevilla), Hospital Universitario Virgen de Valme (Sevilla), Instituto Hispalense de Pediatría (Sevilla), Hospital Universitario Río Hortega (Valladolid) y Hospital Sant Joan de Reus (Barcelona).

Al ser pacientes pediátricos, el consentimiento informado fue firmado por los padres o tutores legales y todos ellos fueron registrados en un cuaderno de recogidas de datos electrónico (CRDe). El CRDe permitió que todos los centros y usuarios que participaron en el estudio pudiesen incluir, modificar y suprimir datos de los pacientes. Los datos recopilados en este sistema fueron: edad, peso, talla, patologías, resultados clínicos, acontecimientos adversos, antecedentes familiares de EC, fecha de diagnóstico de EC, adherencia a la DSG, recogida de muestras y médico que realizó la visita.

En cada una de las visitas se les recogieron muestras de heces y sangre, las cuales se identificaron con un código numérico y se registraron en el CRDe.

### 3.2. RECOGIDA DE MUESTRAS

---

#### 3.2.1. Muestras serológicas

Se recogieron muestras de sangre en dos tubos *vacutainer* de 3 ml con anticoagulante EDTA-K3 y se centrifugaron a 2.000 *g*, inmediatamente después de la recogida (antes de los 30

min) para así obtener plasma. Las muestras procesadas se almacenaron a -80°C hasta su posterior análisis. Todas las muestras fueron identificadas y etiquetadas con un código numérico aleatorizado y registradas en el CRDe.

### **3.2.2. Muestras fecales**

Los participantes fueron instruidos para que recogiesen entre 2 y 4 g de heces en recipientes sellados y los entregasen en el hospital dentro de las 24 h siguientes a la recogida, manteniéndose a -20°C hasta su procesamiento en el laboratorio. Todas las muestras fueron identificadas y etiquetadas con un código numérico aleatorizado y registradas en el CRDe.

## **3.3. ANÁLISIS DE MUESTRAS**

---

### **3.3.1. Muestras serológicas**

Las muestras de plasma se analizaron en el Hospital Universitario y Politécnico de La Fe (Valencia) y se determinaron los niveles de anti-tTG IgA y anti-DGP IgA (o anti-DGP IgG en pacientes con deficiencia total de IgA) mediante ELISA, utilizando los kits EliA™ Celikey™ IgA y EliA Gliadina IgA/IgG (Phadia, Freiburg, Alemania). Cada medida se realizó por duplicado y los resultados se expresaron como EliA U/ml, obteniéndose un valor positivo, si el resultado obtenido fue superior a 10 U/ml, dudoso si estaba comprendido entre 7 y 10 U/ml y negativo si el resultado fue < 7 U/ml.

### **3.3.2. Muestras fecales**

La concentración de GIP en las heces se evaluó mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) tipo sándwich, utilizando el kit iVYLISA GIP Stool de la línea iVYDAL In Vitro Diagnostics® (Biomedal S.L., Sevilla). Este ensayo permitió la detección y cuantificación de GIP.

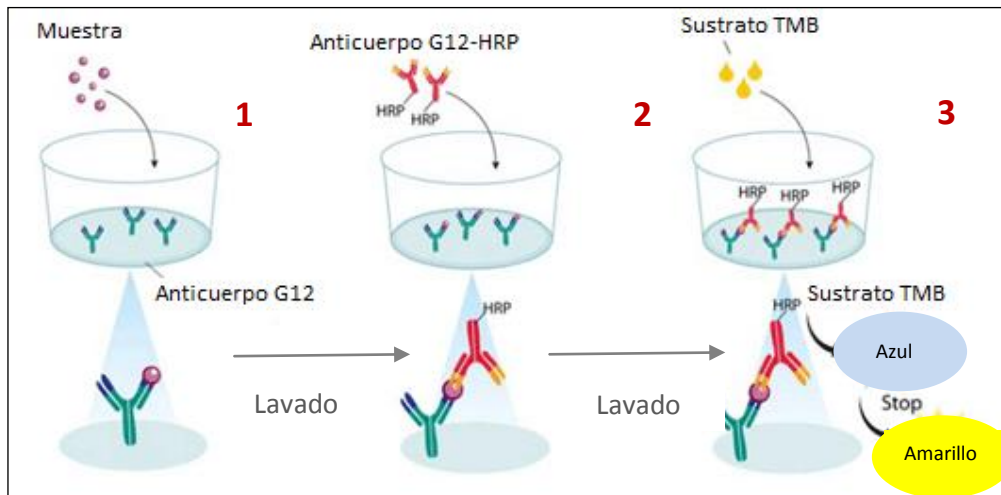
Las muestras de heces procedentes de los diferentes hospitales se recibieron en el departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia (Universidad de Sevilla) y se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis. Las muestras fueron analizadas inmediatamente después de ser acondicionadas a temperatura ambiente, las cuales se sometieron a un proceso de extracción, pesando 1 g en una balanza de precisión (Sartorius, AG

Germany) en tubos falcon de 50 ml (Deltalab, Barcelona) y añadiendo 9 ml solución de extracción de gluten universal (UGES, Biomedal S.L.). Posteriormente, se incubaron durante 60 min en un baño termostático a 50°C (Biosan, Riga, Letonia), con agitación cada 10 min, y por último, se centrifugaron, durante 10 min a 8000 rpm en una centrifuga (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

Una vez extraídas las muestras, el análisis se realizó conforme al protocolo que se incluye en kit iVYLISA GIP Stool, por lo que se comenzó, acondicionando a temperatura ambiente (20-25°C) los reactivos del kit, menos el anticuerpo que permaneció hasta el momento de su uso a 4°C. A continuación, se diluyeron las muestras 1:10, utilizando 30 µl de sobrenadante de la extracción y 270 µl de solución de dilución ELISA, en tubos *ependorf* (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Seguidamente, se adicionó cada muestra a la placa multipocillo previamente tapizada con el anticuerpo G12 (**Figura 4**), añadiéndose 100 µl/pocillo de cada muestra y por duplicado. Además se incluyeron los patrones de GIP (50; 25; 6,25; 3,12 y 1,56 ng/ml de GIP) junto con un control positivo y negativo. Se incubó a temperatura ambiente durante 60 min. Pasado el tiempo, la placa se lavó en un lavador de placas ELISA (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria) con solución de lavado, previamente diluida. Posteriormente, se le adicionó 100 µl/pocillo de anticuerpo G12 conjugado con peroxidasa (G12-HRP) y se incubó durante 60 min (**Figura 4**). Posteriormente, la placa se volvió a lavar y se añadió 100 µl/pocillo de solución sustrato (TMB), incubándose en oscuridad durante 30 min (**Figura 4**). Por último, se detuvo el ensayo, agregándose 100 µl/pocillo de solución *Stop* y se midió la absorbancia a 450 nm en un Lector UVM340 (Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria).

