

**NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD
CELÍACA: CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS IMMUNOGÉNICOS DEL
GLUTEN Y VALIDACIÓN CLÍNICA DE UN BIOMARCADOR PARA EL
SEGUIMIENTO DEL PACIENTE CELÍACO.**

Ángela Ruiz Carnicer

Sevilla 2020

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

FACULTAD DE FARMACIA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



**NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD
CELÍACA: CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS IMUNOGÉNICOS DEL
GLUTEN Y VALIDACIÓN CLÍNICA DE UN BIOMARCADOR PARA EL
SEGUIMIENTO DEL PACIENTE CELÍACO.**

ÁNGELA RUIZ CARNICER

SEVILLA, 2020



Facultad de Farmacia

Dpto. Microbiología y Parasitología

C/ Profesor García González 2

41012 Sevilla

**NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE LA ENFERMEDAD CELÍACA:
CARACTERIZACIÓN DE LOS PÉPTIDOS IMUNOGÉNICOS DEL GLUTEN Y
VALIDACIÓN CLÍNICA DE UN BIOMARCADOR PARA EL SEGUIMIENTO DEL
PACIENTE CELÍACO**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por ÁNGELA RUIZ CARNICER, Licenciada en Biología, para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla.

Este trabajo se ha realizado en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, bajo la dirección de las Doctoras CAROLINA SOUSA MARTÍN, ISABEL MARÍA COMINO MONTILLA y MARÍA LOURDES MORENO AMADOR.

Directoras de Tesis

Firmado por SOUSA MARTIN
CAROLINA - 75407725V el día
27/07/2020 con un certificado
emitido por AC FNMT Usuarios

Fdo.: Carolina Sousa Martín

COMINO
MONTILLA
ISABEL MARIA -
30977980Q

Firmado digitalmente por COMINO
MONTILLA ISABEL MARIA -
30977980Q
DN: cn=COMINO MONTILLA ISABEL
MARIA - 30977980Q, gn=ISABEL MARIA
c=ES
Motivo: Soy el autor de este documento
Ubicación:
Fecha: 2020-07-26 18:35+02:00

Fdo.: Isabel María Comino Montilla

MORENO
AMADOR
MARIA DE
LOURDES -
14617323H

Firmado
digitalmente por
MORENO AMADOR
MARIA DE LOURDES
- 14617323H
Fecha: 2020.07.24
15:27:29 +02'00'

Fdo.: María Lourdes Moreno Amador

Autor

RUIZ
CARNICER
ANGELA -
32063258Q
32063258Q

Firmado
digitalmente por
RUIZ CARNICER
ANGELA -
32063258Q
Fecha: 2020.07.24
13:22:33 +02'00'

Fdo.: Ángela Ruiz Carnicer



Facultad de Farmacia

Dpto. Microbiología y Parasitología

C/ Profesor García González 2

41012 Sevilla

IGNACIO DAVID RODRIGUEZ LLORENTE, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA,

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral titulada: “Nuevas estrategias para el control de la enfermedad celíaca: caracterización de los péptidos inmunogénicos del gluten y validación clínica de un biomarcador para el seguimiento del paciente celíaco”, presentada por la Lcda. en Biología ÁNGELA RUIZ CARNICER para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de las Doctoras Dña. CAROLINA SOUSA MARTÍN, ISABEL MARÍA COMINO MONTILLA y MARÍA LOURDES MORENO AMADOR.

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Sevilla, a 24 de Julio de 2020.

Fdo.: Ignacio David Rodríguez Llorente

RESUMEN

La enfermedad celiaca (EC) se define como una enteropatía inflamatoria crónica del intestino delgado causada por la ingesta de gluten en individuos genéticamente predispuestos. El término gluten hace referencia a las proteínas responsables de la cohesividad, viscosidad y elasticidad de la masa del trigo, la cebada, el centeno, la avena, y sus derivados. El gluten es una mezcla de dos grupos de proteínas las prolaminas (denominadas gliadinas en el trigo, hordeínas en la cebada, secalinas en el centeno y aveninas en la avena) y las glutelinas (gluteninas para el trigo, y sus homólogas para cebada, centeno y avena). Dichas proteínas son resistentes a las enzimas digestivas y, por lo tanto, posterior a la ingestión de alimentos que contienen gluten, se generan péptidos inmunogénicos capaces de producir daño en la mucosa intestinal de los pacientes celíacos. Esta lesión se caracteriza, histológicamente, por un infiltrado de linfocitos a nivel intraepitelial y una hiperplasia de criptas con distintos grados de atrofia de las vellosidades intestinales.

Clínicamente la EC presenta una gran variedad de síntomas, tanto gastrointestinales como extra-intestinales. Los síntomas clásicos incluyen diarrea crónica, esteatorrea, distensión abdominal, dolor, pérdida de peso y anemia. En niños además es común que presenten retraso en el crecimiento y baja estatura. Sin embargo, existen situaciones en las que las manifestaciones digestivas están ausentes u ocupan un segundo lugar. Estas formas atípicas incluyen manifestaciones que pueden ser orales, cutáneas, cardíaca, dermatológicas, neurológicas, articulares, hepáticas, endocrinas, ginecológicas, psiquiátricas y hematológicas. También es frecuente que aparezcan otras complicaciones graves como adenocarcinomas intestinales.

En la actualidad, el único tratamiento disponible para los celíacos es el seguimiento de dieta sin gluten (DSG). Se ha demostrado que una estricta adherencia a la DSG es fundamental para eliminar los síntomas de la enfermedad, evitar deficiencias nutricionales y mejorar la calidad de vida de los enfermos celíacos evitando complicaciones a corto-medio plazo de gran morbilidad y coste socio-sanitario (osteopenia-osteoporosis, enfermedades autoinmunes, desnutriciones intrauterinas, etc.). No obstante, numerosos estudios han sugerido que las transgresiones de la dieta tanto deliberadas como involuntarias son relativamente frecuentes. Entre las principales causas del incumplimiento se encuentran los condicionamientos de la vida social, el

elevado coste de los productos dietéticos especiales o las dificultades tecnológicas para garantizar la ausencia de gluten en los alimentos complejos.

La cantidad de gluten capaz de causar daño en la salud del celíaco es muy baja se ha descrito que el límite es inferior de 10 mg por día. Por lo tanto, es imposible evaluar la suma de todas las contaminaciones diarias individuales para saber si el celíaco ha excedido este umbral. Así pues, mientras que algunos pacientes logran una recuperación total de su enfermedad mediante el seguimiento de una DSG; hay celíacos que requieren un control periódico para conocer la eficacia del tratamiento; y otros muchos que darían la bienvenida a nuevos productos alimenticios que permitan una mayor flexibilidad en su dieta. En base a ello, el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral se ha centrado en el estudio de nuevas estrategias de control de la enfermedad celíaca, por un lado, mediante la caracterización de péptidos y epítomos inmunogénicos del gluten en distintas variedades de trigos comerciales; y por el otro, mediante la validación clínica de un biomarcador para el seguimiento de la dieta del paciente celíaco.

El **Capítulo 1** es una introducción general sobre la enfermedad celíaca.

En el **Capítulo 2** se exponen los antecedentes del tema y los objetivos principales de esta Tesis Doctoral.

El **Capítulo 3** comprende una revisión bibliográfica global sobre las patologías relacionadas con la ingesta de gluten, que son un grupo de desórdenes inmunológicos que se clasifican según los síntomas clínicos que producen y la respuesta inmune generada. La elevada prevalencia de estas enfermedades y los efectos nocivos de las proteínas del gluten para la salud representan un reto clínico y científico importante.

En el **capítulo 4**, se caracterizan variantes de epítomos inmunogénicos del gluten en las α -gliadinas de la tribu Triticeae, tanto en especies diploides, como tetraploides y hexaploides de trigo. Estas gliadinas representan la fracción con mayor inmunogenicidad del gluten. Por ello, el estudio de la capacidad inmunoestimuladora de variantes de epítomos canónicos con sustituciones de aminoácidos, de manera que se elimine la toxicidad de estos epítomos, ofrece nuevas posibilidades en la generación de trigos con una toxicidad reducida. Dichas variedades ayudarían a minimizar la presencia de epítomos inmunogénicos en la harina de trigo, manteniendo las propiedades nutricionales y tecnológicas de este cereal.

En el **Capítulo 5** se ha llevado a cabo un ensayo clínico prospectivo con pacientes celíacos, que llevan más dos años a DSG, en el que se ha determinado la utilidad clínica de los péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) en orina como nuevo

biomarcador para controlar la adherencia a la DSG correlacionándolo con parámetros clínicos e histológicos característicos de la enfermedad. Mediante este estudio, se ha demostrado que la ausencia repetida de GIP en orina permite verificar el correcto cumplimiento de la DSG a la vista de su relación con la ausencia de atrofia vellositaria, evitando la necesidad del uso de técnicas más invasivas para estudiar las posibles lesiones histológicas en el intestino del enfermo celíaco.

En el **Capítulo 6**, se discuten los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral, abordando su aplicación para el control y seguimiento de la DSG.

Por último, en el **Capítulo 7**, se incluyen las conclusiones alcanzadas en esta Tesis Doctoral.

Abreviaturas y símbolos

Aa	Aminoácido
AcMo	Anticuerpo monoclonal
Anti-tTG	Anti-transglutaminasa tisular
AT	Alergia al trigo
CD4+	Proteína de superficie de los linfocitos T cooperadores
DGP	Péptidos desaminados de la gliadina
DSG	Dieta sin gluten
EC	Enfermedad celíaca
GIP	Péptidos inmunogénicos del gluten
Gln	Glutamina
H	Histidina
HLA	Antígeno leucocitarios humanos
IEL	Linfocitos intraepiteliales
IFN- γ	Interferón gamma
IL-15	Interleuquina
PEP	Prolin-endopeptidasa
ppm	Partes por millón
P	Prolina
Q	Glutamina
R	Arginina
S	Serina
SGNC	Sensibilidad al gluten no celíaca
tTG	Transglutaminasa tisular
33-mer	Péptido de 33 aminoácidos

Abreviaturas y símbolos

AGA	Anti-gliadin
Anti-tTG	Anti-tissue transglutamisase
ATIs	Amylase-trypsin inhibitors
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
CD	Celiac disease
CDAT	Celiac Dietary Adherence Test
CR	Cross reactivity
d	Day
DCs	Dendritic cells
DGP	Deamidated gliadin peptide
EMA	anti-endomysium antibody
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FA	Food allergy
FODMAPs	Fermentable oligo-di-monosaccharides and polyols
g	Grams
GFD	Gluten-free diet
GIP	gluten immunogenic peptides
Gln	Glutamin
GSs	Glutenin subunits
H	Histidine
h	hours
HLA	Human leucocyte antigen
HMW	High molecular weight

HRP	Horseradish peroxidase
IC	immunocromatographic
IC50	Concentration of the antigen that reduces the peak absorbance by 50% in the assay
IFN- γ	Interferon gamma
IL-15	Interleukin 15
IQR	Interquartile range
Ig A	Immunoglobulin A
Ig G	Immunoglobulin G
κ	Cohen's kappa index
L	leucine
L	Líter
LMW	Low molecular weight
M	Molar
mg	Milligrams
Min	Minutes
mL	Milliliter
mo	Moth
moAb	Monoclonal antibody
moAbs	Monoclonal antibodies
MW	Molecular weight
NCGS	Non-celiac gluten sensitivity
NRCD	Nonresponsive CD
ng	Nanograms
nm	Nanometers
NPV	Negative predictive value

PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphate buffer saline
ppm	Parts per million
PPV	Positive predictive value
P/Pro	Proline
Q	glutamine
QL	Quantification limit
RT	Room temperature
S	Serine
SD	Standard desviation
SI	Stimulation index
TBS	Tris-buffered saline
TCR	T-cell receptor
TFA	Trifluoroacetil acid
TMB	Tetramethylbenzidine
TTG	anti-transglutaminase IgA antibody
tTG	Tissue transglutaminase
WA	wheat allergy
WDEIA	Wheat dependent exercise-induced anaphylaxis
wk	Week
Y	Tyrosine
Y	Year
µg	Micrograms
µL	Microliters
33-mer	Peptide of 33 amino acids

Índice

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	1
1.PATOGENIA	2
El papel del gluten	2
Respuesta inmunológica	5
Factores genéticos	6
Factores ambientales.....	7
2. EPIDEMIOLOGÍA.....	8
3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	9
4 DIAGNÓSTICO	10
Importancia de la evaluación de HLA-DQ2 y HLA-DQ8.....	10
Pruebas serológicas.....	10
Biopsia e histología	11
5. TRATAMIENTO ACTUAL DE LA EC.....	12
Futuras alternativas terapéuticas	12
Control de productos sin gluten. Métodos de análisis	13
Seguimiento de la dieta libre de gluten	14
Detección de Péptidos inmunogénicos del gluten (GIP).....	16
REFERENCIAS.....	19
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES DEL TEMA Y OBJETIVOS.....	29
REFERENCIAS.....	31
CAPÍTULO 3. DIETA SIN GLUTEN Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL GLUTEN	34
Gluten-free Diet and Gluten-related Disorders.....	35
CAPÍTULO 4. POTENCIAL INMUNOGÉNICO DE VARIANTES DE EPÍTOPOS DE α -GLIADINA DE ESPECIES DE TRIGOS	36
Celiac Immunogenic Potential of α -Gliadin Epitope Variants from Triticum and Aegilops Species.....	37
CAPÍTULO 5. VALOR PREDICTIVO NEGATIVO DE LA AUSENCIA REPETIDA DE PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS DEL GLUTEN EN ORINA PARA LA PREDICCIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE LA MUCOSA DE PACIENTES CELÍACOS TRATADOS.....	51
Negative predictive value of the repeated absence of gluten immunogenic peptides in the urine of treated celiac patients in predicting mucosal healing: new proposals for follow-up in celiac disease.....	52
CAPÍTULO 6. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	53

Patologías asociadas al gluten.....	54
Potencial inmunogénico de variantes de epítipo de α -gliadina	56
Validación clínica de un biomarcador para el seguimiento del paciente celíaco	58
REFERENCIAS.....	61
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	67

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía inflamatoria crónica del intestino delgado mediada inmunológicamente que está causada por la ingesta de gluten en la dieta en individuos genéticamente predispuestos. Esta enfermedad se desarrolla al ingerir gluten, que es la mayor reserva proteica del trigo y otros cereales similares (Rubio-Tapia y Murray, 2010a; Ludvigsson *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2018).

Originalmente 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, 1953) 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). 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 nueva guía diagnóstica 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 presenta un amplio abanico de formas clínicas de expresión, con síntomas tanto intestinales como extraintestinales o incluso formas asintomáticas de la enfermedad. En la mayoría de los pacientes con EC, la enteropatía revierte bajo una dieta libre de gluten. Sin embargo, las transgresiones de la dieta, voluntarias o involuntarias, pueden implicar la no recuperación del intestino delgado y el mantenimiento de la sintomatología o, lo que es más grave, la aparición de una forma de EC que no responde a la dieta sin gluten que se conoce como EC refractaria, caracterizada por inflamación crónica y puede llevar asociada una alta tasa de incidencia de linfomas intestinales (Ludvigsson *et al.*, 2012, Hadithi y Peña, 2010).

1.PATOGENIA

El papel del gluten

El gluten es una mezcla compleja de proteínas presentes en ciertos cereales como el trigo, la cebada, el centeno y la avena. Consiste en dos fracciones: una soluble en etanol, denominada prolamina, más concretamente gliadina, hordeína, secalina o avenina en función del cereal al que nos estemos refiriendo (trigo, cebada, centeno y avena respectivamente), y otra insoluble, que recibe el nombre de glutenina (Wieser, 1995; Sealey-Voyksner *et al.*, 2010). Ambas contienen varias subunidades de proteínas que pueden ser separadas posteriormente mediante electroforesis. Las prolaminas están formadas por proteínas monoméricas que pueden clasificarse como α -, β -, γ -, ω -gliadinas en el caso del trigo, mientras que las gluteninas se encuentran formando polímeros unidos mediante puentes de disulfuro intercatenarios. Estos enlaces deben ser reducidos para poder separar las subunidades constituyentes de las gluteninas, proteínas de alto peso molecular ("high molecular weight", HMW) y proteínas de bajo peso molecular ("low molecular weight", LMW) (Shewry *et al.*, 1988; Shewry y Halford, 2002; Schalk *et al.*, 2017) (Figura 1).

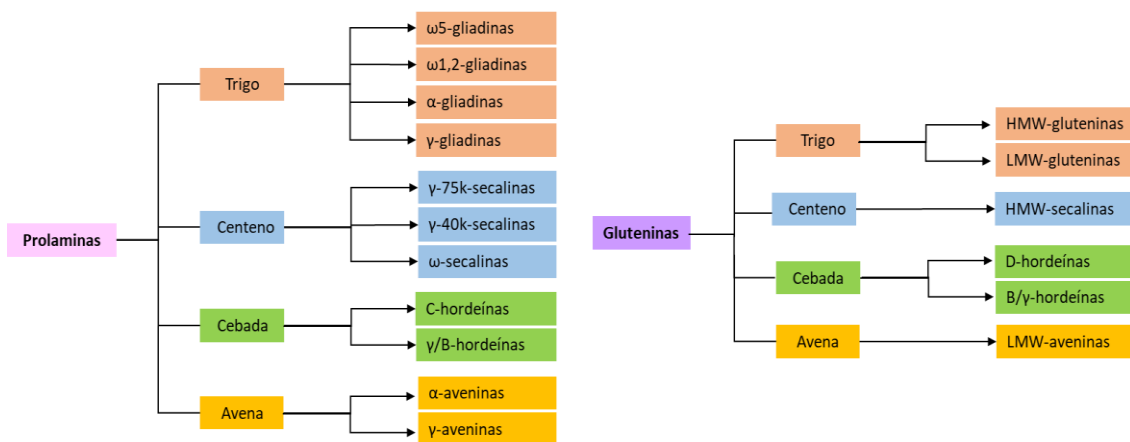


Figura 1. Clasificación de las proteínas del gluten del trigo, la cebada, el centeno y la avena. Modificado según Schalk *et al.* (2017).

Además de por su solubilidad o composición, las proteínas del gluten pueden ser clasificadas según su peso molecular en tres grupos. El primero, llamado HMW (moléculas de alto peso molecular), se compone de la subunidad de alto peso molecular de la glutenina del trigo y centeno y de la D-hordeína. El segundo grupo (MMW, peso molecular medio) está constituido por las ω -gliadinas, ω 5-secalinas y C-hordeínas. Finalmente, el grupo LMW (bajo peso molecular) está formado por α -gliadinas, γ -gliadinas, γ -secalinas (40 y 75k) y γ -hordeínas (Figura1) (Schalk *et al.*, 2017)

Entre las principales proteínas de la dieta, el gluten es la única que contiene aproximadamente un 15% de residuos de prolina y un 35% de residuos de glutamina (Stern *et al.*, 2001). El alto contenido en prolinas impide la proteólisis completa por las enzimas gástricas, pancreáticas e intestinales, de tal manera que se forman largos oligopéptidos inmunoreactivos en el intestino delgado. Al mismo tiempo, algunos residuos de glutamina de estos péptidos son desaminados catalíticamente por la enzima transglutaminasa tisular (tTG). Esta desaminación aumenta la inmunogenicidad de los péptidos debido a las interacciones de alta afinidad entre los residuos modificados y los bolsillos específicos en los sitios de unión al ligando de las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8 (Sollid y Khosla, 2011). (Figura 2).