Una vez que se obtuvieron las medidas de Abs, se construyó una curva patrón (**Figura 5B**) representando el logaritmo de la concentración de GIP de cada uno de los patrones (eje x) frente al promedio de los valores de Abs obtenidos (eje y) utilizando el programa Excel (**Figura 5A**). Tras obtener la ecuación de la curva (**Figura 5B**), se procedió al cálculo de la concentración de GIP de cada muestra, aplicando la fórmula para obtener µg de GIP/g de heces, teniéndose en cuenta el factor de extracción (1:10) y el factor de dilución (1:10) empleado en el ensayo.

$$\mu\text{g de GIP/g de heces} = \frac{\text{ng GIP/ml} * \text{Factor de extracción (10)} * \text{Factor de dilución (10)}}{1000}$$



**Figura 4.** Representación gráfica de ELISA Sándwich.

Cada muestra se realizó por duplicado y al menos dos alícuotas diferentes de cada muestra se probaron en diferentes días. Se realizó el promedio de los resultados obtenidos, en las distintas alícuotas de una misma muestra. El rango de medida para iVYLISA GIP Stool es de 0,156-5  $\mu\text{g}$  de GIP/g de heces. Sólo los valores superiores a 0,156  $\mu\text{g}$  de GIP/g de heces se consideraron positivos y, negativos los resultados obtenidos por debajo de éste límite. Los resultados superiores a 5  $\mu\text{g}$  de GIP/g de heces, se presentaron como > 5  $\mu\text{g}$  de GIP/g de heces.

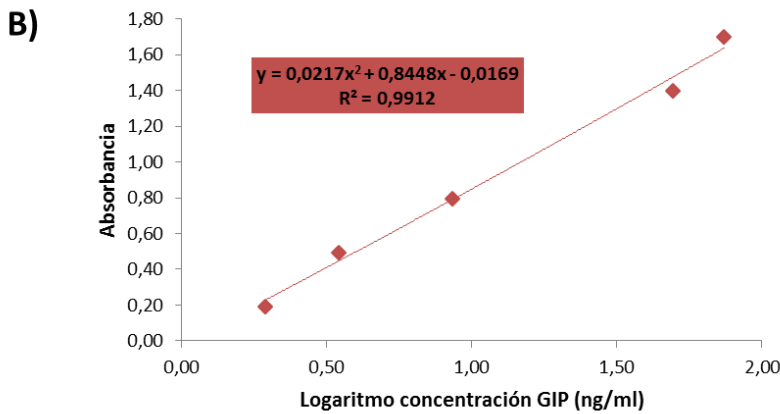
### 3.4. ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

---

A partir de los datos recopilados en el CRDe junto con los resultados obtenidos de GIP y marcadores serológicos se elaboró una base de datos en los programas *IBM SPSS Statistics* y *Excel 97-2013* perteneciente al paquete de programas Office 2013 de Microsoft para Windows, a partir de las cuales se realizaron tablas y figuras con la correspondiente aplicación estadística. También se utilizó el programa *GraphPad Prism 5* con el cual se realizaron tablas y figuras para la interpretación de los datos.

**A)**

Patrones	ng/ml GIP	Eje x; Log []	Abs 1	Abs 2	Eje y; Promedio Abs	Desv. Estándar	CV%
Patrón 1	50	1,70	1,89	1,85	1,87	0,03	1,44
Patrón 2	25	1,40	1,66	1,73	1,69	0,05	2,80
Patrón 3	6,25	0,80	0,99	0,88	0,93	0,08	8,25
Patrón 4	3,13	0,50	0,56	0,52	0,54	0,03	6,42
Patrón 5	1,56	0,19	0,29	0,29	0,29	0,01	2,20
Control positivo			0,08	0,08	0,08	0,00	2,57
Control negativo			2,08	1,96	2,02	0,08	4,09



**Figura 5.** Cálculos y representación de la curva patrón. En la figura A se representan los cálculos realizados con las concentraciones de los patrones y las absorbancias obtenidos en el ELISA. En la figura B se representa el logaritmo de la concentración de GIP de cada uno de los patrones (eje x) frente a los respectivos valores de absorbancia obtenidos (eje y) para obtener la ecuación de la curva. CV%, coeficiente de variación; Log [], logaritmo de la concentración y Abs, absorbancia.





## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. ANÁLISIS DE LOS PACIENTES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

Se reclutaron un total de 64 pacientes, de los cuales 21 eran hombres y 43 mujeres. Todas las características demográficas de los individuos se describen en la **Tabla 3**. En relación con la edad, los pacientes se clasificaron en tres rangos: lactantes (<2 años), preescolares (2-6 años) y escolares-adolescentes (7-18 años). La mediana de edad de los pacientes fue de 4 años, encontrándose que el 25% de los pacientes era menor de 1,5 años y el 75% menor de 9 años.

**Tabla 3. Características de los pacientes incluidos en el estudio.** Los pacientes se clasificaron según el sexo, rango de edad y tiempo en DSG. La mediana de edad se calcula en función de la edad del paciente a la hora de ser diagnosticado.

Características	Pacientes, n	%
Total	64	100
Sexo	Pacientes, n	%
Masculino	21	32,8
Femenino	43	67,2
Rango de edad	Pacientes, n	%
<2 años	16	25,0
2-6 años	21	32,8
7-18 años	27	42,2
Mediana de edad	4	
Rango intercuartílico ( $P_{25}$ - $P_{75}$ )	1,5-9 años	
Tiempo en DSG (meses)	Pacientes, n	%
Basal (0)	64	100,0
6 meses (4-9)	60	93,8
12 meses (10-15)	50	78,1
24 meses (16-24)	35	54,7

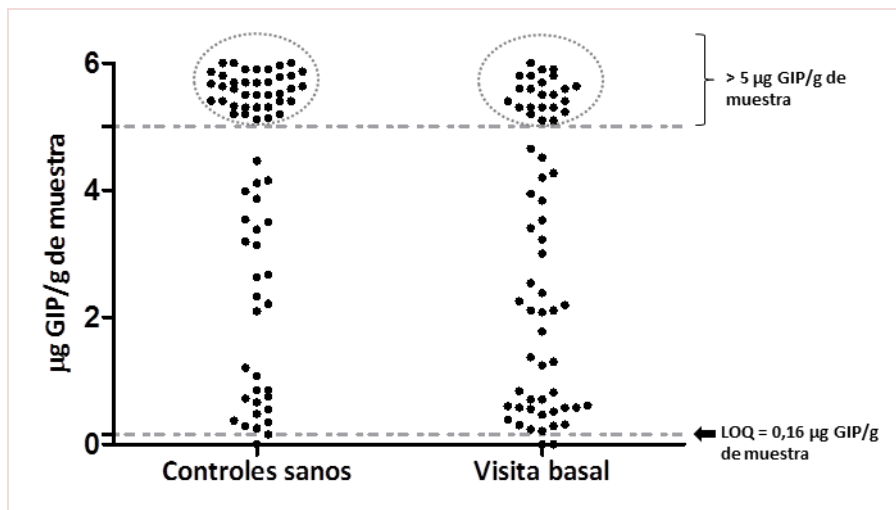
El 51,5% de los pacientes fueron diagnosticados mediante serología y/o biopsia y el resto sólo mediante serología. Según la ESPGHAN, para el diagnóstico de la EC en niños, si los anticuerpos anti-tTG tienen un valor 10 veces mayor respecto al límite superior del considerado como normal, el individuo puede ser diagnosticado de EC sin realización de biopsia (Husby et al., 2012). A cada uno de los pacientes se les realizó 4 visitas a los 0, 6, 12 y 24 meses recogiéndoseles muestras de heces y sangre en cada una de ellas. En la visita basal (0 meses) los participantes no habían iniciado aún el tratamiento de DSG, mientras que en el resto de visitas (de seguimiento) ya fueron instruidos para seguir una DSG.

#### **4.2. EVALUACIÓN DE LA ADHERENCIA A LA DSG EN PACIENTES CELÍACOS PEDIÁTRICOS MEDIANTE DETERMINACIÓN DE GIP**

---

El incumplimiento de la DSG se ha asociado con osteoporosis, anemia por deficiencia de hierro, depresión e infertilidad, todo lo cual se mejora, en cierta medida, mediante la adhesión a la DSG. Estas observaciones nos dan una idea de la importancia de la adherencia a una DSG para reducir los síntomas, evitar deficiencias nutricionales y mejorar la calidad de vida del paciente. Por lo tanto, debido al riesgo que supone el consumo de gluten para los celíacos, es imprescindible un control riguroso del contenido en gluten de los mismos. Actualmente, en la normativa europea creada por el *Codex Alimentarius*, la cantidad de gluten aceptada en los alimentos que optan a ser etiquetados como "exentos de gluten" es de 20 ppm (o mg/kg), aunque también se establece otra categoría: de alimentos con "contenido muy reducido de gluten", que se utiliza para productos fabricados con trigo, centeno, cebada, avena o sus variedades híbridas, pero que hayan recibido un tratamiento especial para eliminar el gluten. Los alimentos con el etiquetado de "contenido muy reducido en gluten" no pueden superar las 100 ppm (REGLAMENTO (EC) No 41/2009 sobre la composición y etiquetado de productos alimenticios apropiados para personas con intolerancia al gluten). No obstante, a nivel nacional, la Federación de Asociaciones de Celíacos de España (FACE) ha creado la Marca de Garantía "Controlado por FACE" para aquellas empresas que elaboran productos alimenticios que son aptos para DSG. La Marca de Garantía "Controlado por FACE" tiene como objeto garantizar al consumidor celíaco que los productos que la portan han cumplido con los requisitos que FACE establece. A día de hoy, el límite crítico que establece FACE es de 10 ppm de gluten ([www.celíacos.org/](http://www.celíacos.org/)).

Una ingesta de gluten cero es imposible debido a que un nivel mínimo de contaminación está presente en la dieta diaria. Algunos pacientes no pueden consumir más de 10 mg diarios de gluten (Akobeng y Thomas, 2008) si quieren evitar los daños en su mucosa intestinal. Por lo tanto, son necesarias herramientas precisas y no invasivas que muestren la ingesta real y así evitar las secuelas. En este estudio multicéntrico se ha evaluado el cumplimiento de la DSG en pacientes celíacos recién diagnosticado, basándose en la cuantificación de GIP en heces. Los GIP se excretan en heces sólo cuando se ingiere gluten, por lo tanto la detección de GIP en pacientes en DSG implica que ha habido exposición al gluten y que por lo tanto el paciente celíaco ha cometido una transgresión dietética (Comino et al., 2016).



**Figura 6.** Representación del contenido de GIP en controles sanos y pacientes celíacos pediátricos incluidos en el estudio durante la visita basal. LOQ, límite de cuantificación.

En la visita basal, antes de instaurar la DSG, 62 de los 64 pacientes mostraron resultados positivos para GIP. Estos resultados fueron comparables a los obtenidos en un estudio previo (Comino et al., 2016) en el que se analizaron un total de 73 sujetos sanos en DCG (**Figura 6**). Por tanto, no se observaron diferencias significativas en los niveles de excreción de GIP entre la población celíaca de estudio y la población de sujetos sanos cuando ambas se encontraban en DCG.