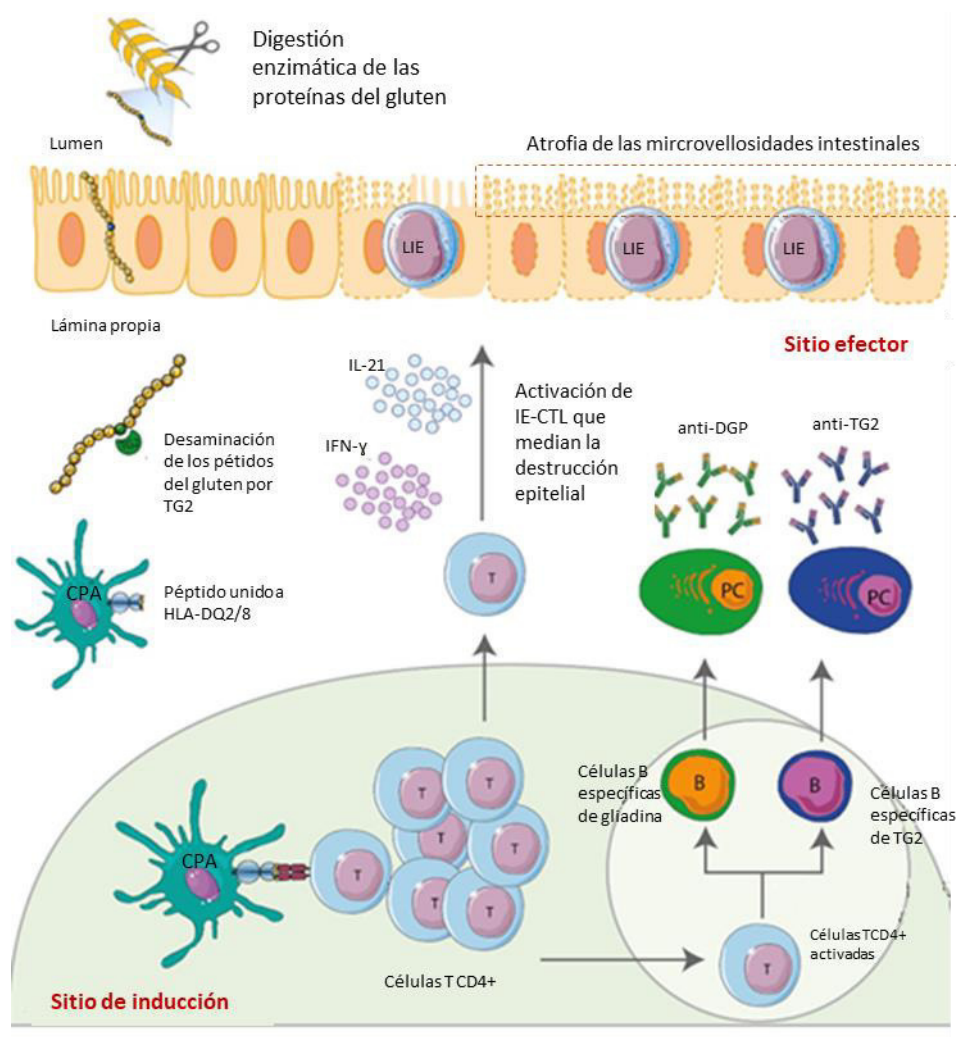


Figura 2. Esquema del mecanismo molecular de la enfermedad celíaca. Las enzimas gástricas y pancreáticas degradarían las proteínas del gluten salvo determinados péptidos resistentes a los enzimas del intestino. El paso de estos péptidos y la modificación por la transglutaminasa tisular, llevaría a la presentación de estos péptidos modificados como

antígenos a células T y las activaría. Este proceso genera una respuesta hipersensible contra todo lo asociado a estos péptidos tóxicos que acaba destruyendo las vellosidades intestinales. (modificado según Christophersen *et al.*, 2019).

La mayoría de las secuencias estimuladoras de células T descritas y estudiadas hasta la fecha pertenecen a la α -gliadina, aunque la inmunogenicidad de otros grupos proteicos ha sido confirmada mediante estudios *in vivo* (Ciclitira *et al.*, 1984). La identificación de péptidos tóxicos, tales como el 33-mer de la fracción α -2 gliadina (residuos 57-89), que contiene 6 epítopos de reconocimiento de las células T, ha proporcionado la luz sobre el mecanismo molecular de la intolerancia al gluten (Shan *et al.*, 2002; Tye-Din *et al.*, 2010). Desde entonces, gracias a estudios llevados a cabo tanto *in silico* como *in vivo*, se han identificado otros péptidos activadores de células T, algunos de los cuales se resumen en la tabla 1. (Tye-Din *et al.*, 2010; Mitea *et al.*, 2008; Sollid *et al.*, 2012; Sollid *et al.*, 2020).

Tabla 1. Péptidos inmunogénicos identificados en distintas fracciones protéicas del gluten.

Proteína	Secuencia de aminoácido	Referencia
α -gliadina	PFPQPQLPY	(Arentz-Hansen <i>et al.</i> 2000)
	PYPQPQLPY	(Arentz-Hansen <i>et al.</i> 2002)
	PQPQLPYYPQ	(Arentz-Hansen <i>et al.</i> 2000)
	FRPQQPYYPQ	(Vader <i>et al.</i> 2002)
	QGSFQPSQQ	(van de Wal <i>et al.</i> 1998)
	QGSFQPSQQ	(Kooy-Winkelaar <i>et al.</i> 2011)
	QGSVQPQQL	(Dorum <i>et al.</i> 2014)
	QYSQPQQPI	(Dorum <i>et al.</i> 2014)
γ -gliadina	PQQSFPQQQ	(Sjöström <i>et al.</i> 1998)
	IQPQQPAQL	(Qiao <i>et al.</i> 2005; Vader <i>et al.</i> 2002)
	QQPQQPYYPQ	(Arentz-Hansen <i>et al.</i> 2002)
	SQPQQQFPQ	(Arentz-Hansen <i>et al.</i> 2002)
	PQPQQQFPQ	(Qiao <i>et al.</i> 2005)
	QQPQQPFPQ	(Arentz-Hansen <i>et al.</i> 2002)
	PQPQQPFCQ	(Qiao and Sollid, 2019)
	LQPQQPFPQ	(Qiao and Sollid, 2019)
	QQPFPQQPQ	(Arentz-Hansen <i>et al.</i> 2002)
	QQPQQPFPQ	(Tollefsen <i>et al.</i> 2006)
	QQPQQPYYPQ	(Tollefsen <i>et al.</i> 2006)
	PQQSFPQQQ	(Kooy-Winkelaar <i>et al.</i> 2011)
PQQSFPQQQ	(Petersen <i>et al.</i> 2016)	
ω -gliadina	PFPQPQQPF	(Tye-Din <i>et al.</i> 2010)
	PQPQQPFPW	(Tye-Din <i>et al.</i> 2010)
LMW-glutenina	PFSQQQQPV	(Vader <i>et al.</i> 2002b)
	FSSQQQQSPF	(Stepniak <i>et al.</i> , 2005; Vader <i>et al.</i> , 2002)
	PFSQQQQPV	(Bodd <i>et al.</i> 2012)
HMW-glutenina	QGYYP TSPQ	(van de Wal <i>et al.</i> 1999)
	QGYYP TSPQ	(Kooy-Winkelaar <i>et al.</i> 2011)
Hordeína	FSSQQQQSPF	(Stepniak <i>et al.</i> 2005; Vader <i>et al.</i> 2002)
	PFPQPQQPF	(Tye-Din <i>et al.</i> 2010; Vader <i>et al.</i> 2003)
	PQPQQPFPQ	(Vader <i>et al.</i> 2003)
	PIPQQPQPY	(Tye-Din <i>et al.</i> 2010)

	P Y P Q Q P Q P Y	(Hardy <i>et al.</i> , 2015b)
Secalina	P F P Q P Q Q P F	(Tye-Din <i>et al.</i> 2010; Vader <i>et al.</i> 2003a)
	P Q P Q Q P F P Q	(Vader <i>et al.</i> 2003a)
	P F P Q Q P Q Q I	(Hardy <i>et al.</i> , 2015b)
	P Y P Q Q Q Q P F	(Arentz-Hansen <i>et al.</i> 2004; Vader <i>et al.</i> 2003a)
Avenina	P Y P Q Q Q Q P F	(Arentz-Hansen <i>et al.</i> 2004; Vader <i>et al.</i> 2003a)
	P Y P Q Q Q Q P I	(Hardy <i>et al.</i> , 2015b)
	Q G Y Y P T S P Q	(van de Wal <i>et al.</i> 1999)
HMW-glutenina	Q G Y Y P T S P Q	(Kooy-Winkelaar <i>et al.</i> 2011)

Los estudios que buscan incrementar nuestro conocimiento sobre las secuencias tóxicas de gliadina y gluteninas, así como de los péptidos homólogos presentes en otros cereales tóxicos, tienen gran importancia para comprender muchos aspectos de la patogénesis de la enfermedad celíaca.

Respuesta inmunológica

El modelo patogénico más ampliamente aceptado incluye alteraciones en la digestión alterada y el transporte transepitelial del gluten. La respuesta inmune inapropiada a las proteínas del gluten, observada en pacientes celíacos, incluye tanto la inmunidad innata (el gluten tiene un efecto tóxico directo sobre el epitelio intestinal, cuyo principal mediador es la interleucina (IL)-15) y la inmunidad adaptativa o específica (depende de la estimulación de las células T CD4+ reactivas al gluten) (Qiao *et al.*, 2012; Sollid, 2013; Escudero-Hernández *et al.*, 2016; Christophersen *et al.*, 2019) (Figura 3).

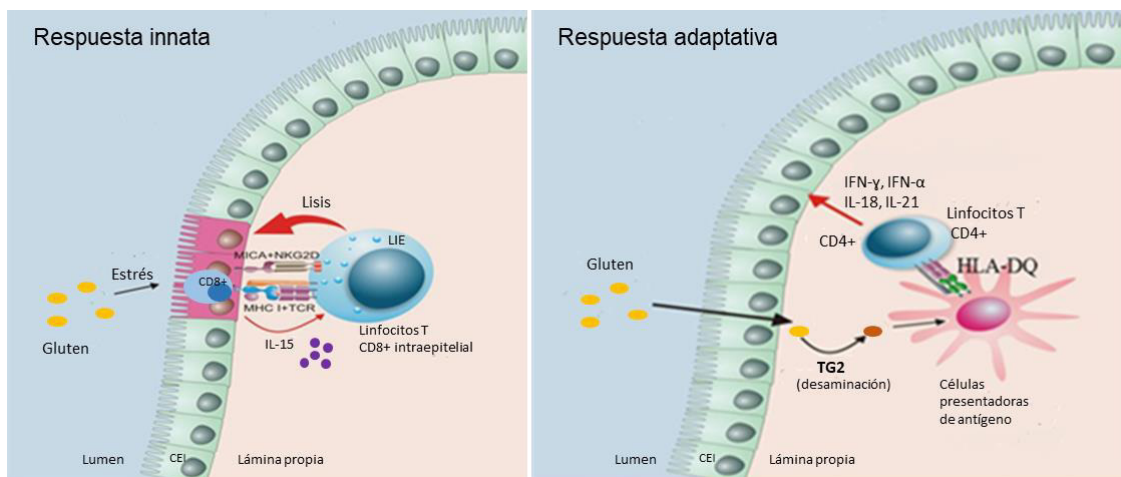


Figura 3. Respuestas inmunitarias frente al gluten en la enfermedad celíaca. Los péptidos de gluten inducen estrés en las células epiteliales intestinales (CEI), que sintetizan interleucina (IL)-15, junto con cambios que determinan la reprogramación de los linfocitos intraepiteliales (LIE). Los LIE expresan receptores NKG2D, que reconocen las moléculas de estrés, MICA, expresadas por los enterocitos; colaborando así en la destrucción del epitelio (respuesta innata).

Además, al llegar a la lámina propia, los péptidos son desaminados por la transglutaminasa tisular (TG2), aumentando la afinidad por las moléculas HLA-DQ expresadas por las células dendríticas (DC) y, con ello, la presentación de antígeno a los linfocitos T (respuesta adaptativa). Modificado según Escudero-Hernández *et al.*, 2016.

Algunos péptidos de gliadina, tales como p31-43 y p31-49 de la α -gliadina, los cuales no son reconocidos por las células T CD4⁺ en el contexto de las moléculas HLA-DQ2/8, han sido descritos con propiedades estimuladoras de la respuesta innata, los cuales actúan sobre las células epiteliales intestinales (CEI) y las células dendríticas. Estos péptidos son capaces de alterar la expresión génica y el transporte, además de generar situaciones de estrés que se manifiestan por la síntesis de IL-15. Dicha IL-15 activa al factor de transcripción NF- κ B en las células adyacentes, lo que a su vez induce más producción de IL-15, así como la inducción de iNOS facilitándose un estrés oxidativo que retroalimenta la respuesta innata, la cual induce a su vez una señal de estrés en los enterocitos. La IL-15 induce un comportamiento "NK-like" en los linfocitos intraepiteliales, dando lugar a una apoptosis enterocitaria y debilitamiento las "tight-junctions" entre los enterocitos que no han entrado en apoptosis. (Menard *et al.*, 2012, Escudero-Hernández *et al.*, 2016).

La respuesta adaptativa se ve facilitada como consecuencia del incremento en la permeabilidad intestinal (apoptosis enterocitaria y debilitamiento de las "tight-junctions") ya que los péptidos inmunoadaptativos como el 33-mer pueden alcanzar la láminapropia, donde son desaminados por la enzima transglutaminasa tisular (TG2), la cual es el componente clave que explica la activación de la respuesta inmune adaptativa al gluten (Raki *et al.*, 2006). La desaminación favorece la unión entre los péptidos y las moléculas HLA-DQ2 /DQ8 expresados en las células dendríticas. Estas células dendríticas realizan la presentación de antígenos específicos del gluten a las células T y, como consecuencia, se inicia una respuesta pro-inflamatoria caracterizada principalmente por la producción de interferón- γ (IFN- γ) que será finalmente responsable de la infiltración de linfocitos intraepiteliales, hiperplasia de las criptas y atrofia de las vellosidades, desencadenantes de todas las manifestaciones clínicas (Escudero-Hernández *et al.*, 2016; Christophersen *et al.*, 2019).

Factores genéticos

A pesar de que la modalidad de herencia de la EC aún es desconocida, se conoce desde hace tiempo que la genética participa en la susceptibilidad a la enfermedad. Los estudios sobre la prevalencia de la EC en familias afectadas y especialmente, aquellas en las que se comparan parejas de gemelos, han sido muy útiles para estimar la proporción en

la que los factores genéticos y ambientales contribuyen al desarrollo de este complejo trastorno. La base genética de la EC está ampliamente demostrada ya que mientras que la prevalencia de la EC se acerca al 1% en la población general, está aumentada al 10% entre los familiares de primer grado de un paciente celíaco (Sollid, 2002). Además, el ambiente parece tener también un efecto en el desarrollo de la EC, ya que los gemelos dicigóticos presentan una concordancia en el desarrollo de la EC del 16-20%, superior al 10% esperable entre hermanos no gemelos (Sollid, 2002). El hecho de que exista una concordancia en el desarrollo de la patología entre gemelos monocigotos (con el mismo acervo genético) del 75-86%, sitúa en dicho porcentaje la base genética de la EC, achacándose el porcentaje restante a factores ambientales como podrían ser la duración de la lactancia materna, la edad de introducción del gluten en la dieta o incluso la existencia de infecciones víricas y/o bacteriológicas concomitantes con la ingesta del gluten (Greco *et al.*, 2002).

La mayor porción del riesgo genético de desarrollar EC proviene de la presencia de ciertos alelos del Antígeno Leucocitario Humano (HLA, por sus siglas en inglés). La EC tiene un origen poligénico y multifactorial donde el heterodímero HLA-DQ2 (DQA1*05/DQB1*02), y en menor medida el HLA-DQ8 (DQA1*03 /DQ131*0302), están presentes en la mayoría de los pacientes celíacos, permitiendo explicar hasta el 40% de la carga genética de la patología (Sollid, 2002; van Heel *et al.*, 2007). Ambos heterodímeros juegan un papel central en la patogénesis de la EC al ser las moléculas encargadas de la presentación antigénica a través de las células presentadoras de antígeno (Donnelly *et al.*, 2011). El heterodímero HLA-DQ2 está presente en más del 90% de los pacientes, pero se encuentra también entre el 20 y 30% de la población general, aunque sólo el 0,5-1% de ésta desarrolla la EC (Sollid, 2002). Por tanto, parece necesaria la implicación de numerosos loci de efecto menor. Así, los genes de posible susceptibilidad se engloban en numerosas regiones cromosómicas, como los clusters CELIAC 1, CELIAC 2, CELIAC 3 o CELIAC 4. Sin embargo, todos estos loci de susceptibilidad tendrían un efecto mucho menor y deberían actuar conjuntamente con el principal factor HLA-DQ2/DQ8.

Factores ambientales

Los estudios epidemiológicos han demostrado que los factores ambientales representan un papel importante en el desarrollo de la EC (Serena *et al.*, 2015). Esto se ve corroborado por el rápido número de diagnósticos crecientes de EC, especialmente entre pacientes adultos (Catassi *et al.*, 2014) y por la creciente incidencia de EC

refractaria, donde los individuos afectados no responden a la dieta libre de gluten (Malamut y Cellier, 2015).

Durante varios años, se ha planteado la hipótesis de que la lactancia materna tiene un papel protector contra la aparición de EC a través de diferentes mecanismos (Akobeng y Heller, 2007). La administración inicial de gluten antes de los cuatro meses de edad se ha asociado con mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, y la introducción del gluten con posterioridad a los siete meses se ha asociado con un riesgo menor. Sin embargo, la superposición de la introducción del gluten con la lactancia materna puede ser un factor protector importante para disminuir al mínimo el riesgo de la enfermedad celíaca.

Se ha planteado la hipótesis de que las infecciones gastrointestinales repetidas aumentan el riesgo de EC (Chmielewska *et al.*, 2015). Las infecciones pueden causar inflamación intestinal, lo que reduce la tolerancia al gluten en individuos genéticamente predispuestos (Bethune y Khosla, 2008). En los últimos años, los investigadores han comenzado a investigar si las alteraciones en la composición del microbioma pueden contribuir activamente a la pérdida de tolerancia al gluten (Krishnareddy, 2019; Serena *et al.*, 2019). La determinación de los factores ambientales que influyen en la aparición de la enfermedad podría facilitar el desarrollo de estrategias para la prevención primaria de ésta.

2. EPIDEMIOLOGÍA

A través de estudios sero-epidemiológicos realizados en diversos países europeos y Estados Unidos, se estima que la prevalencia actual de la EC está situada alrededor del 1% de la población, aunque la mayoría están sin diagnosticar. Por cada caso diagnosticado puede haber entre 7-11 casos no diagnosticados, por lo que está claramente infraestimada a nivel mundial (Catassi, 2005). Se observa, sin embargo, una tendencia a un mayor número de diagnósticos en las últimas décadas, debido no sólo a un mejor conocimiento de la enfermedad y a un mayor índice de sospecha, sino también a la disponibilidad de mejores marcadores serológicos, y a una mayor realización de biopsias duodenales, indicadas por diversos motivos. Además, la enfermedad es reconocida no sólo en países poblados por descendientes de europeos, sino también en Oriente Medio, Asia, Sudamérica y África del Norte (Ludvigsson y Murray, 2019).

3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La EC es una afección inmunológica que afecta a múltiples sistemas de órganos, por lo que las manifestaciones clínicas son múltiples en forma y número debido a la naturaleza multisistémica de la EC (Green *et al.*, 2015). Las manifestaciones clínicas de la EC varían mucho con la edad. Los lactantes y los niños pequeños generalmente presentan diarrea, distensión abdominal y retraso del crecimiento. Sin embargo, también son comunes los vómitos, la irritabilidad, la anorexia y el estreñimiento. Los adolescentes suelen presentar manifestaciones extraintestinales, como talla baja, síntomas neurológicos o anemia (Stern *et al.*, 2001; Riestra, 2008; Ludvigsson y Green, 2011). La presentación clásica en los adultos es la diarrea que puede estar acompañada por dolor o malestar abdominal. Las presentaciones silentes en los adultos (pacientes asintomáticos con serología positiva para la EC, altos niveles de linfocitos intraepiteliales en la biopsia intestinal y EC, frecuentemente, asociada con otras enfermedades tales como la diabetes mellitus tipo 1 o enfermedades autoinmunes tiroideas y hepáticas o síndrome de Down) incluyen la anemia ferropénica, la osteoporosis y el diagnóstico ocasional durante una endoscopia indicada por otras razones. En las últimas décadas ha habido un cambio progresivo en las manifestaciones clínicas, con menos pacientes, tanto adultos como niños, que presentan una forma clásica y diarreica. Esto, en los niños, se observa solo en los más pequeños, mientras que los problemas de crecimiento, los grupos de detección de riesgo y el dolor abdominal recurrente son los modos de presentación más comunes entre los niños. Entre los adultos, la diarrea es la presentación más común seguida de anemia. (Green *et al.*, 2015).

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 EC. Así mismo, pueden aparecer trastornos en la esfera reproductiva (menorquía tardía, menopausia precoz, abortos, infertilidad, impotencia, recién nacidos de bajo peso), osteopenia, hipoesplenismo, adenocarcinoma del intestino delgado o hepatitis reactiva (hipertransaminasemia criptogenética) (Riestra, 2008; Ludvigsson y Green 2011). Algunos casos son diagnosticados debido a la mayor vigilancia que se hace de la enfermedad en las personas con antecedentes familiares y en las personas con síndrome de Down; así como en el síndrome de Turner o en la diabetes tipo 1. Las personas con EC tienen además mayor riesgo de enfermedades inmunológicas, comparadas con la población general. Los estudios de detección están indicados principalmente en los pacientes con distensión, síndrome de colon irritable, enfermedad tiroidea, diarrea crónica de etiología desconocida fatiga crónica y

estreñimiento. La mayor parte de las personas con CD permanecen sin diagnosticar. (Ludvigsson y Green, 2011; Green *et al.*, 2015).

4 DIAGNÓSTICO

La EC puede ser difícil de reconocer debido a las variaciones en su presentación y la intensidad de los síntomas y signos, e incluso en muchos casos se puede desarrollar sin síntomas. Se ha estimado que sólo 1 de cada 3-7 pacientes adultos con EC son sintomáticos. Los síntomas clínicos de la EC pueden aparecer en la infancia, en la adolescencia o en la edad adulta. La EC sólo se desarrolla después de la introducción del gluten en la dieta del niño. Además, la dieta sin gluten (DSG) mejora o elimina los síntomas, normaliza los anticuerpos específicos de la enfermedad y los hallazgos histológicos. Por lo tanto, una dieta con cantidades normales de pan, pasta y otros alimentos que contengan gluten debe ser consumida hasta el final del proceso diagnóstico (Husby *et al.*, 2012; Al-Bawardy *et al.*, 2017).