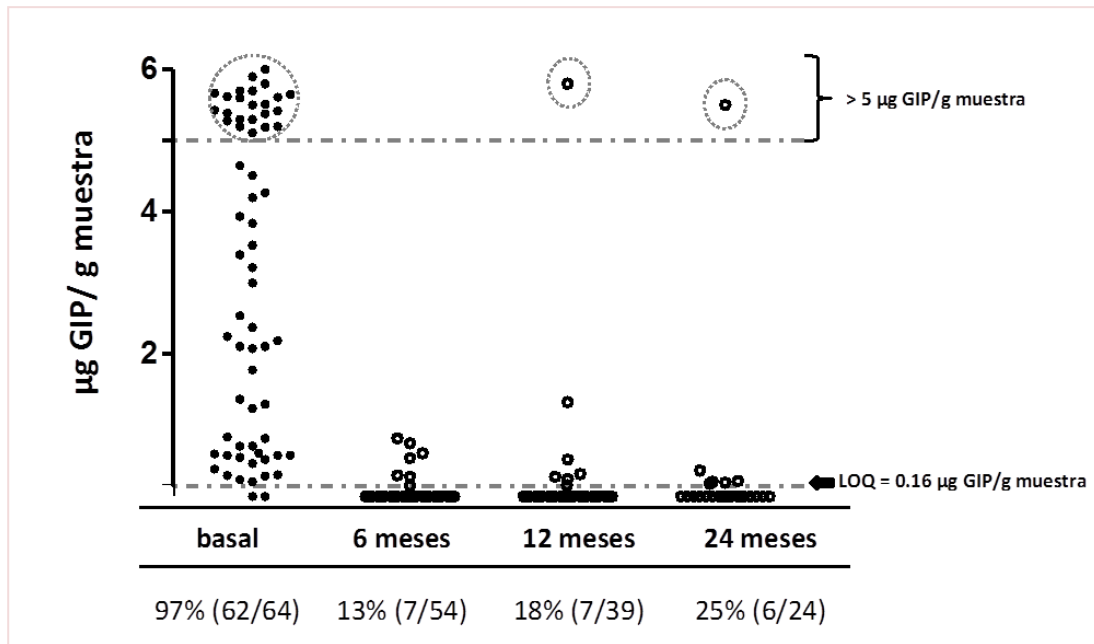
Tras el diagnóstico y comienzo de la DSG, un 20,3% de los pacientes presentaron niveles detectables de GIP en heces durante el periodo de seguimiento. Este porcentaje es algo inferior al publicado recientemente por Comino et al. (2016), en el que se demuestra que el 29,8% de pacientes celíacos, incluyendo tanto niños como adultos, transgreden. Sin

embargo, debemos tener en cuenta que la población recogida en este estudio se centra únicamente en pacientes pediátricos en donde existe un mayor control de la dieta por parte de los padres o tutores.

Atendiendo a las visitas, encontramos un 13% de transgresiones (7 de 54 pacientes) a los 6 meses, un 18% (7 de 39 pacientes) a los 12 meses y un 25% (6 de 24 pacientes) a los 24 meses del estudio (**Figura 7**). De los resultados obtenidos se puede deducir que el incumplimiento de la DSG aumentó considerablemente a medida que el paciente seguía esta dieta, lo que podría implicar la no recuperación del intestino delgado y el mantenimiento de la sintomatología. Se ha de tener en cuenta la posibilidad de que ciertas transgresiones puedan ser involuntarias debido a la falta de información de los alimentos que está consumiendo el paciente, o trasgresiones voluntarias debido a la falta de rigurosidad en la dieta, las cuáles pueden ser ocasionales o frecuentes (Silvester et al., 2007; Missbach et al., 2015). La DSG es un reto para los pacientes celíacos, aproximadamente más de la mitad de los alimentos que se comercializan a día de hoy contienen gluten de trigo, cebada, centeno o avena, incluyendo aquellos en los que sólo interviene como espesante o aglutinante (Rocha et al., 2016).

#### **4.2.1. Relación entre el contenido de GIP y la edad del paciente**

La introducción de una DSG resulta un cambio radical de los hábitos alimenticios y el estilo de vida, pudiendo ser muy difícil de aceptar y de seguir (Mazzone et al., 2011). La estricta adhesión a la DSG requiere una atención constante y un mayor control sobre los alimentos, vigilando los ingredientes en las etiquetas. Esto puede ser particularmente complicado en los períodos de transición como es la adolescencia (Leffler et al., 2009), sobre todo cuando se sale del ambiente familiar (Cinquetti et al., 1999).



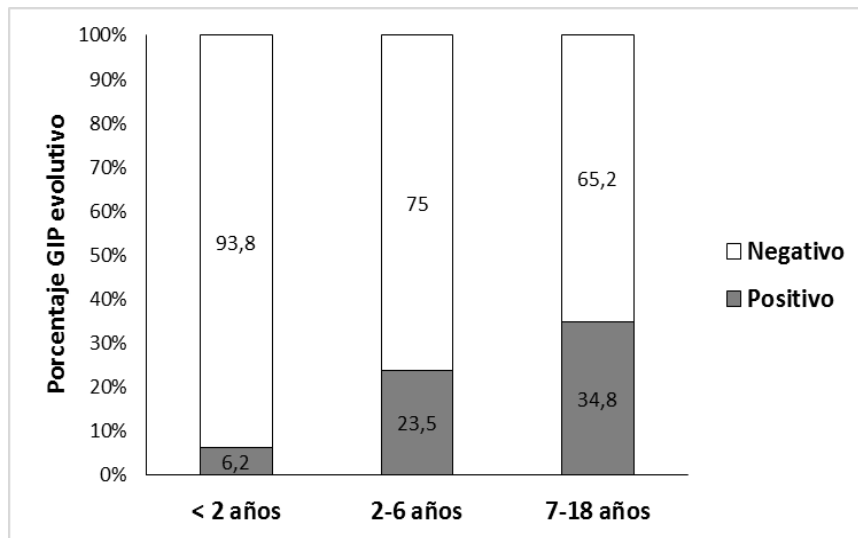
**Figura 7.** Determinación del contenido de los GIP en pacientes celíacos pediátricos en cada visita de seguimiento (0, 6, 12 y 24 meses). LOQ, límite de cuantificación.

En este estudio se detectaron diferencias estadísticamente significativa ( $p=0,041$ ) en la incidencia de transgresiones dietéticas por grupos etarios, siendo más frecuentes cuanto mayor era la edad de los pacientes. Concretamente, se obtuvo un 6,2% de incumplimiento en los niños lactantes (< 2 años), un 23,5% en los niños de edad preescolar (2-6 años) y un 34,8% en los niños de mayor edad (7-18 años) (**Figura 8**). Los niños <2 años mostraron una adherencia muy alta a la DSG (93,8%), ya que este colectivo es altamente dependiente de los padres o tutores para ser alimentados y, por tanto, tienen un control estricto sobre la dieta, en comparación con los niños de mayor edad (7-18 años). Estas diferencias podrían ser debido a la creciente autonomía del paciente, su capacidad para tomar decisiones dietéticas y las influencias sociales. Por ello, es importante un diagnóstico de EC lo más temprano posible, para evitar problemas sociales y deterioro de la salud física en estos pacientes (Wagner et al., 2008).