Importancia de la evaluación de HLA-DQ2 y HLA-DQ8

El alelo HLA-DQ2 se identifica en el 90% de los pacientes con EC y en el 5-7% HLA-DQ8. Una pequeña proporción de pacientes tiene un tipo genético alternativo que a menudo incorpora la mitad del par de genes que codifica DQ2; llamado DQ2.2. Debido a que esos alelos se hallan en el 30-40% de la población general (siendo el más común el HLA-DQ2) la ausencia de esos alelos es importante por su valor predictivo negativo (Sollid, 2002). La evaluación de HLA-DQ2/HLA-DQ8 desempeña un papel importante en la detección de casos en los que los individuos pertenecen a grupos en situación de riesgo para la EC (Liu *et al.*, 2014). Estas personas incluyen, entre otros, familiares de primer grado de un caso confirmado y pacientes que padecen enfermedades que han demostrado estar asociadas con la EC. Un resultado negativo para HLA-DQ2/HLA-DQ8 significa muy baja probabilidad de desarrollo de la enfermedad, por lo tanto, no habría necesidad de analizar los anticuerpos séricos en pruebas posteriores (Husby *et al.*, 2012).

Pruebas serológicas

Los análisis de anticuerpos más sensibles para el diagnóstico de EC son los de clase IgA: anticuerpos frente a péptidos desaminados de la gliadina (DGP), anticuerpos dirigidos contra la transglutaminasa ti (tTG) y anticuerpos anti-endomisio (EMA) (Hill, 2005; Wolf *et al.*, 2017). Los anticuerpos anti-DGP son considerados menos sensibles

o específicos para la detección de la EC con respecto los anti-tTG y anti-EMA. En una primera aproximación los anti-tTG son los anticuerpos de preferencia para el diagnóstico de la EC según los criterios diagnósticos de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN). En caso de deficiencia de Ig-A se usan test de análisis de Ig-G (Husby *et al.*, 2012).

Biopsia e histología

La biopsia endoscópica de intestino delgado constituye otro de los puntos clave en el diagnóstico de la EC. Para esta enfermedad se ha identificado un patrón distintivo de anomalías histológicas. Las características de estas anomalías incluyen la atrofia parcial o total de las vellosidades, criptas alargadas, disminución de la relación vellosidad/cripta, aumento del índice mitótico en las criptas, aumento de la densidad de linfocitos intraepiteliales (IEL), e infiltración de células plasmáticas en la lámina propia. Además, se puede identificar la ausencia del borde en cepillo, así como alteraciones en las células epiteliales. De acuerdo con la clasificación de Marsh, las lesiones incluyen patrones infiltrativos, hiperplásicos y atrofia (Figura 4).

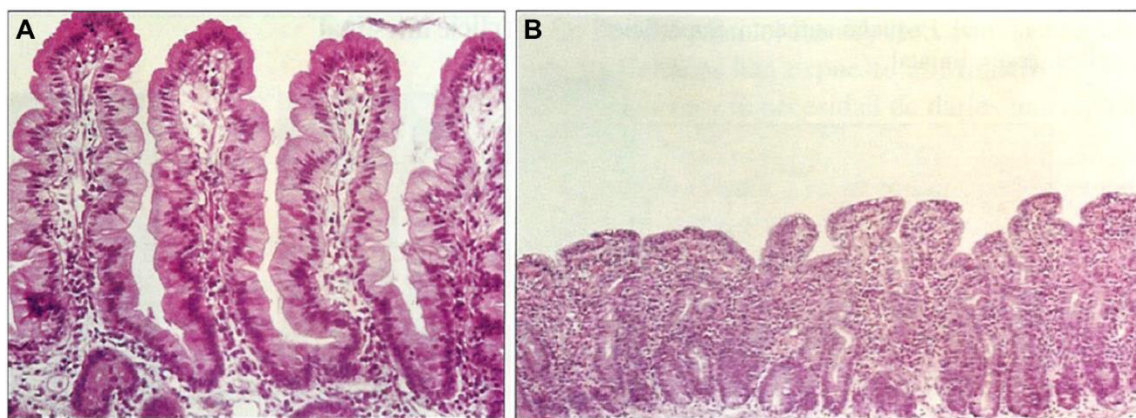


Figura 4. Mucosa duodenal de un paciente control no celiaco (A) y de un paciente celiaco (B). Modificado según Escudero-Hernandez, (2016).

La confirmación de la enfermedad mediante biopsia es muy importante en determinados tipos de pacientes, sin embargo, a diferencia de lo que establecía la anterior la guía sobre diagnóstico de la EC de la ESPGHAN, actualmente se considera que, en pacientes con elevados niveles de anticuerpos, el diagnóstico podría basarse en la combinación de síntomas, anticuerpos y HLA, omitiendo en tal caso la biopsia duodenal (Husby *et al.*, 2012; Wolf *et al.*, 2017).

5. TRATAMIENTO ACTUAL DE LA EC

En la actualidad, la única terapia existente para los pacientes celíacos consiste en el seguimiento de una dieta estricta ausente de gluten durante toda la vida, mediante la exclusión de la dieta de las proteínas tóxicas del trigo (gliadinas y gluteninas), y de sus homólogos en la cebada (hordeínas), el centeno (secalinas), y la avena (aveninas), así como los híbridos de estos cereales (como kamut y triticale) y sus derivados (almidón, harina, etc.) (Kupper, 2005).

En la mayoría de estos pacientes, el cumplimiento estricto de una DSG conduce, en pocos meses, a la recuperación rápida y completa de la arquitectura normal y la función de la mucosa del intestino delgado, así como a la remisión de los síntomas y la normalización de las pruebas serológicas (Green y Jabri, 2003). Sin embargo, el mantenimiento de una DSG no es tarea sencilla, no sólo por el elevado coste económico que implica, sino que también existen situaciones que favorecen su ingesta involuntaria, como, por ejemplo, la presencia de gluten en una gran cantidad de productos manufacturados. 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. El riesgo que suponen estos alimentos para los celíacos hace conveniente un control riguroso del contenido en gluten.

La definición de un alimento sin gluten, por El Codex Alimentarius, es uno que contiene <20 ppm (o mg/kg) de gluten, aunque también se establece otra categoría: de alimentos con "contenido muy reducido de gluten", que se utilizará para productos fabricados con trigo, centeno, cebada, avena gluten, q o sus variedades híbridas, pero que hayan recibido un tratamiento especial para eliminar el gluten.

Futuras alternativas terapéuticas

A pesar de que la DSG ha demostrado ser segura y eficaz en la mayoría de los pacientes con EC, las dificultades para garantizar una correcta dieta libre gluten en el paciente celíaco han impulsado la investigación de alternativas terapéuticas que puedan actuar como coadyuvantes a la DSG, permitan menores transgresiones o reemplacen la DSG en determinadas circunstancias.

Una de las líneas de investigación es la eliminación de la toxicidad del gluten, la cual se basa en conseguir cereales exentos de péptidos tóxicos del gluten, obtenidos mediante ingeniería genética, pero que conserven sus propiedades organolépticas, y

sean adecuados para la panificación (Gil-Humanes *et al.*, 2010; Donnelly *et al.*, 2011; Mitea *et al.*, 2010). Por otro lado, están las terapias lumbinales que buscan neutralizar el gluten en la luz del intestino delgado. Entre ellas se incluyen la terapia de digestión enzimática, la cual se enfoca sobre la inactivación de los péptidos de gluten inmunogénicos. Las enzimas capaces de llevar a cabo este proceso son las proteasas de la familia de las prolil-endopeptidasas (PEPs), que no se hallan presentes en humanos (Gass y Khosla 2007; Bethune y Khosla 2012). Los probióticos, son terapias lumbinales, poseen una variedad de efectos inmunomoduladores. Se ha demostrado que preparaciones probióticas hidroliza las proteínas del gliadina *in vitro* y podría producir gliadinas pre-digeridas, durante el procesamiento de alimentos (Saulnier *et al.*, 2013)

La administración oral de proteasas específicas para glutamina prolina (es glutenasas) representa una posible alternativa terapéutica a una dieta controlada/libre de gluten (Stepniak y Koning 2006; Cerf-Bensussan *et al.*, 2007). Del mismo modo, existen otras estrategias en investigación basadas en tratamientos farmacológicos que interfieren en los distintos eslabones de la respuesta inmunológica, como el bloqueo de los receptores DQ2, antagonistas de la zonulina, de la IL15 o de la transglutaminasa. La anquilostomiasis, una infestación producida por la lombriz *Necator americanus* ha sido propuesta como un posible tratamiento para las enfermedades autoinmunes (Croese *et al.*, 2014).

Control de productos sin gluten. Métodos de análisis

Teniendo en cuenta la elevada prevalencia de la enfermedad, es imprescindible contar con métodos fiables para determinar la presencia de gluten y asegurar que los alimentos etiquetados como “sin gluten” sean seguros para las personas celíacas. El control de productos libres de gluten requiere el uso de métodos cuantitativos, altamente específicos y con gran poder de detección. El empleo de métodos de control inadecuados expone a los pacientes celíacos a un riesgo de salud elevado. Además, da lugar a graves perjuicios económicos y problemas legales asociados a una dudosa identificación de los productos libres de gluten. A nivel industrial, se debe realizar un control muy riguroso de las materias primas que emplean, y del producto final que comercializan.

Dada la complejidad del sistema a analizar, la única forma de proporcionar a los pacientes celíacos una dieta segura es el empleo de ensayos de alta sensibilidad y especificidad. Algunas de las técnicas empleadas para el análisis de gluten son los métodos inmunológicos basados en anticuerpos monoclonales (AcMos), principalmente

pruebas inmuno-enzimáticas, western blot y dispositivos de flujo lateral. En lo referente a las herramientas no inmunológicas, las más útiles son las técnicas de PCR o la espectrometría de masas.

Los métodos más utilizados para el análisis de gluten en alimentos, se basan en AcMos que presentan afinidad frente a diferentes fracciones de prolaminas o secuencias específicas de proteínas de gluten. Estos anticuerpos reconocen regiones repetitivas del gluten (Osman *et al.*, 2001; Doña *et al.*, 2010) o han sido diseñados a partir de regiones conocidas como tóxicas dentro de las secuencias proteicas del gluten (Spaenij-Dekking *et al.*, 2004, Mitea *et al.*, 2008; Morón *et al.*, 2008a; Morón *et al.*, 2008b). Algunos de estos anticuerpos han sido incorporados en diversos ensayos tipo ELISA para ser usados en gluten de los alimentos (Méndez *et al.*, 2005; Morón *et al.*, 2008a; Morón *et al.*, 2008b). Estos métodos son los más convenientes y extensamente empleados al unir sencillez, sensibilidad, economía, además, de detectar directamente las proteínas tóxicas para los pacientes celíacos.

Otra de las alternativas, usada principalmente como complementaria a las anteriores, está basada en técnicas de PCR mediante el uso de cebadores que codifican secuencias repetitivas de las prolaminas (Henterich *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2005). A diferencia de los ELISAs, la PCR es una técnica indirecta para detectar gluten, no cuantifica la presencia de gluten, sino la de ADN que codifica para el gluten.

La tercera posibilidad es el uso de técnicas tales como la espectrometría de masas. El procedimiento de estas metodologías se basa en la determinación de los espectros de masas característicos de diferentes fracciones del gluten. Además, con estas técnicas se pueden caracterizar los péptidos contenidos en distintos tipos de alimentos (Camafeita *et al.*, 1997). No obstante, estas técnicas requieren instrumentación compleja, equipamiento costoso, el equipo requiere instalaciones amplias, complejo proceso de elaboración de librerías de perfiles de espectros y compleja calibración del equipo.

Seguimiento de la dieta libre de gluten

Consecuencias clínicas específicas a largo plazo, como mortalidad, daño óseo, complicaciones neurológicas, asociaciones autoinmunes, etc., se han estudiado como efectos de la EC. Específicamente, se ha discutido la posibilidad de si, por un lado, estas complicaciones podrían ser modificadas por la DSG y, por otro lado, cómo de importante es el grado de adherencia a la dieta para obtener resultados favorables. Un estudio de

Italia sugirió una mortalidad notablemente más alta (5 veces mayor de lo esperado) en pacientes que no se adhirieron o se adhirieron parcialmente al DSG (Corrao *et al.*, 2001)

En consecuencia, una DSG puede conducir a una mejora significativa de los síntomas, la normalización de las medidas bioquímicas y un aumento en la calidad de vida en pacientes que informan síntomas al inicio del estudio. Aunque generalmente se acepta que todos los productos de trigo, centeno, cebada y algunas avenas deben evitarse estrictamente en la DSG, la relación entre la cantidad de gluten ingerida y el desarrollo de síntomas y anormalidades histológicas no está claramente definido y la cantidad exacta de gluten que las personas con EC pueden tolerar diariamente sin sufrir ningún efecto nocivo no se ha establecido completamente; en otros términos, es necesario comprender lo estricto que debe ser una DSG.

Sin embargo, varios estudios basados en biopsias intestinales han sugerido que las transgresiones de la dieta son relativamente frecuentes, estando entre el 36% y el 55% en las poblaciones estudiadas (Stoven *et al.*, 2012; Hall *et al.*, 2013; Matoori *et al.*, 2013). Sigue habiendo inquietudes acerca de la adherencia diaria a la DSG, que podría ser involuntaria o intencional, siendo esto la principal razón de EC mal controlada en pacientes adultos (Mahadev *et al.*, 2017). Así mismo, existe una parte de la población celíaca que no parece responder de manera positiva a la DSG y sufre síntomas de malabsorción persistente recurrente y atrofia de las vellosidades intestinales. Esta Población podría ser sospechosa de padecer EC refractaria, una enfermedad rara (aproximadamente el 5- 10% de los pacientes con EC) que aparece en los pacientes sin aparente respuesta positiva a la dieta libre de gluten (Rubio-Tapia y Murray, 2010b; Rishi *et al.*, 2016; Malamut y Cellier, 2019). Aunque esta enfermedad refractaria fue descrita en pacientes con supuesta ausencia total de ingesta de gluten, una cantidad de 50 mg de gluten puede producir síntomas y / o aumentar la enteropatía en pacientes con EC asintomática (El Khoury *et al.*, 2018), por lo que mantener un GFD de por vida es necesario para todos los pacientes (Husby y Bai, 2019) Por lo que, una herramienta precisa y rentable para controlar la recuperación de la mucosa, que evite la necesidad de endoscopias regulares en pacientes sintomáticos sigue siendo una necesidad.

Los anticuerpos anti-tTG y anti-DGP se usan comúnmente para evaluar el seguimiento de la EC (Ludvigsson *et al.*, 2018). Aunque se necesitan varios meses para que la serología específica de EC esté por debajo del nivel de corte normal, una disminución significativa en los niveles de serología durante el primer año sugiere adherencia a la dieta, y los pacientes con EC cuyas características serológicas no mejoran deben ser reevaluados en cuanto a su exposición al gluten (Husby y Bai, 2018).

Sin embargo, la negatividad de la serología no refleja el cumplimiento estricto de una DSG. En pacientes adultos, la serología de EC es un mal predictor de transgresiones dietéticas (Vahedi *et al.*, 2003). Aunque las pruebas de anticuerpos muestran una alta precisión para el diagnóstico de EC, estas pruebas no son tan confiables en el seguimiento, ya que tampoco se correlacionan bien con los hallazgos o síntomas histológicos. Es importante destacar que una serología negativa específica de EC en un paciente tratado no garantiza necesariamente la recuperación de la mucosa intestinal (Ludvigsson, 2012; Vahedi *et al.*, 2003). Otros marcadores han sido propuestos para el control de la dieta, como por ejemplo la prueba de permeabilidad (Duerksen *et al.*, 2005) o la calprotectina fecal (Ertekin *et al.*, 2010; Szaflarska-Popławska *et al.*, 2019). Estos métodos pueden demostrar que existen procesos inflamatorios, de tal manera que si sus valores se encuentran modificados puede ser como consecuencia tanto de enfermedades infecciosas, enfermedades inflamatorias intestinales o de procesos de alergia, lo que significa que no tienen por qué ser una medida del consumo directo de gluten. Igualmente, el cumplimiento de la dieta evaluado mediante entrevista ha sido sugerido como marcador de control de la EC por su bajo coste, su no invasividad, y su demostrada correlación con el daño intestinal. Sin embargo, son difícilmente estandarizables y la subjetividad no puede evitarse.

DetECCIÓN DE PÉPTIDOS INMUNOGENÉTICOS DEL GLUTEN (GIP)

Las pruebas tradicionales para monitorizar el cumplimiento de una DSG solo evalúan las consecuencias de las transgresiones de la dieta. Además, no pueden detectar la exposición ocasional al gluten, el cual puede impedir la recuperación total de la mucosa intestinal en el paciente celíaco (Sharkey *et al.*, 2013). El consumo diario total de gluten que podría ser crítico para la mayoría de los pacientes con EC es menor 50 mg de gluten (Hischenhuber *et al.*, 2006), y algunos pacientes necesitan tan solo 10 mg de gluten diario para desencadenar el desarrollo de anomalías en la mucosa intestinal (Akobeng y Thomas., 2008). Por lo tanto, existe la necesidad de herramientas precisas y no invasivas para controlar a los pacientes y evitar las consecuencias más graves.

La EC se activa por los péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) que son resistentes a la digestión gastrointestinal y pueden interactuar con el sistema inmune de los pacientes con EC para desencadenar una respuesta autoinmune contra tTG y otros antígenos. Shan *et al.* mostró mediante estudios *in vitro* e *in vivo* en ratas y humanos que un péptido de 33-mer de α 2-gliadina es estable frente a la digestión por todas las

endoproteasas. Este péptido se identificó como el iniciador primario de la respuesta inflamatoria al gluten en pacientes con EC (Shan *et al.*, 2002).

Para cuantificar el potencial tóxico del gluten en alimentos, dos anticuerpos monoclonales (AcMo) G12 y A1, fueron obtenidos frente al péptido inmunodominante 33-mer. La reactividad de estos anticuerpos se correlacionó con la inmunotoxicidad potencial de las proteínas analizadas y demostraron ser útiles en estudios sobre la desintoxicación enzimática del gluten. Estos anticuerpos mostraron una gran sensibilidad a los péptidos tóxicos (además del péptido de 33 meros) del trigo, centeno, cebada y variedades de avena (Morón *et al.*, 2008a; Morón *et al.*, 2008b). Un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas sándwich (ELISA), basado en AcMo G12 y A1, dio resultados muy prometedores para el análisis de gluten en una gama de muestras. Este método tenía un límite de detección de 0,6 ppm de gluten, 1/3 de la concentración obtenida por otros métodos descritos hasta la fecha. De manera similar, se desarrolló una prueba rápida para determinar la concentración, cualitativa o semicualitativa, de gluten en alimentos sólidos, bebidas y en superficies utilizando dispositivos de flujo lateral (LFD) con estos AcMo (Comino *et al.*, 2013; Halbmayr-Jech *et al.*, 2012), así como un método ELISA competitivo, basado en el anticuerpo G12, para la detección de péptidos tóxicos de gluten en alimentos hidrolizados (Comino *et al.*, 2013; Real *et al.*, 2014). En base a estas metodologías, se han propuesto nuevas herramientas para monitorizar la DSG mediante la determinación de GIP en muestras humanas.

Heces

Los inmunoensayos con G12 AcMo mostraron que más del 30% de los péptidos de gliadina inmunorreactivos persistieron intactos después de la hidrólisis durante la digestión gastrointestinal simulada *in vitro* (Comino *et al.*, 2012). En base a estos hallazgos, Comino *et al.* (2012) describió un método novedoso para controlar el DSG mediante la detección de GIP en heces mediante el uso del anticuerpo G12 [99]. Este estudio apoya la resistencia del 33-mer a la hidrólisis péptica-tripéptica-quimiotróptica *in vitro*; y, lo más significativo, se demostró que los epítotos tóxicos de gluten son medibles por AcMo en las heces de sujetos normales y pacientes con EC que reciben una dieta que contiene gluten. Se detectaron GIP en las heces de individuos sanos y pacientes con EC que recibieron dietas que contenían gluten, y GIP desapareció cuando se introdujo un DSG (Caminero *et al.*, 2012). Con las dietas que contenían cantidades variables de gluten, la excreción de GIP fue proporcional a la cantidad ingerida. Estas pruebas también podrían detectar diferencias cuando, estando en DSG, los sujetos fueron desafiados con cantidades conocidas de gluten oral (Auricchio, 2012).

Comino *et al.* (2016) demostró la utilidad clínica de este nuevo método de medición de GIP fecal como marcador de adherencia a DSG. En un ensayo clínico multicéntrico examinó prospectivamente el cumplimiento de la DSG de niños y adultos celíacos. Además, la respuesta a DSG se evaluó mediante cuestionario dietético, serología celíaca y respuesta clínica. Se investigaron las correlaciones entre GIP fecal y los métodos tradicionales para monitorizar la DSG. La detección de GIP en heces reveló las limitaciones de los métodos tradicionales para controlar la DSG en pacientes celíacos.