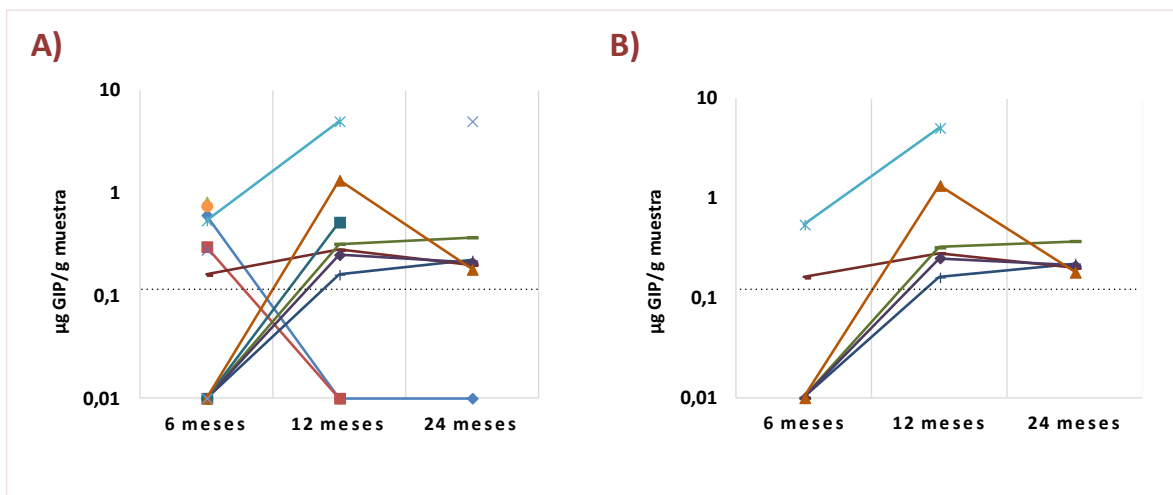
#### **4.2.2. Estudios de pacientes transgresores y reincidentes de la DSG**

Analizando más en profundidad las transgresiones dietéticas detectadas en este estudio, encontramos un total de 13 pacientes (20,3%) que transgreden en alguna de las visitas de seguimiento (**Figura 9A**). De ellos, un 46% realizaron transgresiones en varias de las visitas (**Figura 9B**), siendo más de la mitad de ellos mayores de 7 años. Con ello, se verifica que

alrededor de la mitad de los pacientes transgresores son consumidores de gluten de manera frecuente y es más acusado en los pacientes con independencia a la hora de comer.



**Figura 8.** Adherencia a la DSG según el contenido en los GIP en los diferentes grupos etario de pacientes celíacos pediátricos.



**Figura 9.** Evolución del cumplimiento de la DSG en los pacientes pediátricos transgresores. **A.** Pacientes que han transgredido al menos en una de las visitas de seguimiento. **B.** Pacientes transgresores que han incumplido la dieta en más de una visita del seguimiento. Cada símbolo y color corresponde a un mismo paciente en las distintas visitas.

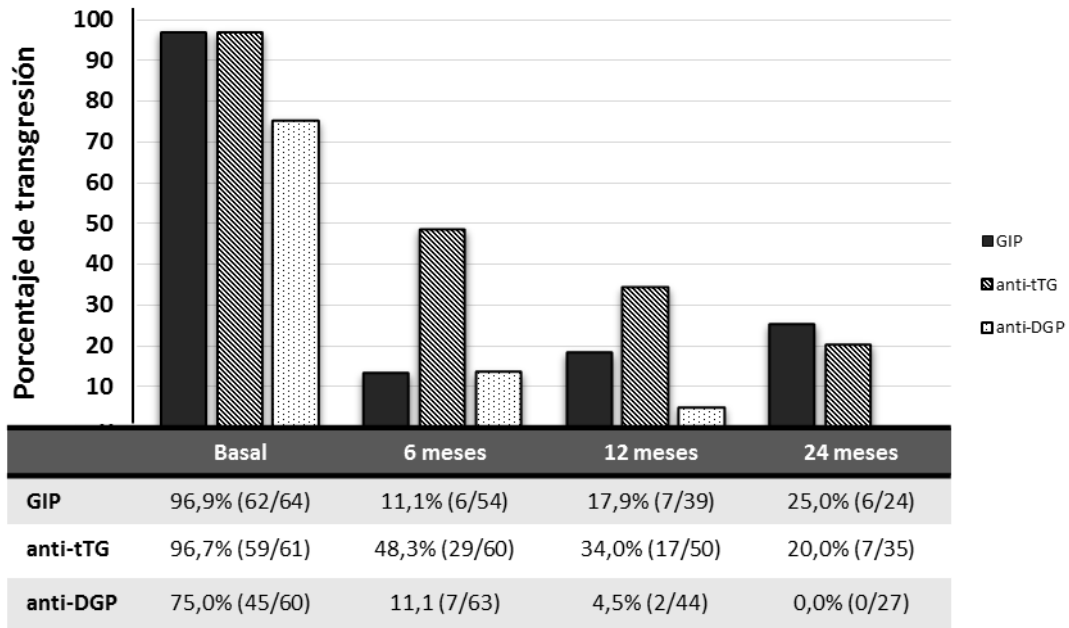
### **4.3. COMPARACIÓN DE GIP CON LOS MARCADORES SERÓLOGICOS**

---

Los marcadores serológicos se emplean en el diagnóstico y seguimiento de la EC y son los métodos más usados hasta el momento. El marcador anti-tTG del tipo IgA es el anticuerpo empleado en el diagnóstico y el anti-DGP IgA el más usado en el seguimiento (Donat et al., 2003). Los títulos de estos marcadores disminuyen notablemente y/o se normalizan en los pacientes con buena adherencia a la DSG, logrando una cero-conversión (Nachman et al., 2011), sin embargo, se ha de tener en cuenta que pueden llegar a tardar meses e incluso años en normalizarse. En nuestro estudio se usaron ambos marcadores, anti-tTG y anti-DGP, para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes (**Figura 10**).