Un reciente estudio de Comino *et al.* (2019), evaluó la determinación de GIP en heces como marcador de adherencia a DSG en niños celíacos recién diagnosticados en un ensayo clínico prospectivo multicéntrico. Además, se comparó con los métodos tradicionales utilizados para evaluar la adherencia a DSG: revisión dietética del registro de alimentos de cuatro días y la serología celíaca (transglutaminasa tisular, tTG y anticuerpos peptídicos de gliadina desamidada, DGP). Se determinó, que la de GIP en heces pueden guiar el tratamiento de la enfermedad celíaca antes del diagnóstico y durante la evaluación de la adherencia a la dieta. Por lo tanto, el análisis de GIP en heces, es un método preciso y no invasivo que permite una evaluación directa y cuantitativa de la exposición al gluten poco después de la ingestión.

Orina

Una fracción proporcional del GIP absorbido en el tracto gastrointestinal llega a la circulación y se excreta en la orina (Ludvigsson y Green, 2011). La metodología propuesta por Moreno *et al.* (2017) basado en la prueba de gluten de orina puede ser útil en la práctica clínica como una herramienta de monitoreo para hacer un seguimiento del cumplimiento de la DSG. Los ensayos clínicos en orina basados en LFD se usan en muchas enfermedades. El acoplamiento de un lector a la LFD en orina de pacientes con EC podría proporcionar una medición cuantitativa de la infracción de la dieta, proporcionando ventajas significativas en el tratamiento de la DSG. Se ha demostrado una correlación positiva entre la cantidad de gluten ingerido y el GIP detectado en muestras de orina humana (Moreno *et al.*, 2017). Se detectaron GIP en muestras de orina 6–48 h después de la ingesta de gluten.

La metodología demostró el alto nivel de incumplimiento en pacientes con EC que supuestamente habían consumido DSG a largo plazo a través de la presencia de GIP. Estos resultados fueron consistentes con los informes que muestran que ~ 30% – 50% continúan con atrofia de la mucosa en pacientes con EC a pesar de seguir un DSG

(Matoori *et al.*, 2013; Tio *et al.*, 2012). Además, se demostró una correlación directa entre la ausencia de GIP en orina y la curación del epitelio intestinal intestinal (Figura 2) Además, el 100% de los pacientes adultos con mayor daño en el epitelio (Marsh II / III), según el análisis histológico, tenían GIP en orina.

El desarrollo de un biosensor de resonancia altamente sensible para la detección de GIP en orina por Soler *et al.* (2016) demostró que la metodología de detección permite una cuantificación rápida de GIP en orina mediante el uso de G12 moAb, alcanzando un límite de detección de 0,33 ng/ml. Por lo tanto, los biosensores ofrecen ventajas significativas sobre las técnicas convencionales que permiten el análisis bioquímico con excelente reproducibilidad y alta sensibilidad en cuestión de minutos.

REFERENCIAS

Akobeng, A.K., Heller, R.F. (2007). Assessing the population impact of low rates of breast feeding on asthma, coeliac disease and obesity: the use of a new statistical method. *Arch Dis Child*;92(6):483–5.

Akobeng, A.K.; Thomas, A.G. (2008) Systematic review: Tolerable amount of gluten for people with coeliac disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 27, 1044–1052.

Al-Bawardy, B., Codipilly, D.C., Rubio-Tapia, A., Bruining, D.H., Hansel, S.L., Murray, J.A. (2017). Celiac disease: a clinical review. *Abdom Radiol (NY)*;42(2):351-360.

Arentz-Hansen, H., Fleckenstein, B., Molberg, Ø., Scott, H., Koning, F., Jung, G., Roepstorff, P., Lundin, K.E., Sollid, L.M. (2004). The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med* 1: e1

Arentz-Hansen, H., Körner, R., Molberg, Ø., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y.M., Lundin, K.E.A., Koning, F., Roepstorff, P., Sollid, L.M., McAdam, S.N. (2000). The intestinal T cell response to α -gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med* 191:603–612

Arentz-Hansen, H., McAdam, S.N., Molberg, Ø., Fleckenstein, B, Lundin KE, Jorgensen TJ, Jung G, Roepstorff P, Sollid LM. (2002). Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* 123:803–809

Auricchio, S. (2012). An innovative approach to measure compliance to a gluten-free diet. *Am. J. Clin. Nutr.*, 95, 537–538.

Bethune, M.T, Khosla, C. (2008). Parallels between pathogens and gluten peptides in celiac sprue. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):e34.

Bethune, M.T., Khosla, C. (2012). Oral enzyme therapy for celiac sprue. *Methods Enzymol.*;502:241-71.

- Bodd, M., Kim, C.Y., Lundin, K.E., Sollid, L.M.** (2012). T-cell response to gluten in patients with HLA-DQ2.2 reveals requirement of peptide-MHC stability in celiac disease. *Gastroenterology* 142: 552–561
- Camafeita, E., Alfonso, P., Mothes, T., Méndez, E.** (1997). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometric micro-analysis: a non-immunological alternative attempt to quantify gluten gliadins in food samples. *J. Mass Spectrom.* 32:940-947.
- Caminero, A., Nistal, E., Arias, L., Vivas, S., Comino, I., Real, A., Sousa, C., de Morales, J.M., Ferrero, M.A., Rodríguez-Aparicio, L.B., Casqueiro, J.** (2012). A gluten metabolism study in healthy individuals shows the presence of faecal glutenase activity. *Eur. J. Nutr.*, 51, 293–299.
- Catassi, C., Gatti, S., Fasano, A.** (2014). The new epidemiology of celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*;59(Suppl 1):S7–9.
- Catassi, C.** (2005). El mapa mundial de la enfermedad celíaca. *Acta Gastroenterol. Latinoamer.* 35:46-55.
- Cerf-Bensussan, N., Matysiak-Budnik, T., Cellier, C., Heyman, M.** (2007). Oral proteases: a new approach to managing coeliac disease. *Gut* 56:157-160.
- Chmielewska, A., Piescik-Lech, M., Szajewska, H., Shamir, R.** (2015). Primary prevention of celiac disease: environmental factors with a focus on early nutrition. *Ann Nutr Metab.*;67(Suppl 2):43–50.
- Christophersen, A., Risnes, L.F., Dahal-Koirala, S., Sollid, L.M.** (2019). Therapeutic and Diagnostic Implications of T Cell Scarring in Celiac Disease and Beyond. *Trends Mol Med.*;25(10):836-852.
- Ciclitira, P.J., Evans, D.J., Fagg, N.L., Lennox, E.S., Dowling, R.H.** (1984). Clinical testing of gliadin fractions in coeliac patients. *Clin Sci (Lond)*;66(3):357-64.
- Comino, I., Fernández-Bañares, F., Esteve, M., Ortigosa, L., Castillejo, G., Fombuena, B., Ribes-Koninckx, C., Sierra, C., Rodríguez-Herrera, A., Salazar, J.C., Caunedo, Á., Marugán-Miguelsanz, J.M., Garrote, J.A., Vivas, S., Lo Iacono, O., Nuñez, A., Vaquero, L., Vegas, A.M., Crespo, L., Fernández-Salazar, L., Arranz, E., Jiménez-García, V.A., Montes-Cano, M.A., Espín, B., Galera, A., Valverde, J., Girón, F.J., Bolonio, M., Millán, A., Martínez Cerezo, F., Guajardo, C., Alberto, J.R., Rosinach, M., Segura, V., León, F., Marinich, J., Muñoz-Suano, A., Romero-Gómez, M., Cebolla, Á., Sousa, C.** (2016). Fecal Gluten Peptides Reveal Limitations of Serological Tests and Food Questionnaires for Monitoring Gluten-Free Diet in Celiac Disease Patients. *Am J Gastroenterol*; 111:1456–1465.
- Comino, I., Real, A., Vivas, S., Síglez, M.Á., Caminero, A., Nistal, E., Casqueiro, J., Rodríguez-Herrera, A., Cebolla, A., Sousa, C.** (2012). Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am J Clin Nutr*; 95:670–677.

- Comino, I., Segura, V., Ortigosa, L., Espín, B., Castillejo, G., Garrote, J.A., Sierra, C., Millán, A., Ribes-Koninckx, C., Román, E., Rodríguez-Herrera, A., Díaz, J., Silvester, J.A., Cebolla, Á., Sousa, C.** (2019). Prospective longitudinal study: use of faecal gluten immunogenic peptides to monitor children diagnosed with coeliac disease during transition to a gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther*; 49:1484–1492.
- Comino, I.; Real, A.; De Moreno, M.L.; Montes, R.; Cebolla, A.; Sousa, C.** (2013). Immunological determination of gliadin 33-mer equivalent peptides in beers as a specific and practical analytical method to assess safety for celiac patients. *J. Sci. Food Agric.*, 93, 933–943.
- Corrao, G., Corazza, G.R., Bagnardi, V., Brusco, G., Ciacci, C., Cottone, M., Sategna Guidetti, C., Usai, P., Cesari, P., Pelli, M.A., Loperfido, S., Volta, U., Calabró, A., Certo, M., Club del Tenue Study Group.** (2001). Club del Tenue Study Group. Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study. *Lancet*; 358(9279):356–61.
- Croese, J., Giacomini, P., Navarro, S., Clouston, A., McCann, L., Dougall, A., Ferreira, I., Susianto, A., O'Rourke, P., Howlett, M., McCarthy, J., Engwerda, C., Jones, D., Loukas, A.** (2015). Experimental hookworm infection and gluten microchallenge promote tolerance in celiac disease. *J Allergy Clin Immunol.*;135(2):508-16.
- Dicke, W.K., Weijers, H.A., Kamer, J.H.v.D.** (1953). Coeliac disease the presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatrica* 42:34-42.
- Donnelly, S.C., Ellis H.J., Ciclitira P.J.** (2011). Pharmacotherapy and management strategies for Expert Opin. *Pharmacother.* 12:1731-44.
- Doña, V., Urrutia, M., Bayardo, M., Alzogaray, V., Goldbaum, F.A., Chirido, F.G.** (2010). Single domain antibodies are especially suited for quantitative determination of gliadins under denaturing conditions. *J. Agric. Food Chem.* 58:918-926.
- Dørum, S., Bodd, M., Fallang, L.E., Bergseng, E., Christophersen, A., Johannesen, M.K., Qiao, S.W., Stammaes, J., de Souza, G.A., Sollid, L.M.** (2014). HLA-DQ molecules as affinity matrix for identification of gluten T cell epitopes. *J Immunol* 193:4497–4506
- Duerksen, D.R., Wilhelm-Boyles, C., Parry, D.M.** (2005). Intestinal permeability in long-term follow-up of patients with celiac disease on a gluten-free diet. *Dig. Des. Sci.* 50:785-790.
- El Khoury, D., Balfour-Ducharme, S., Joye, I.J.** (2018). A review on the gluten-free diet: technological and nutritional challenges. *Nutrients.* 10:E1410.
- Ertekin, V., Selimoğlu, M.A., Turgut, A., Bakan, N.** (2010). Fecal calprotectin concentration in celiac disease. *J. Clin. Gastroenterol.* 44:544-6.
- Escudero-Hernández, C., Peña, A., Bernardo, D.** (2016). Immunogenetic Pathogenesis of Celiac Disease and Non-celiac Gluten Sensitivity. *Curr Gastroenterol Rep*, 18, 36.
- Gass J, Khosla C.** (2007). Prolyl endopeptidases. *Cell Mol Life Sci.*;64(3):345-55.

- Gil-Humanes, J., Pistón, F., Tollefsen, S., Sollid, L.M., Barro, F.** (2010). Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107:17023-17028.
- Greco, L., Romino, R., Coto, I., Di Cosmo, N., Percopo, S., Maglio, M., Paparo, F., Gasperi, V., Limongelli, M.G., Cotichini, R., D'Agate, C., Tinto, N., Sacchetti, L., Tosi, R., Stazi, M.A.** (2002). The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*;50(5):624-8.
- Green, P.H., Jabri, B.** (2003). Coeliac disease. *Lancet* 362:383-391.
- Green, P.H.R., Krishnareddy, S., Lebwohl, B.** (2015). Clinical Manifestations of Celiac Disease. *Dig Dis*;33:137–140
- Halbmayer-Jech, E.; Hammer, E.; Fielder, R.; Coutts, J.; Rogers, A.; Cornish, M.** (2012). Characterization of G12 sandwich ELISA, a next-generation immunoassay for gluten toxicity. *J. AOAC Int.*, 95, 372–376.
- Hall, N.J., Rubin, G.P., Charnock, A.** (2013). Intentional and inadvertent non-adherence in adult coeliac disease. A cross-sectional survey. *Appetite*;68:56–62.
- Hardy, M.Y., Tye-Din, J.A., Stewart, J.A., Schmitz, F., Dudek, N.L., Hanchapola, I., Purcell, A.W., Anderson, R.P.** (2015). Ingestion of oats and barley in patients with celiac disease mobilizes cross-reactive T cells activated by avenin peptides and immune dominant hordein peptides. *J Autoimmun* 56:56–65
- Henterich, N., Osman, A.A., Méndez, E., Mothes, T.** (2003). Assay of gliadin by real-time immunopolymerase chain reaction. *Nahrung* 47:345-348.
- Hernández, M., Esteve, T., Pla, M.** (2005). Real-time polymerase chain reaction based assays for quantitative detection of barley, rice, sunflower, and wheat. *J. Agric. Food Chem.* 53:7003-7009.
- Hill, I.D.** (2005). What are the sensitivity and specificity of serologic tests for celiac disease? Do sensitivity and specificity vary in different populations? *Gastroenterol.* 128:S25-32
- Hischenhuber, C.; Crevel, R.; Jarry, B.; Mäki, M.; Moneret-Vautrin, D.A.; Romano, A.; Troncone, R.; Ward, R.** (2006). Review article: Safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2006, 23, 559–575.
- Husby, S., Bai, J.C.** (2019). Follow-up of Celiac Disease. *Gastroenterol Clin North Am*; 48:127–136.
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, IR., Mearin, M.L., Phillips, A., Shamir, R., Troncone, R., Giersiepen, K., Koninckx, C., Ventura, A., Zimmer, Branski, D., Catassi, C., Lelgeman, M., Maki, M., Ribes-icp,** (2012). European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 54:136-160.

- Keuning, J.J., Peña, A.S., van Leeuwen, A., van Hooff, J.P., va Rood, J.J.** (1976). HLA-DW3 associated with coeliac disease. *Lancet*;1(7958):506-8.
- Kooy-Winkelaar, Y., van Lumme, I.M., Moustakas, A.K., Schweizer, J., Mearin, M.L., Mulder, C.J., Roep, B.O., Drijfhout, J.W., Papadopoulos, G., van Bergen, J., Koning, F.** (2011). Gluten-specific T cells cross-react between HLA-DQ8 and the HLA-DQ2 α /DQ β transdimer. *J Immunol* 187:5123–5129
- Krishnareddy, S.** (2019) The Microbiome in Celiac Disease. *Gastroenterol Clin North Am*;48(1):115-126.
- Kupper, C.** (2005). Dietary guidelines and implementation for celiac disease. *Gastroenterol*. 128:S121-127.
- Liu, E., Lee, H.S., Aronsson, C.A., Hagopian, W.A., Koletzko, S., Rewers, M.J., Eisenbarth, G.S., Bingley, P.J., Bonifacio, E., Simell, V., Agardh, D., TEDDY Study Group.** (2014). Risk of pediatric celiac disease according to HLA haplotype and country. *N Engl J Med*;371(1):42–9.
- Ludvigsson, J.F., Ciacci, C., Green, P.H., Kaukinen, K., Korponay-Szabo, I.R., Kurppa, K., Murray, J.A., Lundin, K.E.A., Maki, M.J., Popp, A., Reilly, N.R., Rodriguez-Herrera, A., Sanders, D.S., Schuppan, D., Sleet, S., Taavela, J., Voorhees, K., Walker, M.M., Leffler, D.A.** (2018). Outcome measures in coeliac disease trials: the Tampere recommendations. *Gut*. 67:1410–24.
- Ludvigsson, J.F., Green, P.H.** (2011). Clinical management of coeliac disease. *J. Intern. Med*. 269:560-571.
- Ludvigsson, J.F., Leffler, D.A., Bai, J.C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P.H., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, C.P., Leonard, J.N., Lundin, K.E., Murray, J.A., Sanders, D.S., Walker, M.M., Zingone, F., Ciacci, C.** (2012). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*; 62(1):43-52.
- Ludvigsson, J.F., Murray, J.A.** (2019). Epidemiology of Celiac Disease. *Review Gastroenterol Clin North Am*;48(1):1-18.
- Mahadev, S., Murray, J.A., Wu, T.T., Chandan, V.S., Torbenson, M.S., Kelly, C.P., Maki, M., Green, P.H., Adelman, D., Lebwohl, B.** (2017). Factors associated with villus atrophy in symptomatic coeliac disease patients on a gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther* 45(8):1084–93.
- Malamut, G., Cellier, C.** (2019). Refractory Celiac Disease. *Gastroenterol Clin North Am*.;48(1):137-144.
- Malamut, G., Cellier, C.** (2015). Refractory celiac disease: epidemiology and clinical manifestations. *Dig Dis*.;33(2):221–6.

- Matoori, S., Fuhrmann, G., Leroux, J.C.** (2013). Celiac disease: A challenging disease for pharmaceutical scientists. *Pharm Res*; 30:619–626.
- Ménard, S., Lebreton, C., Schumann, M., Matysiak-Budnik, T., Dugave, C., Bouhnik, Y., Malamut, G., Cellier, C., Allez, M., Crenn, P., Schulzke, J.D., Cerf-Bensussan, N., Heyman, M.** (2012). Paracellular versus transcellular intestinal permeability to gliadin peptides in active celiac disease. *The American journal of pathology* 180, 608-615.
- Méndez, E., Vela, C., Immer, U., Janssen, F.W.** (2005). Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 17:1053-1063.
- Mitea, C., Kooy-Winkelaar, Y., van Veelen, P., de Ru, A., Drijfhout, J.W., Koning, F., Dekking L.** (2008). Fine specificity of monoclonal antibodies against celiac disease-inducing peptides in the gluteome. *Am. J. Clin. Nutr.* 88:1057-66.
- Mitea, C., Salentijn, E.M.J, van Veelen, P., Goryunova, S.V., van der Meer, I.M., van den Broeck, C., Mujico, J.R., Montserrat, V., Gilissen, L.J.W.J., Drijfhout, J.W., Dekking, L., Koning, F., Smulders, M.J.M.** (2010) A universal approach to eliminate antigenic properties of alpha-gliadin peptides in celiac disease. *PLoS One.* Dec 16;5(12):e15637
- Moreno, M.L., Cebolla, Á., Muñoz-Suano, A., Carrillo-Carrion, C., Comino, I., Pizarro, Á., León, F., Rodríguez-Herrera, A., Sousa, C.** (2017). Detection of gluten immunogenic peptides in the urine of patients with coeliac disease reveals transgressions in the gluten-free diet and incomplete mucosal healing. *Gut*; 66:250–257.
- Morón, B., Bethune, M.T., Comino, I., Manyani, H., Ferragud, M., López, M.C., Cebolla, A., Khosla, C., Sousa, C.** (2008b). Toward the assessment of foodtoxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. *PLoS One* 3:e2294.
- Morón, B., Cebolla, A., Manyani, H., Alvarez-Maqueda, M., Megías, M., Thomas, M. del C., López, M.C., Sousa, C.** (2008a). 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.* 87:405-414.
- Mustalahti, K., Catassi, C., Reunanen, A., Fabiani, E., Heier, M., McMillan, S., Murray, L., Metzger, M.H., Gasparin, M., Bravi, E., Mäki, M., Coeliac EU Cluster, Project Epidemiology.** (2010). The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project. *Ann Med*;42(8):587-95.
- Osman, A.A., Uhlig, H.H., Valdes, I., Amin, M., Méndez, E., Mothes, T.** (2001). A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13:1189-1193.

- Petersen, J., Kooy-Winkelaar, Y., Loh, K.L., Tran, M., van Bergen, J., Koning, F., Rossjohn, J., Reid, H.H.** (2016). Diverse T cell receptor gene usage in HLA-DQ8-associated celiac disease converges into a consensus binding solution. *Structure* 24:1643–1657
- Qiao, S.W., Bergseng, E., Molberg, Ø., Jung, G., Fleckenstein, B., Sollid, L.M.** (2005). Refining the rules of gliadin T cell epitope binding to the disease-associated DQ2 molecule in celiac disease: importance of proline spacing and glutamine deamidation. *J Immunol* 175:254–261.
- Qiao, S.W., Sollid, L.M.** (2019). Two novel HLA-DQ2.5-restricted gluten Tcell epitopes in the DQ2.5-glia-γ4 epitope family. *Immunogenetics*; 71(10):665-667.
- Qiao, S.W., Iversen, R., Raki, M., Sollid, L.M.** (2012). The adaptive immune response in celiac disease. *Semin Immunopathol* 34, 523-540.
- Raki, M., Tollefsen, S., Molberg, o., Lundin, K.E. Sollid, L.M., Jahnsen, F.L.** (2006). A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells. *Gastroenterol.* 131:711-720.
- Real, A.; Comino, I.; Moreno Mde, L.; López-Casado, M.Á.; Lorite, P.; Torres, M.I.; Cebolla, Á.; Sousa, C.** (2014). Identification and in vitro reactivity of celiac immunoactive peptides in an apparent gluten-free beer. *PLoS ONE*, 9, e100917.
- Riestra, S.** (2008). Enfermedades asociadas. Polanco I.(ed.) en Libro blanco de la Enfermedad Celiaca, Madrid, España, pp. 41-49.
- Rishi, A.R., Rubio-Tapia, A., Murray, J.A.** (2016). Refractory celiac disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016;10(4):537-46.
- Rubin, C. E., Brandborg, L.L., Flick, A.L., Phelps, P., Parmentier, C., Van Niel, S.** (1962). Studies of celiac sprue. III. The effect of repeated wheat instillation into the proximal ileum of patients on a gluten free diet. *Gastroenterology.* 43:621-41.
- Rubio-Tapia, A., Murray, J.A.** (2010a) Celiac disease. *Curr Opin Gastroenterol*; 26:116–22.
- Rubio-Tapia, A., Murray, J.A.** (2010b). Classification and management of refractory coeliac disease. *Gut* 59:547-557.
- Sakula, J., Shiner, M.** (1957). Coeliac disease with atrophy of the small-intestine mucosa. *Lancet.* 273:876-7.
- Saulnier, D.M., Ringel, Y., Heyman, M.B., Foster, J.A., Bercik, P., Shulman, R.J., Versalovic, J., Verdu, E.F., Dinan, T.G., Hecht, G., Guarner, F.** (2013). The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut Microbes.*;4(1):17-27.

- Schalk, K., Lexhaller, B., Koehler, P., Scherf, K.A.** (2017). Isolation and characterization of gluten protein types from wheat, rye, barley and oats for use as reference materials. *PLoS One*;12(2):e0172819.
- Sealey-Voyksner, J.A., Khosla, C., Voyksner, R.D., Jorgenson, J.W.** (2010). Novel aspects of quantitation of immunogenic wheat gluten peptides by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217:4167-4183.
- Serena, G., Camhi, S., Sturgeon, C., Yan, S., Fasano, A.** (2015). The role of gluten in celiac disease and type 1 diabetes. *Nutrients*;7(9):7143–62.
- Serena, G., Lima, R., Fasano, A.** (2019). Genetic and Environmental Contributors for Celiac Disease. *Curr Allergy Asthma Rep*;19(9):40.
- Shan, L., Molberg, O., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, Sollid, L.M., Khosla, C.** (2002). Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 297:2275-2279.
- Sharkey, L.M.; Corbett, G.; Currie E Lee, J.; Sweeney, N.; Woodward, J.M.** (2013). Optimising delivery of care in coeliac disease -comparison of the benefits of repeat biopsy and serological follow-up. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 38, 1278–1291.
- Shewry, Halford, N.G.** (2002). Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Bot.* 53:947-958.
- Shewry, P.R., Parmar, S., Field, J.M.** (1988). Two-dimensional electrophoresis of cereal prolamins: applications to biochemical and genetic analyses. *Electrophoresis* 9:727-737.
- Singh, P., Arora, A., Strand, T.A., Leffler, D.A., Catassi, C., Green, P.H., Kelly, C.P., Ahuja, V., Makharia, G.K.** (2018). Global prevalence of celiac disease: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*; 16:823–36.e2.
- Sjöström, H., Lundin, K.E.A., Molberg, Ø., Körner, R., McAdam, S.N., Anthonsen, D., Quarsten, H., Noren, O., Roepstorff, P., Thorsby, E., Sollid, L.M.** (1998). Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal Tcell recognition. *Scand J Immunol* 48:111–115.
- Soler, M.; Estevez, M.C.; de Moreno, M.L.; Cebolla, A.; Lechuga, L.M.** (2016). Label-free SPR detection of gluten peptides in urine for non-invasive celiac disease follow-up. *Biosens. Bioelectron.*, 79, 158–164.
- Sollid, L.M., Qiao, S.W., Anderson, R.P., Gianfrani, C., Koning, F.** (2012). Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics.*;64(6):455-60.
- Sollid, L.M., Tye-Din, J.A., Qiao, S.W., Anderson, R.P., Gianfrani, C., Koning, F.** (2020). Update 2020: nomenclature and listing of celiac disease-relevant gluten epitopes recognized by CD4(+) T cells. *Immunogenetics.*;72(1-2):85-88.

- Sollid, L.M., Jabri, B.** (2013). Triggers and drivers of autoimmunity: lessons from coeliac disease. *Nature reviews. Immunology* 13, 294-302
- Sollid, L.M.** (2002). Celiac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat. Rev. Sollid, Immunol.* 2:647-655.
- Sollid, L.M., Khosla, C.** (2011). Novel therapies for coeliac disease. *J. Intern. Med.* 269:604-613.
- Spaenij-Dekking, E.H., Kooy-Winkelaar, E.M., Nieuwenhuizen, W.F., Drijfhout, J.W., Koning, F.** (2004). A novel and sensitive method for the detection of T cell stimulatory epitopes of alpha/beta- and gamma-gliadin. *Gut* 53:1267-1273.
- Stepniak, D., Vader, L.W., Kooy, Y., van Veelen, P.A., Moustakas, A., Papandreou, N.A., Eliopoulos, E., Drijfhout, J.W., Papadopoulos, G.K., Koning, F.** (2005). T-cell recognition of HLA-DQ2-bound gluten peptides can be influenced by an N-terminal proline at p-1. *Immunogenetics* 57:8–15.
- Stepniak, D., Koning, F.** (2006). Celiac disease-sandwiched between innate and adaptive immunity. *Human. Immunol.* 67:460-468.
- Stern, M., Ciclitira, P.J., van Eckert, R., Feighery, C., Janssen, F.W., Méndez, E., Mothes, T., Troncone, R., Wieser, H.** (2001). Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 13:741-747.
- Stokes PL, Asquith P, Holmes GK, Mackintosh P, Cooke WT.** (1972) Histocompatibility antigens associated with adult coeliac disease. *Lancet*;2(7769):162-4.
- Stoven, S., Murray, J.A., Marietta, E.** (2012). Celiac Disease: advances in treatment via gluten modification. *Clin Gastroenterol Hepatol*; 10:859–862.
- Szaflarska-Popławska, A., Romańczuk, B., Parzęcka, M.** (2020). Faecal calprotectin concentration in children with coeliac disease. *Gastroenterology Rev*; 15 (1): 44–47
- Tio, M., Cox, M.R., Eslick, G.D.** (2012). Meta-analysis: Coeliac disease and the risk of all-cause mortality, any malignancy and lymphoid malignancy. *Aliment Pharmacol Ther*; 35:540–551
- Tollefsen, S., Arentz-Hansen, H., Fleckenstein, B., Molberg, Ø., Ráki, M., Kwok, W.W., Jung, G., Lundin, K.E., Sollid, L.M.** (2006). HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *J Clin Invest* 116:2226–2236.
- Tye-Din, J.A., Stewart, J.A., Dromey, J.A., Beissbarth, T., van Heel, D.A., Tatham, A., Henderson, K., Mannering, S.I., Gianfrani, C., Jewell, D.P., Hill, A.V., McCluskey, j., Rossjohn, J., Anderson, R.P.** (2010). Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci. Transl. Med.* 2:41 ra51.

Vader, L.W., Stepniak, D.T., Bunnik, E.M., Kooy, Y.M., de Haan, W., Drijfhout, J.W., van Veelen, P.A., Koning, F. (2003). Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology* 125:1105–1113.

Vader, W., Kooy, Y., van Veelen, P., de Ru, A., Harris, D., Benckhuijsen, W., Pena, S., Mearin, L., Drijfhout, J.W., Koning, F. (2002). The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* 122:1729–1737.

Vahedi, K., Mascart, F., Mary, J.Y., Laberrenne, J.E., Bouhnik, Y., Morin, M.C., Ocmant, A., Velly, C., Colombel, J.F., Matuchansky, C. (2003). Reliability of antitransglutaminase antibodies as predictors of glutenfree diet compliance in adult celiac disease. *AmJ G.* 98:1079–1087.

van de Wal, Y., Kooy, Y.M., van Veelen, P., Vader, W., August, S.A., Drijfhout, J.W., Pena, S.A., Koning, F. (1999). Glutenin is involved in the glutendriven mucosal T cell response. *Eur J Immunol* 29:3133–3139.

van deWal, Y., Kooy, Y.M., van Veelen, P.A., Pena, S.A., Mearin, L.M., Molberg, Ø., Lundin, K.E.A., Sollid, L.M., Mutis, T., Benckhuijsen, W.E., Drijfhout, J.W., Koning, F. (1998). Small intestinal T cells of celiac disease patients recognize a natural pepsin fragment of gliadin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:10050–10054.

van Heel, D.A., Franke, L., Hunt, K.A., Gwilliam, R., Zhernakova, A., Inouye, M., Wapenaar, M.C., Barnardo, M.C., Bethel, G., Holmes, G.K., Feighery, C., Jewell, D., Kelleher, D., Kumar, P., Travis, S., Walters, J.R., Sanders, D.S., Howdle, P., Swift, J., Playford, R.J., McLaren, W.M., Mearin, M.L., Mulder, C.J., McManus, R., McGinnis, R., Cardon, L.R., Deloukas, P., Wijmenga, C. (2007). A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring 1L2 and 1L21. *Nat. Genet.* 39:827-829.

Wieser, H. (1995). The precipitating factor in Celiac-Disease. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 9:191- 207.

Wolf, J., Petroff, D., Richter, T., Auth, M.K.H., Uhlig, H.H., Laass, M.W., Lauenstein, P., Krahl, A., Händel, N., de Laffolie, J., Hauer, A.C., Kehler, T., Flemming, G., Schmidt, F., Rodrigues, A., Hasenclever, D., Mothes, T. (2017). Validation of Antibody-Based Strategies for Diagnosis of Pediatric Celiac Disease Without Biopsy. *Gastroenterology.*;153(2):410-419.e17.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES DEL TEMA Y OBJETIVOS

Las patologías relacionadas con el gluten han surgido como un fenómeno epidemiológicamente relevante en los últimos años con una prevalencia global entorno al 5%. Se caracterizan por vías patogénicas particulares, sin embargo, comparten manifestaciones clínicas, lo que dificulta su diagnóstico diferencial. Se han sugerido numerosos factores responsables del incremento en estas patologías tales como una creciente demanda de productos elaborados con trigo en países donde no se cultiva este cereal, el desarrollo de técnicas de horneado industrial que minimizan el tiempo de fermentación (Gobbetti et al. 2007), o el aumento en la producción de variedades de trigo modernas con una mayor cantidad de epítomos inmunogénicos (Belderok 2000).

Entre los trastornos relacionados con el gluten, la enfermedad celíaca (EC) es la más conocida hasta la fecha y es capaz de producir un infiltrado de linfocitos a nivel intraepitelial y una hiperplasia de criptas con distintos grados de atrofia de las vellosidades intestinales. Su patogenia involucra dos clases de péptidos tóxicos: aquellos capaces de inducir un cambio en la mucosa, mediante mecanismos inflamatorios e innatos y; otros que generan la respuesta adaptativa. Estos péptidos o epítomos se han encontrado tanto en las α -, γ - y ω -gliadinas de trigo, como en las gluteninas de bajo y alto peso molecular. Dos de ellos son los contribuyentes principales de la inmunogenicidad del gluten y se encuentran en el péptido 33-mer de las α -gliadinas (Mitea et al., 2010; Sollid et al., 2012; Soler et al., 2016; Caio et al., 2019). No obstante, la toxicidad final del trigo es el resultado sus epítomos canónicos y de las variantes de esos epítomos que se encuentran presentes en mayor o menor grado en las secuencias de las proteínas del gluten. Por tanto, es importante el estudio y caracterización de estos epítomos canónicos, así como, de sus variantes con sustituciones naturales, ya que dichas sustituciones podrían contribuir aumentando, reduciendo o suprimiendo la respuesta inmunogénica al gluten.

El único tratamiento para la EC implica una estricta adherencia a una dieta sin gluten (DSG) durante toda la vida con el fin de eliminar los síntomas y alcanzar la recuperación de la mucosa. Sin embargo, lograr la plena adherencia a la dieta no es fácil dada la ubicuidad del gluten en los alimentos, y a sus implicaciones sociales y económicas (Bernardo et al., 2012, Al-Bawardy et al., 2017, Caio et al., 2019). Varios estudios han demostrado que al menos un tercio de los pacientes con EC no se adhieren completamente a una DSG (Barratt et al., 2011; Matoori et al., 2013; Comino et al., 2016; Moreno et al., 2017), lo que puede conducir a largo plazo a un deterioro en la calidad de vida y, a complicaciones como el empeoramiento de la mala absorción, anemia,

osteoporosis e incluso un mayor riesgo de desarrollo de cáncer a nivel gastrointestinal (Malamut *et al.*, 2013; Husby *et al.*, 2019; Lenti *et al.*, 2019).

Las herramientas actuales para el control de la DSG están basadas en serología, sintomatología, entrevistas o encuestas dietéticas. Sin embargo, ninguna de estas herramientas ofrece una medida precisa sobre las transgresiones dietéticas y la adherencia a la dieta. En contraste, la biopsia duodenal es el estándar de oro para el diagnóstico de la EC, pero es una técnica invasiva y cara por lo que no es recomendada para usarla de manera rutinaria para el seguimiento de la DSG (Sharkey *et al.*, 2013, Ludvigsson *et al.*, 2014; Silvester *et al.*, 2017; Husby *et al.*, 2019).

El desarrollo de nuevas técnicas de monitorización de la DSG no invasivas, precisas y fiables podría mejorar la identificación de pacientes celíacos que están expuestos regularmente al gluten (voluntaria o involuntariamente). A este respecto, los anticuerpos monoclonales, G12 y A1 (Morón *et al.*, 2008a; 2008b), se han utilizado en el desarrollo de inmunoensayos con capacidad de detección de péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) en muestras de heces y orina para la detección del consumo inadvertido de gluten y detectar casos de transgresiones en la dieta. Estos métodos ayudan a identificar el origen de síntomas clínicos y evitar las complicaciones derivadas de la ingesta de gluten (anemia, osteoporosis, incremento de los riesgos de linfoma, etc). A diferencia de los tradicionales, que sólo evalúan las consecuencias de las transgresiones dietéticas, estos métodos no invasivos permiten una evaluación directa y cuantitativa de la exposición al gluten. Por ello, tiene una importancia trascendental en el seguimiento de la EC la validación clínica de estas nuevas herramientas (Comino *et al.*, 2012; Comino *et al.*, 2016; Comino *et al.*, 2019; Moreno *et al.*, 2017; Silvester *et al.*, 2019)

En base a estos antecedentes, el OBJETIVO GENERAL de esta Tesis Doctoral ha sido el estudio de nuevas estrategias de control de la enfermedad celíaca, por un lado, mediante la caracterización de péptidos y epítomos inmunogénicos del gluten en diversas variedades de trigos comerciales; y por el otro, mediante la validación clínica de un biomarcador para el seguimiento del paciente celíaco. Este Objetivo fue desarrollado en los siguientes OBJETIVOS CONCRETOS:

1. Estudio bibliográfico de las principales patologías asociadas con la ingesta de cereales como son la EC, la alergia al trigo (AT) y la sensibilidad al gluten no celíaca (SGNC) en los cuales el seguimiento de una dieta con exclusión del gluten es el tratamiento común para aliviar los síntomas y evitar complicaciones a largo plazo.
2. Determinación del potencial inmunotóxico de las α -gliadinas en especies de trigo cultivado diploides, tetraploides y hexaploides. Estudio de la abundancia de las variantes

de los epítomos tóxicos en las secuencias de α -gliadinas y análisis de su capacidad estimuladora mediante anticuerpos monoclonales y ensayos de proliferación celular en cultivo de linfocitos T de pacientes celíacos.

3. Realización de un ensayo clínico prospectivo en pacientes celíacos en seguimiento para establecer la utilidad clínica de la determinación de GIP en orina como nuevo biomarcador del cumplimiento de la DSG, analizando los siguientes parámetros:

a. Correlación entre la determinación de GIP en orina y la presencia de sintomatología, niveles de anticuerpos relacionados con la EC y cuestionarios dietéticos.

b. Utilidad de la determinación de GIP en orina como biomarcador capaz de predecir el grado de lesión histológica.

REFERENCIAS

Al-Bawardy, B., Codipilly, D.C., Rubio-Tapia, A., Bruining, D.H., Stephanie, L., Hansel Joseph, A. (2017). Murray. Celiac disease: a clinical review. *Abdom Radiol*; 42:351–360

Barratt, S.M., Leeds, J.S., Sanders, D.S. (2011). Quality of life in coeliac disease is determined by perceived degree of difficulty adhering to a gluten-free diet, not the level of dietary adherence ultimately achieved. *J Gastrointest Liver Dis*; 20:241–5.

Belderok, B. (2000). Developments in bread-making processes. *Plant Foods Hum Nutr.*;55(1):1-86.

Bernardo, D., Peña, A.S. (2012). Developing strategies to improve the quality of life of patients with gluten intolerance in patients with and without coeliac disease. *Eur J Intern Med*; 23:6–8.

Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D.A., De Giorgio, R., Catassi, C., Fasano, A. (2019). Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med*; 17:1–20.

Comino, I., Real, A., Vivas, S., Síglez, M.Á., Caminero, A., Nistal, E., Casqueiro, J., Rodríguez-Herrera, A., Cebolla, A., Sousa, C. (2012). Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am J Clin Nutr*; 95:670–677.

Comino, I., Segura, V., Ortigosa, L., Espín, B., Castillejo, G., Garrote, J.A., Sierra, C., Millán, A., Ribes-Koninckx, C., Román, E., Rodríguez-Herrera, A., Díaz, J., Silvester, J.A., Cebolla, Á., Sousa, C. (2019). Prospective longitudinal study: use of faecal gluten immunogenic peptides to monitor children diagnosed with coeliac disease during transition to a gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther*; 49:1484–1492.

Comino, I., Fernández-Bañares, F., Esteve, M., Ortigosa, L., Castillejo, G., Fombuena, B., Ribes-Koninckx, C., Sierra, C., Rodríguez-Herrera, A., Salazar, J.C., Caunedo, Á., Marugán-Miguelsanz, J.M., Garrote, J.A., Vivas, S., Lo Iacono, O., Nuñez, A., Vaquero, L., Vegas, A.M., Crespo, L., Fernández-Salazar, L., Arranz, E., Jiménez-García, V.A., Montes-Cano, M.A., Espín, B., Galera, A., Valverde, J., Girón, F.J., Bolonio, M., Millán, A., Martínez Cerezo, F., Guajardo, C., Alberto, J.R., Rosinach, M., Segura, V., León, F., Marinich, J., Muñoz-Suano, A., Romero-Gómez, M., Cebolla, Á., Sousa, C. (2016). Fecal Gluten Peptides Reveal Limitations of Serological Tests and Food Questionnaires for Monitoring Gluten-Free Diet in Celiac Disease Patients. *Am J Gastroenterol*; 111:1456–1465.

Gobbetti, M., Giuseppe Rizzello, C., Di Cagno, R., De Angelis, M. (2007). Sourdough lactobacilli and celiac disease. *Food Microbiol. Apr*;24(2):187-96.

Husby, S., Murray, J.A., Katzka, D.A. (2019). AGA Clinical Practice Update on Diagnosis and Monitoring of Celiac Disease Changing Utility of Serology and Histologic Measures: Expert Review. *Gastroenterology*; 156:885–889.

Lenti, M.V., Biagi, F., Lucioni, M., Sabatino, A.D., Paulli, M., Corazza, G.R. 2019. Two cases of monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma associated with coeliac disease *Case Reports Scand J Gastroenterol*; 54(8):965-968

Ludvigsson, J.F., Bai, J.C., Biagi, F., Card, T.R., Ciacci, C., Ciclitira, P.J., Green, P.H., Hadjivassiliou, M., Holdaway, A., van Heel, D.A., Kaukinen, K., Leffler, D.A., Leonard, J.N., Lundin, K.E.A., McGough, N., Davidson, M., Murray, J.A., Swift, G.L., Walker, M.M., Zingone, F., Sanders, D.S., BSG Coeliac Disease Guidelines Development Group; British Society of Gastroenterology. (2014). Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British society of gastroenterology. *Gut*; 63:1210–28.

Malamut, G., Chandesris, O., Verkarre, V., Meresse, B., Callens, C., Macintyre, E., Bouhnik, Y., Gornet, J.M., Allez, M., Jian, R., Berger, A., Châtellier, G., Brousse, N., Hermine, O., Cerf-Bensussan, N., Cellier, C. (2013) Enteropathy associated T cell lymphoma in celiac disease: a large retrospective study. *Dig Liver Dis*; 45(5):377-384

Matoori, S., Fuhrmann, G., Leroux, J.C. (2013). Celiac disease: A challenging disease for pharmaceutical scientists. *Pharm Res*; 30:619–626.