En relación a los resultados obtenidos de anti-tTG, podemos observar una tendencia decreciente en el título de anticuerpo en las distintas visitas de seguimiento. En la visita realizada a los 6 meses se obtuvo un 48,3% de anti-tTG positivo (29 de 60 pacientes), un 34% (17 de 50 pacientes) a los 12 meses y un 20% (7 de 35 pacientes) a los 24 meses. En el caso de los resultados de anti-DGP, en la visita realizada a los 6 meses, se observó un 11,1% de resultados positivos (7 de 63 pacientes), un 4,5% (2 de 44 pacientes) a los 12 meses y un 0% a los 24 meses, por lo que también el título de anticuerpo anti-DGP en las visitas de seguimiento fue disminuyendo. En comparación con los resultados obtenidos mediante GIP en donde se observó una tendencia ascendente en el porcentaje de transgresiones realizadas durante el seguimiento de la DSG, siendo mayor en la última visita (**Figura 10**), lo que se corresponde con resultados previos obtenidos en pacientes celíacos adultos (Comino et al., 2016).

Con estos resultados no se puede determinar si los niveles de anticuerpos obtenidos en las visitas de seguimiento son consecuencia de una transgresión dietética una vez iniciada la DSG, o es debido a la presencia de anticuerpos residuales que aún persisten a pesar de un correcto cumplimiento de la dieta, ya que la medida realizada es indirecta y, por tanto, lo que se mide son los anticuerpos que se generan tras la exposición del gluten (Sharkey et al, 2013). En contraposición con los GIP que lo que mide es directamente el gluten que ha consumido el paciente (Comino et al., 2016) (**Figura 11**).



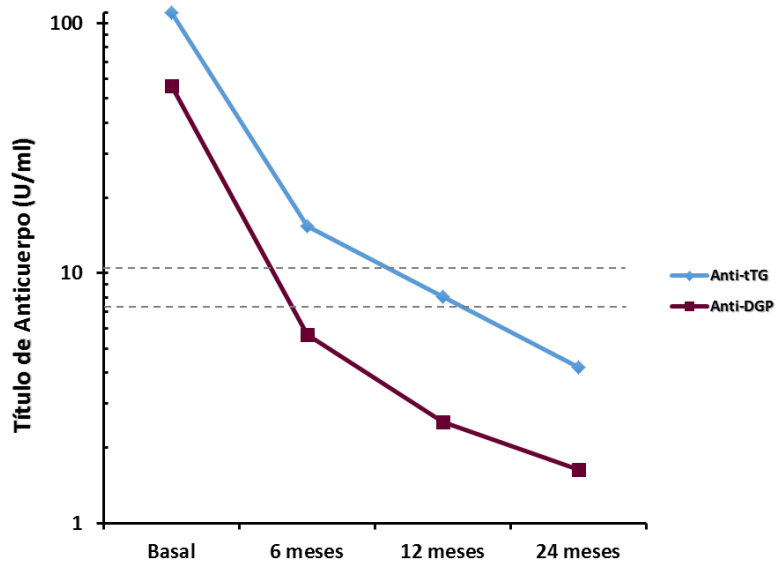
**Figura 10.** Representación del porcentaje de transgresión de los pacientes celíacos pediátricos en las distintas visitas de seguimiento (0, 6, 12 y 24 meses desde el comienzo de la DSG) con los distintos métodos utilizados (GIP, anti-tTG y anti-DGP).

Como se ha comentado anteriormente, cuando se estudia la cinética de los marcadores anti-tTG y anti-DGP en los meses de seguimiento se observa que los anticuerpos tienden a negativizarse. El problema es que muchos de los individuos con los anticuerpos negativos están transgrediendo (**Figura 10**). De hecho, existen estudios recientes que demuestran que la serología no debe considerarse un marcador sustituto de la recuperación intestinal y debe utilizarse sólo como una medida de la cicatrización de la mucosa si se apoya en una biopsia del intestino delgado que muestra mejoría del daño intestinal (Sharkey et al., 2013). Sin embargo, actualmente no se recomienda el uso de las biopsias para el seguimiento de la DSG ya que, además de ser una técnica invasiva y desagradable para los pacientes celíacos, tiene costes muy elevados para el sistema sanitario.

Por otra parte, los marcadores anti-DGP no son fiables para el seguimiento de la DSG, ya que en la visita realizada a los 24 meses el porcentaje de transgresión es del 0% cuando se ha obtenido un 25% de trasgresiones mediante GIP (**Figura 7**). Con esto verificamos que la realización de pequeñas transgresiones, voluntarias o involuntarias, o de carácter ocasional, no se manifiesta en los marcadores serológicos (Polo et al., 2001). Por ello, los GIP, debido a su alta sensibilidad y naturaleza no invasiva, es el método de elección para monitorizar la adherencia a la DSG (Comino et al., 2016). Se ha de tener en cuenta también que los



marcadores anti-DGP se normalizan en sangre aproximadamente a los 3-6 meses en DSG, siendo más precoces que los anticuerpos anti-tTG, ya que estos últimos tardan de 12-24 meses en negativizarse (**Figura 11**).



**Figura 11.** Representación de la evolución de los marcadores serológicos anti-tTG y anti-DGP realizada en las 4 visitas de seguimiento a los pacientes celíacos pediátricos del estudio.

De esta manera, los resultados obtenidos por GIP en heces mostraron que un total de 13 pacientes transgredieron, 7 pacientes en la visita realizada a los 6 y 12 meses, y 7 pacientes en la visita realizada de 24 meses. En aquellas muestras de heces con GIP positivo en la visita realizada a los 6 meses, el marcador anti-tTG fue también positivo en 5 de los 7 pacientes, mientras que mediante anti-DGP se obtuvieron 1 resultado positivo y otro dudoso. En el caso de la visita realizada a los 12 meses, sólo 5 pacientes fueron positivos por anti-tTG (5 de 7 pacientes) y 1 por anti-DGP (1 de 7 pacientes). Por último, en la visita realizada a los 24 meses, de los 6 positivos por GIP, 3 coincidieron con anti-tTG y ninguno con anti-DGP (0 de 6 pacientes) (**Tabla 4**).

**Tabla 4.** Comparativa de los resultados obtenidos con los marcadores serológicos en las visitas de seguimiento realizada a los pacientes celíacos pediátricos del estudio en relación con los resultados de GIP positivo obtenidos en cada una de estas visitas.

	6 meses		12 meses		24 meses	
	Positivo	%	Positivo	%	Positivo	%
GIP	7	100	7	100	6	100
anti-tTG	5	71,4	5	71,4	3	50,0
anti-DGP	1 positivo, 1dudoso	14,3 + 14,3	1	14,3	0	0,0

Las técnicas serológicas han revelado limitaciones para el control de la DSG en pacientes celíacos pediátricos. En cambio, el análisis de GIP ha demostrado ser un método preciso y no invasivo que permite una evaluación directa y cuantitativa del consumo del gluten poco después de la ingesta. Por ello, la determinación de GIP fecal podría suponer una herramienta útil: i) para controlar si los pacientes pediátricos han ingerido gluten durante la fase de diagnóstico de la enfermedad y ii) durante el tratamiento y control evolutivo de la misma, para verificar la adherencia a la DSG.

## **6. CONCLUSIONES**

- 1.** La cuantificación de GIP en heces ha permitido evaluar de forma específica y directa la adherencia a la DSG en pacientes celíacos recién diagnosticados durante 2 años.
- 2.** El 20,3% de los pacientes de estudio presentaron niveles de GIP en heces durante el período de seguimiento, aunque el porcentaje de incumplimiento de la DSG se incrementó considerablemente a medida que aumentaba el periodo en DSG.
- 3.** Los pacientes pediátricos menores de 2 años mostraron una mayor adherencia a la DSG respecto al resto de los grupos etarios, siendo los pacientes mayores de 7 años los que presentaron mayores niveles de transgresiones dietéticas.
- 4.** No se han encontrado diferencias significativas en los niveles de GIP entre los pacientes celíacos en la visita basal y la población de sujetos sanos en DCG.
- 5.** Del total de pacientes no adherentes a la DSG, un 46% realizaron transgresiones en varias de las visitas de seguimiento.
- 6.** 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. *Immunol Rev.* 2014; 260(1): 221-234.
- **Akobeng AK, Thomas AG.** Systematic review: Tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008; 27: 1044–1052.
- **Alaedini A, Green PHR.** Narrative review. Celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Ann Int Med.* 2005; 142(4): 289-299.
- **Arranz E.** Aspectos inmunológicos de la enfermedad celíaca. *Salud Ciencia.* 2014; 20: 738-746.
- **Arranz E, Garrote JA.** HLA en la enfermedad celíaca. *An Pediatr Contin.* 2004; 2(3): 163-166.
- **Arranz E, Garrote JA.** Enfermedad celíaca: introducción al conocimiento actual de la enfermedad celiaca. 2ª edición. Madrid: Ergón; 2011. p.23-35.
- **Arranz E, Garrote JA.** Enfermedad celíaca: introducción al conocimiento actual de la enfermedad celiaca. 3ª edición. Madrid: Ergón; 2016.
- **Bernardo D, Peña S.** Developing strategies to improve the quality of life of patients with gluten intolerance in patients with and without coeliac disease. *Eur J Intern Med.* 2012; 23(1): 6-8.
- **Bouziat R, Hinterleitner R, Brown JJ, Stencel-Baerenwald JE, Ikizler M, Mayassi T, et al.** Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science.* 2017; 356 (6333): 44-50.
- **Buchanan R, Dennis S, Gendel S, Acheson, D, Assimon S.A, Beru N, et al.** Approaches to establish thresholds for major food allergens and for gluten in food. *J Food Prot.* 2008; 71(5): 1043–1088.
- **Casellas F.** Enfermedad celiaca. *Med Clin.* 2006; 126(4): 137-142.
- **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.
- **Cinquetti M, Trabucchi C, Menegazzi N, Comucci A, Bressan F, Zoppi G.** Psychological problems connected to the dietary restrictions in the adolescent with coeliac disease. *Pediatr Med Chir.* 1999; 21(6): 279-283.
- **Comino I, Fernández-Bañares F, Esteve M, Ortigosa L, Castillejo G, Fambuena B, et al.**

Fecal gluten peptides reveal limitations of serological tests and food questionnaires for monitoring gluten-free diet. *Am J Gastroenterol.* 2016; 111(10): 1456-1465.

- **Comino I, Real A, Vivas S, Siglez MÁ, Caminero A, Nistal E, et al.** Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am J Clin Nutr.* 2012; 95(3): 670-677.
- **Comino I, Real A, de Lorenzo L, Cornell H, López-Casado MÁ, Barro F, et al.** Diversity in oat potential immunogenicity: basis for the selection of oat varieties with no toxicity in coeliac disease. *Gut.* 2011; 60(7): 915-922.
- **Dicke WK.** Coeliakie [PhD thesis]. The Netherlands: University of Utrecht; 1950.
- **Donat-Aliaga E, Polo-Miquel B, Ribes-Koninckx B.** Marcadores serológicos de enfermedad. *Acta Pediatr Esp.* 2003; 61: 24-32.
- **Ertekin V, Selimoglu MA, Turgut A, Bakan N.** Fecal calprotectin concentration in celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 2010; 44(8): 544-546.
- **Fasano A, Catassi C.** Clinical practice. Celiac disease. *N Engl J Med.* 2012; 367(25): 2419-2426.
- **Freeman HJ.** Risk factors in familial forms of celiac disease. *World J Gastroenterol.* 2010; 16(15): 1828-1831.
- **Green PH, Cellier C.** Celiac Disease. *N Engl J Med* 2007; 357(17): 1731-1743.
- <http://www.celiacos.org/>
- **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. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012; 54(1): 136-160.
- **Keuning JJ, Peila AS, van Leeuwen A, van Hoff JP, van Rood JJ.** HLA-Dw3 associated with coeliac disease. *Lancet.* 1976; 1(7958): 506-508.
- **Kim SM, Mayassi T, Jabri B.** Innate immunity: Actuating the gears of coeliac disease pathogenesis. *Best Pract Res Clin Ga.* 2015; 29(5): 425-435.
- **Korponay-Szabó IR, Troncone R, Discepolo V.** Adaptive diagnosis of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Ga.* 2015; 29(3): 381-398.
- **Leffler D, Schuppan D, Pallav K, Najarian R, Goldsmith J.D, Hansen J, et al.** Kinetics of the histological, serological and symptomatic responses to gluten challenge in adults with coeliac disease. *Gut.* 2013; 62(7): 996-1004.
- **Leffler DA, Dennis M, Edwards George JB, Jamma S, Magge S, Cook EF, et al.** A simple validated gluten-free diet adherence survey for adults with celiac disease. *Clin*

Gastroenterol Hepatol. 2009; 7(5): 530-536.