Mitea, C., Salentijn, E.M.J, van Veelen, P., Goryunova, S.V., van der Meer, I.M., van den Broeck, C., Mujico, J.R., Montserrat, V., Gilissen, L.J.W.J., Drijfhout, J.W., Dekking, L., Koning, F., Smulders, M.J.M. (2010) A universal approach to eliminate antigenic properties of alpha-gliadin peptides in celiac disease. *PLoS One. Dec* 16;5(12):e15637

Moreno, M.L., Cebolla, Á., Muñoz-Suano, A., Carrillo-Carrion, C., Comino, I., Pizarro, Á., León, F., Rodríguez-Herrera, A., Sousa, C. (2017). Detection of gluten immunogenic peptides in the urine of patients with coeliac disease reveals transgressions in the gluten-free diet and incomplete mucosal healing. *Gut*; 66:250–257.

Morón, B., Bethune, M.T., Comino 1., Manyani, H., Ferragud, M., López, M.C., Cebolla, A., Khosla, C., Sousa, C. (2008b). Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. *PLoS ONE*; 3:e2294.

Morón, B., Cebolla, A., Manyani, H., Álvarez-Maqueda, M., Megias, M., Thomas, M. del C., López, M.C., Sousa, C. (2008a). 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*; 87:405-414.

Sharkey, L.M., Corbett, G., Currie, E., Lee, J., Sweeney, N., Woodward, J.M. (2013). Optimising delivery of care in coeliac disease - Comparison of the benefits of repeat biopsy and serological follow-up. *Aliment Pharmacol Ther*; 38:1278–1291.

Silvester JA, Comino I, Kelly CP, Sousa C, Duerksen DR; DOGGIE BAG Study Group. (2019). Most Patients With Celiac Disease on Gluten-Free Diets Consume Measurable Amounts of Gluten. *Gastroenterology*. Apr;158(5):1497-1499.e1.

Silvester, J.A., Kurada, S., Szwajcer, A., Kelly, C.P., Leffler, D.A., Duerksen, D.R. (2017). Tests for Serum Transglutaminase and Endomysial Antibodies Do Not Detect Most Patients with Celiac Disease and Persistent Villous Atrophy on Gluten-free Diets: a Meta-analysis. *Gastroenterology*; 153:689–701.e1.

Soler, M., Estevez, M.C., Moreno, M.L., Cebolla, A., Lechuga, L.M. (2016). Label-free SPR detection of gluten peptides in urine for non-invasive celiac disease follow-up. *Biosens Bioelectron*; 79:158–164.

Sollid, L.M., Qiao, S.W., Anderson, R.P., Gianfrani, C., Koning, F. (2012). Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics*; 64(6):455-460.

CAPÍTULO 3. DIETA SIN GLUTEN Y PATOLOGÍAS ASOCIADAS AL GLUTEN

Gluten-free Diet and Gluten-related Disorders

Isabel Comino, Ángela Ruiz-Carnicer, Carolina Sousa

Department of Microbiology and Parasitology, University of Seville, Seville, Spain

Nova Science Publishers (2017); 1:93-111

ISBN: 978-1-53610-386-1

CAPÍTULO 4. POTENCIAL INMUNOGÉNICO DE VARIANTES DE EPÍTOPOS DE α -GLIADINA DE ESPECIES DE TRIGOS

Celiac Immunogenic Potential of α -Gliadin Epitope Variants from Triticum and Aegilops
Species



**Ángela Ruiz-Carnicer ¹, Isabel Comino ¹, Verónica Segura ¹, Carmen V. Ozuna ², María de Lourdes Moreno ¹, Miguel Ángel López-Casado ³, María Isabel Torres ⁴, Francisco Barro ²
and Carolina Sousa ¹**

¹Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain. ²Departamento de Mejora Genética Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC) 14004 Córdoba, Spain. ³Departamento de Gastroenterología pediátrica, Hospital Virgen de las Nieves, 18014 post code Granada, Spain. ⁴Departamento de Biología Experimental, Campus Universitario Las Lagunillas, 23071 post code Jaén, Spain.

Nutrients 2019; 11,220

Article

Celiac Immunogenic Potential of α -Gliadin Epitope Variants from *Triticum* and *Aegilops* Species

Ángela Ruiz-Carnicer ¹, Isabel Comino ¹, Verónica Segura ¹, Carmen V. Ozuna ²,
María de Lourdes Moreno ¹, Miguel Ángel López-Casado ³, María Isabel Torres ⁴,
Francisco Barro ² and Carolina Sousa ^{1,*}

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 41012 Sevilla, Spain; acarnicer@us.es (Á.R.-C.); icomino@us.es (I.C.); vsegura@us.es (V.S.); lmoreno@us.es (M.d.L.M.)

² Departamento de Mejora Genética Vegetal, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), 14004 Córdoba, Spain; carmen.ozuna@eez.csic.es (C.V.O.); fbarro@ias.csic.es (F.B.)

³ Departamento de Gastroenterología pediátrica, Hospital Virgen de las Nieves, 18014 Granada, Spain; drlopezcasado@digestivointegral.es

⁴ Departamento de Biología Experimental, Campus Universitario Las Lagunillas, 23071 Jaén, Spain; mitorres@ujaen.es

* Correspondence: csoumar@us.es; Tel.: +34-954-556-452

Received: 28 December 2018; Accepted: 17 January 2019; Published: 22 January 2019



Abstract: The high global demand of wheat and its subsequent consumption arise from the physicochemical properties of bread dough and its contribution to the protein intake in the human diet. Gluten is the main structural complex of wheat proteins and subjects affected by celiac disease (CD) cannot tolerate gluten protein. Within gluten proteins, α -gliadins constitute the most immunogenic fraction since they contain the main T-cell stimulating epitopes (DQ2.5-glia- α 1, DQ2.5-glia- α 2, and DQ2.5-glia- α 3). In this work, the celiac immunotoxic potential of α -gliadins was studied within Triticeae: diploid, tetraploid, and hexaploid species. The abundance and immunostimulatory capacity of CD canonical epitopes and variants (with one or two mismatches) in all α -gliadin sequences were determined. The results showed that the canonical epitopes DQ2.5-glia- α 1 and DQ2.5-glia- α 3 were more frequent than DQ2.5-glia- α 2. A higher abundance of canonical DQ2.5-glia- α 1 epitope was found to be associated with genomes of the BBAADD, AA, and DD types; however, the abundance of DQ2.5-glia- α 3 epitope variants was very high in BBAADD and BBAA wheat despite their low abundance in the canonical epitope. The most abundant substitution was that of proline to serine, which was disposed mainly on the three canonical DQ2.5 domains on position 8. Interestingly, our results demonstrated that the natural introduction of Q to H at any position eliminates the toxicity of the three T-cell epitopes in the α -gliadins. The results provided a rational approach for the introduction of natural amino acid substitutions to eliminate the toxicity of three T-cell epitopes, while maintaining the technological properties of commercial wheats.

Keywords: celiac disease; α -gliadin; 33-mer; DQ2.5-glia- α 1; DQ2.5-glia- α 2; DQ2.5-glia- α 3 epitopes; wheat species

1. Introduction

Wheat is one of the most widely cultivated cereals in the world and constitutes a major source of energy, protein, and fiber in the diet. Increasing global demand for wheat and its subsequent consumption, with an annual production of about 750 million tons, is due to its unique viscoelastic properties for its inclusion in food products and to industrialization and westernization [1–3]. The wheat group has evolved through allopolyploidization, that is, through hybridization between

species from the genera *Aegilops* and *Triticum* followed by genome doubling [4]. Genetic studies have provided valuable information regarding which wild cereal species are the relatives of modern domesticated cereals, and which geographical wild plant produced the domesticated forms that are used in food production today [5]. The diploid wild wheat that was first domesticated is thought to have been *Triticum monococcum* ($A^m A^m$), which is still growing in some parts of the world both for animal feed and human consumption. Wheats with more than one genome are known as polyploid wheats. The AA genome of the tetraploid wheats is closely similar to that of *T. urartu*, and the BB genome is related to *Aegilops speltoides* (BB). The wild tetraploid, formed after the hybridization, was designated as *Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides* (wild emmer; BBAA), and the first domesticated tetraploid was *T. turgidum* ssp. *dicoccum* (cultivated emmer; BBAA), from which, the cultivated *T. turgidum* ssp. *durum* has evolved. The hexaploid wheat, *Triticum aestivum* ssp. *aestivum* (BBAADD), consists of three genomes designated A, B, and D. The A and B genomes of hexaploid wheats come from the A and B genomes of tetraploid wheat. The hexaploid wheats resulted from the hybridization of cultivated emmer and a wild grass species identified as *Aegilops tauschii* (DD), followed by polyploid formation which gave rise to a new species that has three genomes designated BBAADD [6,7]. The main wheat species grown throughout the world is the hexaploid *T. aestivum*, usually called “common” or “bread” wheat. In terms of total production, the next variety in importance is the tetraploid durum or macaroni wheat (*T. turgidum* L. subsp. *durum* Desf.). This is adapted to hot dry climates and is widely used for the production of pasta. Common wheat species account for nearly 94% of the total production, with durum wheat representing 5%, and other wheat forms about 1% [6,8].

Although wheat has always been recognized as a fundamental food, this cereal cannot be tolerated by certain individuals since it is responsible for significant pathologies, called gluten-related disorders, such as celiac disease (CD), wheat allergy, non-celiac gluten sensitivity, gluten ataxia, and dermatitis herpetiformis [9]. CD is an immune-mediated systemic disorder elicited by the ingestion of gluten in genetically susceptible individuals. It affects around 1% of the global population and is based on a variable combination of intestinal and extra-intestinal signs and symptoms, celiac specific antibodies, HLA-DQ2/8 haplotypes, and enteropathy [9–11]. Gluten proteins are rich in proline and glutamine residues, which make them resistant to being fully digested in the gastrointestinal track. Partial digestion of gluten generates small peptides that provoke autoimmune disorders in celiac people. The most accepted model for explaining CD immunopathogenesis is the two-signal model [12] characterized by a first innate immune response followed by a secondary antigen-specific adaptive response. According to this model, certain peptides, such as the 19-mer gliadin peptide, trigger an innate immune response [13] mainly characterized by the production of interleukin 15 (IL-15) by epithelial cells. The result is the disruption of the epithelial barrier by increasing the permeability and inducing enterocyte apoptosis [14]. As a consequence, the immune-adaptive peptides, like the 33-mer, can now reach the lamina propria where they are deaminated by the tissue transglutaminase (tTG2). Such deamidation provides a negative charge to gliadin peptides and hence enhances their affinity to bind within the HLA-DQ2/8 bound, which is also the ‘susceptibility gene’ in CD, expressed on the surface of dendritic cells (DCs) [15–17]. DCs are therefore central in CD pathogenesis since they present a gluten antigen to T cells, [18] thereby driving progression of the pro-inflammatory antigen-specific adaptive immune response, which will turn into the symptomatology of the disease.

Gluten is a complex mixture of storage proteins of cereals such as wheat, rye, barley, oats, and their hybrid derivatives. Gluten proteins have been classified according to their solubility [19]. In wheat, these proteins are defined as gliadins (soluble in 60–70% ethanol) and glutenins (only soluble under stronger conditions, i.e. acids, reducing agents and detergents, urea, etc.) [20]. According to their electrophoretic mobilities, gliadins are divided into three groups: α - and β -gliadins, γ -gliadins, and ω -gliadins [19], while the glutenins are divided into the high molecular weight (HMW) and the low molecular weight (LMW) glutenin subunits (GSs) [21,22]. Among the gliadins, the α -gliadins have the strongest immunogenicity [23], and four T-cell stimulatory epitopes have been identified as being responsible for eliciting the immunogenicity of α -gliadin. Two of these are the major epitopes

and they are present in the 33-mer peptide, which is the main contributor to the immunogenicity of the gluten [24] and contains six copies of these two overlapping T-cell epitopes: three copies of the DQ2.5-glia- α 1 and three copies of the DQ2.5-glia- α 2. The other two T-cell stimulatory epitopes are minor epitopes: DQ2.5-glia- α 3 and DQ8-glia- α 1 [24–27]. However, natural substitutions of these canonical epitopes could also contribute to the toxicity of wheat [28], and it could suggest that the total CD immunogenicity of gluten protein is a result of the canonical epitopes and their variants, some of which are more abundant than the canonical epitopes themselves. Gluten can have different immunogenic potential sequences whose proportions in each species are also variable. For this reason, it is important to study the amino acid substitutions in the variants of these epitopes; interestingly, these variants could increase, reduce, or suppress the CD response.

In earlier work, next-generation sequencing and Sanger sequencing of α -gliadins from diploid and polyploid wheats provided six types of α -gliadins with major differences in their frequencies. The canonical CD epitopes and their variants were identified in the different types of α -gliadins [29]. In the present study, we used the sequence data with one or two mismatches and canonical epitopes obtained in Ozuna et al. [29], and we have built upon the previous research by exploring the abundance of different DQ2.5-glia- α 1, DQ2.5-glia- α 2, and DQ2.5-glia- α 3 epitope variants per species in diploid and polyploid wheats. Moreover, the immunogenic potential of these epitope variants in wheat species was studied by testing their binding capacity to anti-33-mer monoclonal antibodies (moAbs) [30,31] and to induce T-cell proliferation. The anti-33-mer antibodies were able to detect the presence of gliadin 33-mer related epitopes in prolamins from wheat, barley, rye, and various oats varieties as well as in food samples and human samples to monitor gluten free diet (GFD) compliance and transgressions [32]. Our study showed that the canonical epitopes DQ2.5-glia- α 1 and DQ2.5-glia- α 3 were more frequent than DQ2.5-glia- α 2. The most abundant natural modification was found in the DQ2.5-glia- α 3 domain in all the sequences studied. However, this variant decreased its immunogenicity with respect to the canonical epitope. On the other hand, one of the most representative variants of DQ2.5-glia- α 2 (40%) showed an immunogenicity equivalent to the canonical epitope. Our results provide a rational approach for the introduction or selection of natural amino acid substitutions to eliminate the toxicity of three α -gliadin T-cell epitopes, while keeping the technological properties of the commercial wheats.

2. Materials and Methods

2.1. Catalogue and Abundance of CD Epitopes from Diploid, Tetraploid, and Hexaploid Wheat Varieties

Canonical epitopes DQ2.5-glia- α 1 (PF/YPQPQLPY), DQ2.5-glia- α 2 (PQPQLPYPQ), and DQ2.5-glia- α 3 (FRPQQPYYPQ) and variants with one or two mismatches provided by Ozuna et al. [29] were obtained from diploid, tetraploid, and hexaploid wheats (Figure 1).

The frequency/abundance of each peptide in the sequences of the different wheats was studied *in silico*. The abundance of each epitope was calculated by multiplying the total number of epitopes found in a given gene by the frequency of that gene in the genome.

These canonical CD epitopes and their most representative variants with one or two mismatches were synthesized as deaminated and non-deaminated 9-mer peptides. The peptides were supplied by Biomedal S.L. (Seville, Spain).

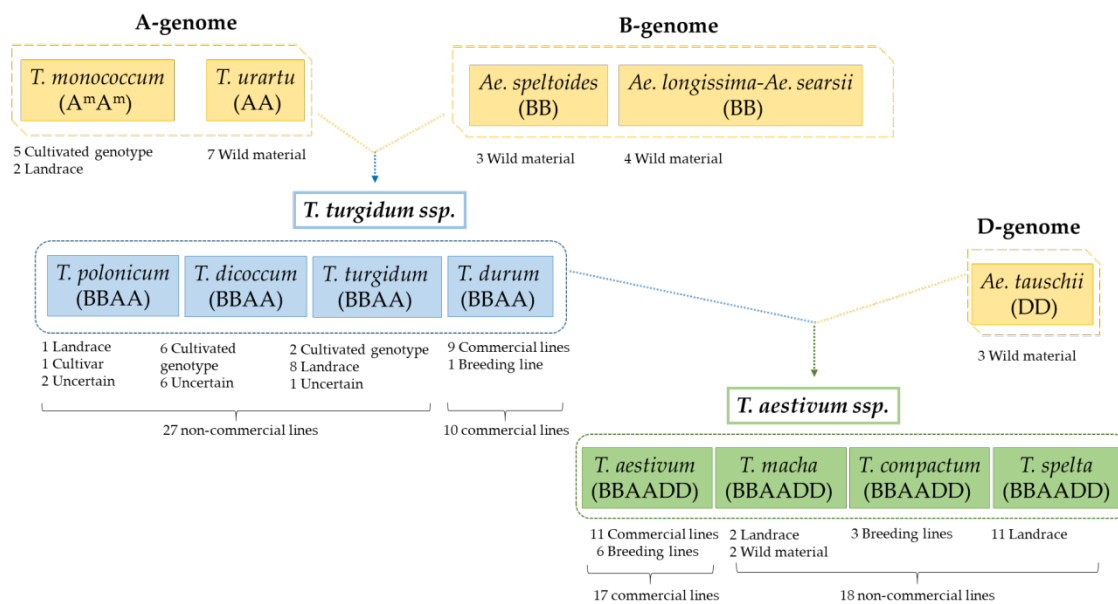


Figure 1. Schematic representation of 96 accessions from *Triticum* and *Aegilops* sp. showing their origin and breeding status. In total, there are thirty-five accessions of hexaploid wheats, thirty-seven accessions of tetraploid wheats, and twenty-four accessions of diploid wheats. AA, BB, and DD: diploids; BBAA: tetraploids; BBAADD: hexaploids (partially adapted from Ozuna and Barro) [3].

2.2. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Maxisorp microtitre plates (Nunc, Roskilde, Denmark) were coated with gliadin solution (Sigma, St Louis, MO, USA) and incubated overnight at 4 °C. The plates were washed with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween 20 and blocked with PBS-bovine serum albumin (BSA) 3% for 1 h at room temperature (RT), and 33-mer peptide was used as standard. Serial dilutions of peptides were made, to each of which horseradish peroxidase (HRP)-conjugate with anti-33-mer antibody (moAb) was added [32]. The samples were pre-incubated at RT for 1 h and then added to the wells. After 1 h of incubation at RT, the plates were washed and substrate solution (TMB, Sigma) was added. The reaction was stopped at 15 min with 1 M sulfuric acid and the absorbance at 450 nm was measured (microplate reader UVM340; Asys Hitech GmbH, Eugendorf, Austria). Two separate assays were performed, each with two repetitions.

2.3. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) and Cell Cultures

Peripheral blood mononuclear cells from 18 child patients with active CD on a gluten-containing diet were isolated from 6 mL of heparinized blood by Histopaque gradient centrifugation and cultured at a density of 1×10^6 cells per milliliter in 96-multiwell culture plates in RPMI-1640 culture medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO-Invitrogen Ltd), 1% penicillin-streptomycin, and 0.1% gentamicin (Sigma-Aldrich). After 48 h, PBMCs were incubated with different peptides (50 µg/mL). After 48 h of stimulation, the free supernatants were collected and stored at −80 °C until the interferon gamma (IFN-γ) analyses were carried out.

2.4. Cell Proliferation Analysis

T-cell proliferation was determined after 48 h of incubation using the ELISA 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) cell proliferation test (Millipore Chemicon, Temecula, California, USA). The stimulation index (SI) value was calculated by dividing the mean absorbance at 450 nm after stimulation by the mean absorbance of T cells exposed to the culture medium alone (negative control).

widely depending on the different hexaploid species, while it remained evenly distributed in the DQ2.5-glia- α 3 canonical epitope ($p = 0.02$, Figure 3).

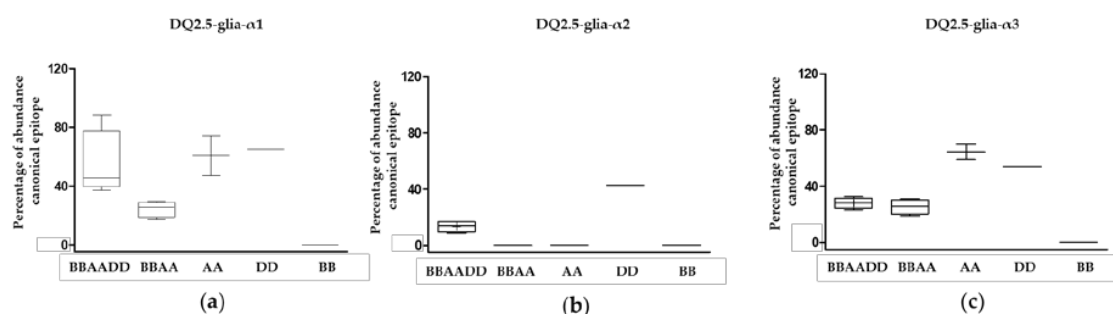


Figure 3. Abundance of CD canonical epitope and variants per wheat genome type. (a) Abundance of the canonical epitope DQ2.5-glia- α 1 and variants, (b) abundance of the canonical DQ2.5-glia- α 2 epitope and variants, and (c) abundance of the canonical DQ2.5-glia- α 3 epitope and variants. BBAADD: hexaploid genome; BBAA: tetraploid genome; AA, DD, and BB: diploid genomes.

Figure 4 shows the abundance of CD canonical epitopes and variants per species. The percentage of DQ2.5-glia- α 1 canonical epitope with respect to variants was 80%. This epitope was present in all wheat genomes with the exception of BB diploids. The highest abundance was found in *T. compactum*, *T. monococcum*, and *Ae. tauschii*. The most abundant variant (range from 0.1% to 20%) was P₁Y₂P₃Q₄P₅Q₆L₇F₈P₉ with two mismatches (P to F at p8 and Y to P at p9). This variant was present in all wheat genomes with the exception of BB and DD diploids. The next most abundant variant was the substitution of P to L at p5, but this variant was present in only BBAA and BB genomes (Figure 5).

The percentage of DQ2.5-glia- α 2 canonical epitope with respect to the different variants of this epitope was 14%, and this epitope was only present in hexaploids BBAADD and DD diploids. This finding may indicate that this epitope came from *Ae. tauschii*, the donor of the D genome to bread wheat. The DQ2.5-glia- α 2 variants P₁Q₂P₃Q₄L₅P₆Y₇S₈Q₉ and P₁Q₂P₃Q₄P₅Q₆Y₇P₈Q₉ were the most frequent (80%). The highest abundance score (range from 46% to 74%) of P₁Q₂P₃Q₄L₅P₆Y₇S₈Q₉ (P to S substitution at p8) occurred in AA diploids and was absent from DD and BB diploid genomes. In contrast, P₁Q₂P₃Q₄P₅Q₆Y₇P₈Q₉ (L to P at p5 and P to Q at p6), with two mismatches, presented high abundance in all genomes, with the exception of *T. monococcum* (A^mA^m diploid) (Figures 4 and 5).

Regarding the DQ2.5-glia- α 3, the epitope variant F₁P₂P₃Q₄Q₅P₆Y₇P₈Q₉ (with R to P substitution at p2) was the most frequent, with an abundance greater than 75% across all species, except in *Triticum polonicum* (BBAA) and *Triticum urartu* (A^uA^u), with abundances of 67.9% and 42.2%, respectively. The second and third most frequent variants, F₁L₂P₃Q₄L₅P₆Y₇P₈Q₉ (R to L at p2 and Q to L at p5) and F₁P₂P₃Q₄Q₅S₆Y₇P₈Q₉ (R to P at p2 and P to S at p6), had two mismatches and were absent in AA and DD diploid genomes, which could indicate that the BB genome is the origin of this variant in the polyploid varieties; in fact, the abundance of this epitope variant in the remaining genomes was very similar ($\approx 20\%$) (Figures 4 and 5).

The process of hybridization between *Ae. tauschii* and *T. dicoccum* provided the DD genome, and new gluten gene combinations, to hexaploid wheats, thereby considerably improving their bread baking properties compared to that of tetraploid wheats, particularly the HMW-glutenin subunits [36]. However, the DD genome also encodes for gliadins that have been reported as highly immunogenic, as the DD genome has the highest number of potential immunogenic α -gliadin peptides [37], while those from the BB genome contribute the least [38,39]. We found that the three canonical epitopes are present in the DD genome, with a representation ranging from 43% to 65%. In hexaploids (BBAADD), all canonical epitopes are also present, but in a smaller proportion (<40%) than the DD genome. In contrast, in the AA genome, only DQ2.5-glia- α 1 and DQ2.5-glia- α 3 are present, and the BB genome is not represented by any of the canonical epitopes.

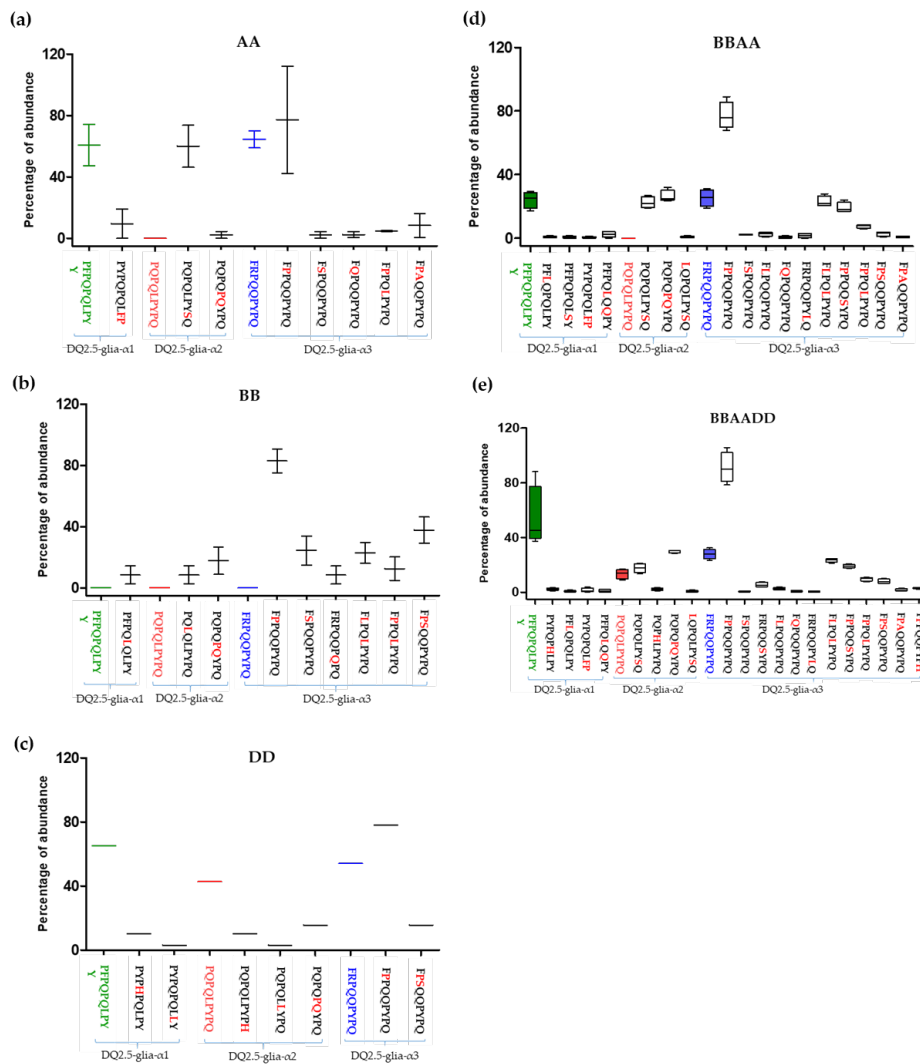


Figure 5. Abundance of epitope variants according to wheat genome type. The epitopes represented showed more than 1% of abundance in each gliadin domain. (a) AA genome, (b) BB genome, (c) DD genome, (d) BBAA genome, and (e) BBAADD genome. DQ2.5-glia- α 1 epitope: green; DQ2.5-glia- α 2 epitope: red; DQ2.5-glia- α 3 epitope: blue.

3.2. Anti-33-mer MoAb Binding Capacity and T-cell Stimulatory of DQ2.5- α -Gliadin-Derived Peptides

Several of the amino acid variants that we found in the α -gliadin epitope sequences had never been described previously, while a number had been described but had never been tested for their immunogenic and stimulatory capacities. In order to determine which variants are capable of inducing a CD stimulatory response, the variants from DQ2.5-glia- α epitopes were synthesized as native and deaminated peptides and tested for their capacity to bind to anti-33-mer monoclonal antibodies (moAbs) and to induce T-cell proliferation, respectively (Figure 6). The latter was confirmed with gamma interferon assays (IFN- γ). The positioning of deamidated glutamine residues is strongly related to the positioning of proline residues, which is particularly strict in the case of DQ2.5 epitopes (but not DQ8 epitopes), as DQ2.5 only accepts proline at a certain position in the peptide binding groove [26,40]. The capacity of DQ2.5-glia- α epitopes to trigger proliferation of T cells was tested in deaminated peptides, deamidation of glutamine (Q) at p6 in DQ2.5-glia- α 1 domain, p4 in DQ2.5-glia- α 2 domain, and p4 in DQ2.5-glia- α 3 domain.

The DQ2.5-glia- α 1 and DQ2.5-glia- α 2 epitopes were regarded as major CD epitopes, as they are recognized by most of CD patients [41]. The anti-33-mer moAbs reacted strongly with the

canonical DQ2.5-glia- α 1 epitope P₁{F/Y}₂P₃Q₄P₅Q₆L₇P₈Y₉. In comparison with the canonical CD epitope, the variants P₁F₂L₃Q₄P₅Q₆L₇P₈Y₉ (proline (P) to leucine (L) substitution at p3) and P₁F₂S₃Q₄P₅Q₆L₇P₈Y₉ (P to serine (S) substitution at p3) showed a cross-reactivity (CR) of 37.7% and 55.4%, respectively. With regard to studies of PBMCs in DQ2.5-glia- α 1 variants, the single substitution P to S at p3 maintained similar stimulation capacity to that of the canonical epitope, although it was not abundant (0.2% to 0.8%) in wheat species. Similarly, the variant with P to L substitution at p3 was very low in abundance (0.1% to 1.6%) and was found in all the polyploid species except for *T. spelta*, while in diploids it was only found in species with the AA genome. However, substitutions of Q to histidine (H) at p4 and p6, respectively, abolished the stimulatory capacity of this epitope, probably because it provides a positive charge or via its influence in the deamidation at p6, as previously observed by Schumann et al. [42]. Moreover, P to L at p8, or two substitutions, also abolished the stimulatory capacity and showed no affinity for the moAbs (Figure 6a).

As indicated in Figure 6b, the variant P₁Q₂P₃Q₄L₅P₆Y₇S₈Q₉ (P to S substitution at p8) showed an anti-33-mer binding capacity and PBMC stimulation similar to that of the DQ2.5-glia- α 2 canonical CD epitope. This common variant was found in polyploid and diploid species with AA genome, but was not found in BB and DD genomes. Those peptides with two mismatches, such as P₁Q₂P₃Q₄P₅Q₆Y₇P₈Q₉ (substitutions L to P at p5 and P to Q at p6), L₁Q₂P₃Q₄L₅P₆Y₇S₈Q₉ (substitutions P to L at p1 and P to S at p8), S₁Q₂P₃Q₄L₅P₆Y₇S₈Q₉ (substitutions P to S at p1 and p8), and P₁Q₂P₃Q₄L₅P₆H₇S₈Q₉ (substitutions tyrosine (Y) to H at p7, and P to S at p8) showed a CR of 30–40% with respect to the canonical CD epitope and a stimulation index (SI) from 13 to 23 for PBMC stimulation. In contrast, the replacement of P to L at p3, p6, or p8 showed no reactivity with the moAbs. Among all of these variants, P₁Q₂P₃Q₄L₅P₆Y₇S₈Q₉ and P₁Q₂P₃Q₄P₅Q₆Y₇P₈Q₉ were the most frequent variants of the DQ2.5-glia- α 2. The modification of P to S at p8 showed high stimulation with the moAbs and PBMCs, however, two mismatches of L to P at p5 and P to Q at p6 in the same sequence caused a threefold decrease in the immunogenicity of the DQ2.5-glia- α 2 canonical epitope. This change is abundant in the BBAA genome, especially in the *T. turgidum* species.

Proliferation assays for PBMC with the canonical DQ2.5-glia- α 3 epitope F₁R₂P₃E₄Q₅P₆Y₇P₈Q₉ were tested with E on p4 by tTG2-deamidation of the original Q. Several peptides released an increased stimulatory effect on T cells, such as the DQ2.5-glia- α 3 variant F₁L₂P₃Q₄L₅P₆Y₇P₈Q₉ with two mismatches. However, other variants for this epitope, with several amino acid substitutions, had no stimulatory effect on T cells, including P to S substitution at p6, Y to Q at p7, P to Q at p3, and two substitutions of arginine (R) to P at p2 and Q to H at p9 and R to P at p2 and P to A at p3 (Figure 6c). The replacement of R to L at p2 and Q to L at p5 in the variant F₁L₂P₃Q₄L₅P₆Y₇P₈Q₉ gave it greater stimulation capacity, given that this variant was highly abundant for the DQ2.5-glia- α 3 epitope, it was found in all the polyploid species and in the BB diploid genome. However, the non-abundant variant F₁P₂P₃Q₄L₅P₆Y₇P₈Q₉ with the change of R to P at p2 and Q to L at p5 increased both the binding of the moAbs and stimulation with T cells. The variant F₁R₂P₃Q₄L₅P₆Y₇L₈Q₉ with one mismatch (P to L at p8) showed T-cell stimulatory capacity and moAb binding, but was low in abundance (0.6% to 2.5%). Nevertheless, one of the most abundant variants, F₁S₂P₃Q₄Q₅P₆Y₇P₈Q₉, showed no T-cell stimulatory capacity and binding of the moAb and was found in the BB diploid genome.

According to the model of HLA-DQ2, the key amino acid residues for DQ2 binding lie at positions 1, 7, and 9, with preferential residues at positions 4 and 6 [43,44]. On the other hand, Elli et al. [45] found that substitutions at positions 2, 3, 5, and 8 also profoundly affected T-cell stimulation, indicating that these residues may all interact with the T-cell receptor (TCR). Our findings showed that the change at position 2 affected T-cell stimulation in the domain DQ2.5-glia- α 1, at p8 in the DQ2.5-glia- α 2 domain. In addition, the changes at positions 2, 5, and 8 in the DQ2.5-glia- α 3 domain profoundly affected T-cell stimulation. Our results now provide new insights into an alternative approach, since we have showed that, by introducing specific amino acid substitutions, such as Q to H, at any position, the toxicity of the three T-cell α -gliadin epitopes could be eliminated. As such, the high level of variation influencing the immunogenicity of the major CD epitopes may offer possibilities to generate

new wheat lines with reduced CD-immunogenicity, which may be potentially used as starting points for the breeding of safe wheats.

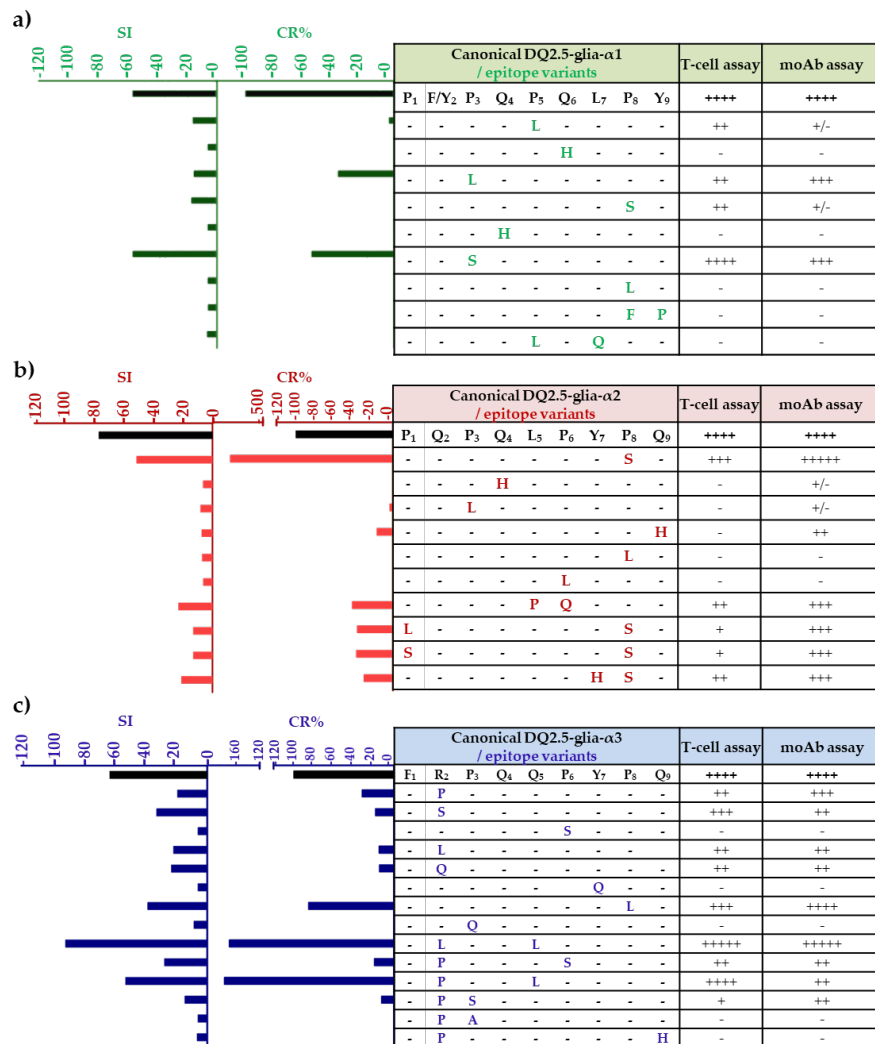


Figure 6. T-cell proliferation and anti-33-mer binding capacity of DQ2.5-glia-α1, DQ2.5-glia-α2, and DQ2.5-glia-α3 epitope variants and canonical epitope. (a) DQ2.5-glia-α1 epitope and variants, (b) DQ2.5-glia-α2 epitope and variants, and (c) DQ2.5-glia-α3 epitope and variants. Variants and the canonical epitope were synthesized as deaminated 9-mer peptides to peripheral blood mononuclear cell (PBMC) assay. Proliferative responses of T cells were defined as a stimulation index (SI), which means the specific proliferation of a sample divided by the background proliferation ([PBMC + peptide]/[PBMC]). Glutamate residues (E) that would be formed by TG2-mediated deamination, which are important for recognition by T cells, are shown in italics. For the T-cell assay, the responses are represented relative to the maximum response given by the CD canonical epitope indicated by +++. Therefore, - corresponds with 15%; + corresponds with 15–25%; ++ corresponds with 25–50%; +++ corresponds with 50–75%; ++++ corresponds with 75–100%; and +++++ corresponds with >100%. For the monoclonal antibody (moAb) assay, the amount of antigen detected is represented relative to the maximum amount (mol/L) detected in a given assay by the CD canonical epitope indicated by +++. Therefore, - corresponds with 0%; +/- corresponds with < 5%; + corresponds with 5–10%; ++ corresponds with 10–30%; +++ corresponds to 30–60%; ++++ corresponds to 60–100%; and +++++ corresponds to > 100%. CR; cross-reactivity, was calculated as follows: (IC50 of the antigen for which the moAb was raised/IC50 of each antigen assayed) × 100. The IC50 is defined as the concentration of the line that reduces the peak absorbance by 50% in the assay. Each of the letters represents the amino acid substitution of the variants.

4. Conclusions

The results presented here about CD DQ2.5 epitopes provide the basis for the introduction and/or selection of natural amino acid substitutions to eliminate the toxicity of the α -gliadin T-cell epitopes. Our findings show that the most abundant epitope in the DQ2.5-glia- α 1 domain is the CD canonical epitope. Considering the DQ2.5-glia- α 2 domain, the variants P₁Q₂P₃Q₄L₅P₆Y₇S₈Q₉ and P₁Q₂P₃Q₄P₅Q₆Y₇P₈Q₉ are the most abundant in this domain, while F₁P₂P₃Q₄Q₅P₆Y₇P₈Q₉ is the most abundant in the DQ2.5-glia- α 3 domain. Moreover, the F₁P₂P₃Q₄Q₅P₆Y₇P₈Q₉ variant was also the most frequent of all the sequences studied. Our data indicate that the changes of P to S and R to P may be the most representative changes and the natural introduction of Q to H at any position eliminates the toxicity of the three T-cell epitopes. These results may offer possibilities to generate wheat varieties with a reduced CD-immunogenicity. Such varieties would help to reduce the presence of immunogenic CD epitopes in wheat flour and, while not safe for consumption by patients, might help to prevent the onset of CD in people that carry genetic risk factors. Overall, the more the scientific community knows about immunogenicity of the gliadins, the closer an alternative therapy besides GFD will be achieved.

Author Contributions: Conceptualization, Á.R.-C., F.B., and C.S.; Data curation, Á.R.-C., C.V.O., and M.I.T.; Formal analysis, Á.R.-C., C.V.O., and M.I.T.; Investigation, Á.R.-C., I.C., V.S., M.d.L.M., C.V.O., M.Á.L.-C., M.I.T., F.B., and C.S.; Methodology, Á.R.-C., C.V.O., M.I.T., F.B., and C.S.; Resources, C.V.O., F.B., and C.S.; Writing—original draft, Á.R.-C., I.C., V.S., M.d.L.M., C.V.O., M.Á.L.-C., M.I.T., F.B., and C.S.; Writing—review & editing, Á.R.-C., I.C., V.S., M.d.L.M., C.V.O., M.Á.L.-C., M.I.T., F.B., and C.S.

Funding: The Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (project AGL2013-48946-C) supported this work.

Acknowledgments: The Spanish Ministry of Economy and Competitiveness supported this work.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. None of the authors has any conflict of interest that could affect the performance of the work or the interpretation of the data.