- **Lind MV, Madsen ML, Rumessen JJ, Vestergaard H, Gøbel RJ, Hansen T, et al.** Plasma alkylresorcinols reflect gluten intake and distinguish between gluten-rich and gluten-poor diets in a population at risk of metabolic syndrome. *J Nutr.* 2016; 146(10): 1991-1998.
- **López P.** La enfermedad del siglo XXI: Celiacía en el niño. *Enferm Cyl.* 2017; 9.
- **Ludvigsson JF, Leffler DA, Bai JC, Biagi F, Fasano A, Green PH, et al.** The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut.* 2012; 62(1): 43-52.
- **Mariné M, Farre C, Alsina M, Vilar P, Cortijo M, Salas A, et al.** The prevalence of coeliac disease is significantly higher in children compared with adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011; 33(4): 477-486.
- **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.
- **Mazzone L, Reale L, Spina M, Guarnera M, Lionetti E, Martorana S, et al.** Compliant gluten-free children with celiac disease: an evaluation of psychological distress. *BMC Pediatr.* 2011; 11: 46.
- **Mearin ML.** The prevention of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2015; 29(11): 493-501.
- **Meewisse GW.** Diagnostic criteria in coeliac disease. *Acta Paediat Scand.* 1970; 59: 461-463.
- **Missbach B, Schwingshackl 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. *Peer J.* 2015; 3: e1337.
- **Morón B, Bethune MT, Comino I, Manyani H, Ferragud M, Lopez 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.
- **Morón B, Cebolla A, Manyani H, Alvarez-Magueda 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. *Am J Clin Nutr.* 2008a; 87(2): 405-414.
- **Moscoso F, Quera R.** Celiac disease. *Revista Médica Clínica Las Condes.* 2015; 26: 613-627.

- **Murray JA, McLachlan S, Adams PC, Eckfeldt JH, Garner CP, Vulpe CD, et al.** Association between celiac disease and iron deficiency in Caucasians, but not non-Caucasians. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013; 11(7):808-814.
- **Mustalahti K, Catassi C, Reunanen A, Fabiani E, Heier M, McMillan S, et al.** Coeliac EU Cluste, Project Epidemiology. The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med.* 2010; 42(8): 587-595.
- **Nachman F, Sugai E, Vázquez H, González A, Andrenacci P, Niveloni S, et al.** Serological tests for celiac disease as indicators of long-term compliance with the gluten-free diet. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2011; 23(6): 473-480.
- **Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid M, et al.** Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology.* 1998; 115(3): 551-563.
- **Oberhuber G.** Biopsy differential diagnosis of non-cancerous small intestinal diseases. *Verh Dtsch Ges Pathol.* 1999; 83: 101-109.
- **Pietzak MM.** Follow-up of patients with celiac disease: achieving compliance with treatment. *Gastroenterology.* 2005; 128: S135-141.
- **Polanco Allué I.** Estado actual del diagnóstico de la enfermedad celíaca en el niño y adolescente. *Evid Pediatr.* 2011; 7: 52.
- **Polo B, Vázquez RM, Dalhbom I.** Dinámica de los anticuerpos antitransglutaminasa en la enfermedad celíaca. *An Esp Pediatr.* 2001; 54(3): 54.
- **Rocha S, Gandolfi L, Santos JE.** The psychosocial impacts caused by diagnosis and treatment of coeliac disease. *Rev Esc Enferm USP.* 2016; 50(1): 66-72.
- **Rubin CE, Brandborg LL, Flick AL, MacDonald WC, Parkins RA, Parmenter CM, et al.** Ciba Foundation Study Group No. 14. Biopsy studies on the pathogenesis of coeliac sprue. En: Wolstenholme GEW, Cameron MP (editores.) *Intestinal biopsy.* London: Churchill; 1962. p. 67-83.
- **Rubio-Tapia A, Hill ID, Kelly CP, Calderwood AH, Murray JA.** ACG clinical guidelines: diagnosis and management of coeliac disease. *Am J Gastroenterol.* 2013; 108(5): 656-676.
- **Sakula J, Shiner M.** Coeliac disease with atrophy of the small intestinal mucosa. *Lancet.* 1957; 2(7001): 876-877.
- **Sander GR, Cummins AG, Henshall T, Powell BC.** Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. *FEBSS Lett.*



2005; 579(21): 4851-4855.

- **Schalk K, Lang C, Wieser H, Koehler P, Scherf KA.** Quantitation of the immunodominant 33-mer peptide from  $\alpha$ -gliadin in wheat flours by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Sci Rep.* 2017; 7: 450-492.
- **Sharkey LM, Corbett G, Currie E, Lee J, Sweeney N, Woodward JM.** Optimising delivery of care in coeliac disease-comparison of the benefits of, repeat biopsy and serological follow-up. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013; 38: 1278–1291.
- **Shewry PR, Halford NG.** Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J Exp Botany.* 2002; 53(370): 947-958.
- **Silvester J, Rashid M.** Long-term follow-up of Individuals with coeliac disease: An evaluation of current practice guidelines. *Can J Gastroenterol.* 2007; 21(9): 557-564.
- **Sollid LM, Jabri B.** Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nat Rev Immunol.* 2013; 13(4): 294-302.
- **Sollid LM.** Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2(9): 647-655.
- **Stokes PL, Asquith P, Holmes GK, McKintosh P, Cooke WT.** Histocompatibility antigens associated with adult coeliac disease. *Lancet.* 1972; 2: 162-164.
- **Vaquero L, Alvarez-Cuenllas B, Rodríguez-Martín L, Aparicio M, Jorquera F, Olcoz JL, et al.** Revisión de las patologías relacionadas con la ingesta de gluten. *Nutr Hosp.* 2015; 31(6): 2359-2371.
- **Vivas S, Vaquero L, Rodríguez-Martín L, Caminero A.** Age-related differences in coeliac disease: Specific characteristics of adult presentation. *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* 2015; 6(4): 207-212.
- **Vriezinga SL, Schweizer JJ, Koning F, Mearin ML.** Coeliac disease and gluten-related disorders in childhood. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2015; 12(9): 527-536.
- **Wagner G, Berger G, Sinnreich U, Grylli V, Schober E, Huber WD, Karwautz A.** Quality of life in adolescents with treated coeliac disease: influence of compliance and age at diagnosis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008; 47(5): 555-561.
- **Walker M, Murray JA.** An update in the diagnosis of coeliac disease. *Histopathology.* 2011; 59(2): 166-179.
- **West J, Logan RFA, Hill PG, Lloyd A, Lewis S, Hubbard R, et al.** Seroprevalence, correlates, and characteristics of undetected coeliac disease in England. *Gut.* 2003; 52(7): 960-965.