References

- Shewry, P.R.; Hey, S.J. The contribution of wheat to human diet and health. *Food Energy Secur.* **2015**, *4*, 178–202. [CrossRef] [PubMed]
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available online: <http://faostat3.fao.org> (accessed on 15 October 2018).
- Ozuna, C.V.; Barro, F. Characterization of gluten proteins and celiac disease-related immunogenic epitopes in the Triticeae: Cereal domestication and breeding contributed to decrease the content of gliadins and gluten. *Mol. Breed.* **2018**, *38*, 22. [CrossRef]
- Feldman, M.; Levy, A.A. Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. *Genetics* **2012**, *192*, 763–774. [CrossRef] [PubMed]
- López-Merino, L.; Leroy, S.A.G.; Haldorsen, S.; Heun, M.; Reynolds, A. Can *Triticum urartu* (Poaceae) be identified by pollen analysis? Implications for detecting the ancestor of the extinct two-grained einkorn-like wheat. *Bot. J. Linn. Soc.* **2015**, *177*, 278–289. [CrossRef] [PubMed]
- Petersen, G.; Seberg, O.; Yde, M.; Berthelsen, K. Phylogenetic relationships of Triticum and Aegilops and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Mol. Phylogenet. Evol.* **2006**, *39*, 70–82. [CrossRef]
- Kasarda, D.D. Can an increase in celiac disease be attributed to an increase in the gluten content of wheat as a consequence of wheat breeding? *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 1155–1159. [CrossRef] [PubMed]
- Arzani, A.; Ashraf, M. Cultivated Ancient Wheats (*Triticum* spp.): A Potential Source of Health-Beneficial Food Products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2017**, *16*, 477–488. [CrossRef]
- Ludvigsson, J.F.; Leffler, D.A.; Bai, J.C.; Biagi, F.; Fasano, A.; Green, P.H.R.; Hadjivassiliou, M.; Kaukinen, K.; Kelly, C.P.; Leonard, J.N.; et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* **2013**, *62*, 43–52. [CrossRef]
- Fasano, A.; Sapone, A.; Zevallos, V.; Schuppan, D. Nonceliac gluten and wheat sensitivity. *Gastroenterology* **2015**, *148*, 1195–1204. [CrossRef]

11. Herrera, M.J.; Hermoso, M.A.; Quera, R. An update on the pathogenesis of celiac disease. *Revista Medica de Chile* **2009**, *137*, 1617–1626.
12. Brandtzaeg, P. The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunol. Lett* **2006**, *105*, 127–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Maiuri, L.; Ciacci, C.; Ricciardelli, I.; Vacca, L.; Raia, V.; Auricchio, S.; Picard, J.; Osman, M.; Quarantino, S.; Londei, M. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* **2003**, *362*, 30–37. [[CrossRef](#)]
14. Maiuri, L.; Ciacci, C.; Auricchio, S.; Brown, V.; Quarantino, S.; Londei, M. Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology* **2000**, *119*, 996–1006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Qiao, S.W.; Bergseng, E.; Molberg, O.; Xia, J.; Fleckenstein, B.; Khosla, C.; Sollid, L.M. Antigen Presentation to Celiac Lesion-Derived T Cells of a 33-Mer Gliadin Peptide Naturally Formed by Gastrointestinal Digestion. *J. Immunol* **2004**, *173*, 1757–1762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ráki, M.; Tollefsen, S.; Molberg, Ø.; Lundin, K.E.A.; Sollid, L.M.; Jahnsen, F.L. A Unique Dendritic Cell Subset Accumulates in the Celiac Lesion and Efficiently Activates Gluten-Reactive T Cells. *Gastroenterology* **2006**, *131*, 428–438. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Tollefsen, S.; Arentz-Hansen, H.; Fleckenstein, B.; Molberg, Ø.; Ráki, M.; Kwok, W.W.; Jung, G.; Lundin, K.E.A.; Sollid, L.M. HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *J. Clin. Investig.* **2006**, *116*, 2226–2236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Bernardo, D. Human intestinal dendritic cells as controllers of mucosal immunity. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* **2013**, *105*, 279–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Martínez-Esteso, M.J.; Nørgaard, J.; Brohée, M.; Haraszi, R.; Maquet, A.; O'Connor, G. Defining the wheat gluten peptide fingerprint via a discovery and targeted proteomics approach. *J. Proteom.* **2016**, *147*, 156–168. [[CrossRef](#)]
20. Allred, L.K.; Ritter, B.W. Recognition of gliadin and glutenin fractions in four commercial gluten assays. *J. AOAC Int.* **2010**, *93*, 190–196.
21. Shewry, P.R.; Halford, N.G. Cereal seed storage proteins: Structures, properties and role in grain utilization. *J. Exp. Bot.* **2002**, *53*, 947–958. [[CrossRef](#)]
22. Mena, M.C.; Sousa, C.; Mena, M.C.; Sousa, C. CHAPTER 16. Analytical Tools for Gluten Detection: Policies and Regulation. *OmniaSci. Monogr.* **2015**, 527–564. [[CrossRef](#)]
23. Camarca, A.; Anderson, R.P.; Mamone, G.; Fierro, O.; Facchiano, A.; Costantini, S.; Zanzi, D.; Sidney, J.; Auricchio, S.; Sette, A.; et al. Intestinal T Cell Responses to Gluten Peptides Are Largely Heterogeneous: Implications for a Peptide-Based Therapy in Celiac Disease. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 4158–4166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Shan, L.; Molberg, Ø.; Parrot, I.; Hausch, F.; Filiz, F.; Gray, G.M.; Sollid, L.M.; Khosla, C. Structural basis for gluten intolerance in Celiac Sprue. *Science* **2002**, *297*, 2275–2279. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Molberg, Ø.; Uhlen, A.K.; Jensen, T.; Flæte, N.S.; Fleckenstein, B.; Arentz-Hansen, H.; Raki, M.; Lundin, K.E.A.; Sollid, L.M. Mapping of gluten T-cell epitopes in the bread wheat ancestors: Implications for celiac disease. *Gastroenterology* **2005**, *128*, 393–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sollid, L.M.; Qiao, S.W.; Anderson, R.P.; Gianfrani, C.; Koning, F. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics* **2012**, *64*, 455–460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Escarnot, E.; Gofflot, S.; Sinnaeve, G.; Dubois, B.; Bertin, P.; Mingeot, D. Reactivity of gluten proteins from spelt and bread wheat accessions towards A1 and G12 antibodies in the framework of celiac disease. *Food Chem.* **2018**, *268*, 522–532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Dubois, B.; Bertin, P.; Muhovski, Y.; Escarnot, E.; Mingeot, D. Development of TaqMan probes targeting the four major celiac disease epitopes found in α -gliadin sequences of spelt (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*) and bread wheat (*Triticum aestivum* ssp. *aestivum*). *Plant Methods* **2017**, *13*, 1–14. [[CrossRef](#)]
29. Ozuna, C.V.; Iehisa, J.C.M.; Giménez, M.J.; Alvarez, J.B.; Sousa, C.; Barro, F. Diversification of the celiac disease α -gliadin complex in wheat: A 33-mer peptide with six overlapping epitopes, evolved following polyploidization. *Plant J.* **2015**, *82*, 794–805. [[CrossRef](#)]
30. Moron, B.; Cebolla, A.; Manyani, H.; Alvarez-Maqueda, M.; Megias, M.; Thomas, M.D.C.; Lopez, M.C.; Sousa, C. 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.* **2008**, *87*, 405–414. [[CrossRef](#)]

31. Morón, B.; Bethune, M.T.; Comino, I.; Manyani, H.; Ferragud, M.; López, M.C.; Cebolla, Á.; Khosla, C.; Sousa, C. Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: Characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. *PLoS ONE* **2008**, *3*, 1–13. [[CrossRef](#)]
32. Comino, I.; Real, A.; Vivas, S.; Síglez, M.Á.; Caminero, A.; Nistal, E.; Casqueiro, J.; Rodríguez-Herrera, A.; Cebolla, Á.; Sousa, C. 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*, 670–677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. ArentzHansen, H.; McAdam, S.N.; Molberg, Ø.; Fleckenstein, B.; Lundin, K.E.A.; Jørgensen, T.J.D.; Jung, G.; Roepstorff, P.; Sollid, L.M. Celiac lesion T cells recognize epitopes that cluster in regions of gliadins rich in proline residues. *Gastroenterology* **2002**, *123*, 803–809. [[CrossRef](#)]
34. Vader, W.; Stepniak, D.; Kooy, Y.; Mearin, L.; Thompson, A.; van Rood, J.J.; Spaenij, L.; Koning, F. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 12390–12395. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ciccocioppo, R.; Di Sabatino, A.; Corazza, G.R. The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* **2005**, *140*, 408–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Payne, P.I.; Jackson, E.A.; Holt, L.M. The association between γ -gliadin 45 and gluten strength in durum wheat varieties: A direct causal effect or the result of genetic linkage? *J. Cereal Sci.* **1984**, *2*, 73–81. [[CrossRef](#)]
37. Jouanin, A.; Gilissen, L.J.W.J.; Boyd, L.A.; Cockram, J.; Leigh, F.J.; Wallington, E.J.; van den Broeck, H.C.; van der Meer, I.M.; Schaart, J.G.; Visser, R.G.F.; et al. Food processing and breeding strategies for coeliac-safe and healthy wheat products. *Food Res. Int.* **2018**, *110*, 11–21. [[CrossRef](#)]
38. Van Herpen, T.W.J.M.; Goryunova, S.V.; van der Schoot, J.; Mitreva, M.; Salentijn, E.; Vorst, O.; Schenk, M.F.; van Veelen, P.A.; Koning, F.; van Soest, L.J.M.; et al. Alpha-gliadin genes from the A, B, and D genomes of wheat contain different sets of celiac disease epitopes. *BMC Genom.* **2006**, *7*, 1–13. [[CrossRef](#)]
39. Salentijn, E.M.; Goryunova, S.V.; Bas, N.; van der Meer, I.M.; van den Broeck, H.C.; Bastien, T.; Gilissen, L.J.W.J.; Smulders, M.J.M. Tetraploid and hexaploid wheat varieties reveal large differences in expression of alpha-gliadins from homoeologous Gli-2 loci. *BMC Genom.* **2009**, *10*, 48. [[CrossRef](#)]
40. Kim, C.Y.; Quarsten, H.; Bergseng, E.; Khosla, C.; Sollid, L.M. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 4175–4179. [[CrossRef](#)]
41. Tye-Din, J.A.; Stewart, J.A.; Dromei, J.A.; Beissbarth, T.; Van Heel, D.A.; Tatham, A.; Henderson, K.; Mannering, S.I.; Gianfrani, C.; Jewell, D.P.; et al. Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci. Transl. Med.* **2010**, *2*. [[CrossRef](#)]
42. Schumann, M.; Siegmund, B.; Schulzke, J.D.; Fromm, M. Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *3*, 150–162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Vartdal, F.; Johansen, B.H.; Friede, T.; Thorpe, C.J.; Stevanović, S.; Eriksen, J.E.; Sletten, K.; Thorsby, E.; Rammensee, H.G.; Sollid, L.M. The peptide binding motif of the disease associated HLA-DQ (α 1(*) 0501, β 1(*) 0201) molecule. *Eur. J. Immunol.* **1996**, *26*, 2764–2772. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Arentz-Hansen, H.; Korner, R.; Molberg, O.; Quarsten, H.; Vader, W.; Kooy, Y.M.C.; Lundin, K.E.A.; Koning, F.; Roepstorff, P.; Sollid, L.M.; et al. The intestinal T cell response to α -gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J. Exp. Med.* **2000**, *191*, 603–612. [[CrossRef](#)]
45. Ellis, H.J.; Pollock, E.L.; Engel, W.; Fraser, J.S.; Rosen-Bronson, S.; Wieser, H.; Ciclitira, P.J. Investigation of the putative immunodominant T cell epitopes in coeliac disease. *Gut* **2003**, *52*, 212–217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



CAPÍTULO 5. VALOR PREDICTIVO NEGATIVO DE LA AUSENCIA REPETIDA DE PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS DEL GLUTEN EN ORINA PARA LA PREDICCIÓN DE LA RECUPERACIÓN DE LA MUCOSA DE PACIENTES CELÍACOS TRATADOS

Negative predictive value of the repeated absence of gluten immunogenic peptides in the urine of treated celiac patients in predicting mucosal healing: new proposals for follow-up in celiac disease

Ángela Ruiz-Carnicer,¹ Marta Garzón-Benavides,² Blanca Fombuena,² Verónica Segura,¹ Francisco García-Fernández,² Salvador Sobrino-Rodríguez,² Lourdes Gómez-Izquierdo,³ Marcos A Montes-Cano,⁴ Alfonso Rodríguez-Herrera,⁵ Raquel Millán,² María C Rico,² Carmen González-Naranjo,² Juan M Bozada-García,⁶ Jacobo Díaz,⁷ Cristóbal Coronel-Rodríguez,⁸ Beatriz Espín,⁹ Manuel Romero-Gómez,² Ángel Cebolla,¹⁰ Carolina Sousa,¹ Isabel Comino,¹ Federico Argüelles,¹¹ and Ángeles Pizarro²

¹Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Seville, Spain; ²Digestive disease clinical unit, gastroenterology division, Virgen del Rocío Hospital, Seville, Spain; ³Pathology Service, Virgen del Rocío Hospital, Seville, Spain; ⁴Institute of Biomedicine of Seville (IBiS), Seville, Spain. Associated professor, Faculty of Medicine, University of Seville, Seville, Spain; ⁵Saint Luke's General Hospital, Kilkenny, Ireland; ⁶Endoscopy of Digestive Diseases Clinical Unit, Virgen del Rocío Hospital, Seville, Spain; ⁷Clinical Analysis Service, Hospital Universitario INGESA, Ceuta, Spain; ⁸Health Center Amante Laffón, Seville, Spain; ⁹Pediatric, Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Section, Virgen del Rocío Children's Hospital, Seville, Spain; ¹⁰Biomedal SL, Seville, Spain; and ¹¹Digestive Diseases Clinical Unit, Virgen Macarena Hospital, Seville, Spain.

Am J Clin Nutr 2020; 00:1–12.

CAPÍTULO 6. RESUMEN GLOBAL DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La eliminación del gluten de la dieta como único tratamiento para la enfermedad celíaca, ha impulsado la investigación y validación de nuevas técnicas de control menos invasivas y asequibles que mejoren la identificación y seguimiento de los pacientes celíacos que están expuestos regularmente al gluten (voluntaria o involuntariamente) mientras siguen una DSG. La permanente dieta libre de gluten que, si bien es muy eficaz, puede resultar a veces una tarea difícil debido a que los productos a base de trigo y otros cereales son de uso común en nuestra dieta diaria. Mientras que muchos pacientes logran una recuperación total de su enfermedad mediante el seguimiento de una dieta libre de gluten y consiguen mantenerla de manera estricta; hay pacientes que requieren un seguimiento periódico para conocer la eficacia del tratamiento, y otros muchos que darían la bienvenida a nuevos productos alimenticios que permitan una mayor flexibilidad de su dieta. Los trabajos presentados en esta Tesis Doctoral se centran en el desarrollo nuevas estrategias para el control de la enfermedad celíaca.

La enfermedad celíaca es una enteropatía autoinmune crónica que aparece cuando individuos genéticamente susceptibles ingieren gluten derivado de trigo, cebada, centeno y algunas avenas, en la dieta. Los pacientes con un diagnóstico de enfermedad celíaca necesitan adoptar una dieta sin gluten de por vida (Ludvigsson *et al.*, 2012). La dieta libre de gluten fue propuesta como tratamiento para la enfermedad celíaca, permitiéndose de esta manera la recuperación clínica y funcional de la mucosa del intestino y la desaparición de la sintomatología. De hecho, a día de hoy la dieta sin gluten ha demostrado ser segura y eficaz en la mayoría de los pacientes con enfermedad celíaca. No obstante, las dificultades para garantizar una correcta dieta sin gluten y las deficiencias en el espectro de herramientas disponibles para el control a largo plazo del paciente celíaco han impulsado la investigación de nuevas alternativas terapéuticas, sin embargo, hoy por hoy ninguna de ellas puede reemplazar la DSG.

La ingestión de gluten se ha relacionado con una variedad de trastornos clínicos, los cuales han surgido gradualmente como un fenómeno epidemiológicamente relevante con una prevalencia global estimada de alrededor del 5%. Además de la enfermedad celíaca, está la alergia al trigo y la sensibilidad al gluten no celíaca, las cuales representan diferentes trastornos relacionados con el gluten (Elli *et al.*, 2015). En esta tesis doctoral, se ha hecho una revisión de las diferencias y la superposición en la presentación clínica entre los trastornos relacionados con el gluten y un estudio global de la dieta libre de gluten.

La disponibilidad de anticuerpos frente a uno de los péptidos más inmunotóxicos del gluten de trigo (Morón *et al.*, 2008a; 2008b), y el desarrollo de inmunoensayos para la detección del consumo inadvertido de gluten mediante la medición de GIP en muestras humanas (heces y orina), se han desarrollado en esta Tesis Doctoral nuevas estrategias de control de la enfermedad celíaca mediante dos enfoques alternativos. Uno de ellos estuvo centrado en la determinación del potencial inmunotóxico de péptidos derivados de α -gliadinas de variedades de trigo, los cuales inducen fuertes respuestas de las células T en la gran mayoría de los pacientes (Mitea *et al.*, 2010; Sollid *et al.*, 2012; Soler *et al.*, 2016; Caio *et al.*, 2019). Para demostrar esta hipótesis se ha usado variedades de la tribu Triticeae, concretamente especies de *Triticum* y *Aegilops* y se ha discutido su inmunogenicidad obtenida mediante células T de pacientes celíacos. Por otro lado, se ha estudiado la abundancia de las variantes de los epítomos tóxicos en todas las secuencias de α -gliadinas y su reactividad mediante técnicas inmunológicas basadas en anticuerpos G12 y A1, con el fin de comprobar si había una correlación entre la reactividad de dichas variedades frente a estos anticuerpos y su inmunogenicidad.

El segundo de los enfoques está orientado a la evaluación de la utilidad clínica de la determinación de GIP en orina como un biomarcador del cumplimiento de la DSG en pacientes celíacos. Además de correlacionar la detección de GIP en orina con los métodos tradicionales y probar su utilidad como predictor de la actividad histológica.

Patologías asociadas al gluten

El trigo, el arroz y el maíz son los cereales más consumidos. El trigo, es el más cultivado en el mundo debido a su adaptabilidad a diferentes ambientes y a su alto rendimiento, así como por las propiedades biomecánicas que presenta su masa. Los productos de trigo hacen contribuciones sustanciales a la ingesta dietética de energía y proteínas, y suministran fibra, minerales y vitaminas (Kasarda, 2013; Lundin, 2014). Sin embargo, también tienen impactos negativos en la salud humana, en relación con las alergias y las intolerancias. Estos trastornos están relacionados con la exposición al gluten, el principal complejo proteico estructural del trigo y otros cereales como el centeno, la cebada y la avena. Las diferentes patologías asociadas a la ingesta de cereales, así como el seguimiento de la dieta sin gluten, se han estudiado en el capítulo 3.

La EC es un trastorno autoinmune desarrollado en individuos predispuestos genéticamente (HLA-DQ2/DQ8) y causado por una intolerancia permanente al gluten contenido en algunos cereales, como el trigo, el centeno, la cebada y algunas variedades de avena que conduce a una inflamación crónica del intestino delgado (Jabri

y Sollid, 2006; Makharia *et al.*, 2012; Ludvigsson *et al.*, 2013. El diagnóstico de EC se basa en una combinación de hallazgos de la historia clínica del paciente, marcadores genéticos, anticuerpos serológicos específicos y análisis histopatológicos de las muestras duodenales. La prueba serológica preferida para la detección de EC en sujetos mayores de 2 años es el anticuerpo anti-transglutaminasa IgA (TTG) (van der Windt *et al.*, 2010). El anticuerpo anti-endomisio (EMA) se puede utilizar como prueba confirmatoria en casos de diagnóstico incierto en poblaciones de alto riesgo (Leffer y Schuppan, 2010). Sin embargo, la prueba EMA es costosa y depende del operador debido a la interpretación del patrón inmunofluorescente. El péptido de gliadina desamidada (DGP) IgA e IgG, en sustitución de los anticuerpos anti-gliadina, se usan en combinación con TTG IgA en niños menores de 2 años (Husby *et al.*, 2012). Los análisis histopatológicos generalmente se basan en la clasificación histológica de Marsh-Oberhuber que varía desde una mucosa normal (Marsh 0) hasta la aparición de infiltración linfocítica (Marsh 1), hiperplasia de la cripta (Marsh 2) y diferentes niveles de atrofia vellositaria (Marsh 3), aunque esta clasificación sigue siendo subjetiva. Se han propuesto clasificaciones más objetivas y prácticas en los últimos años, como la de Corazza y Villanacci o la de Ensari (Peña, 2015; Escudero-Hernández *et al.*, 2016).

Sin embargo, actualmente se sabe que las reacciones al gluten no se limitan a la EC, sino que ahora apreciamos la existencia de un espectro de trastornos relacionados con el gluten, donde se incluye la alergia al trigo (AT) y la sensibilidad al gluten no celíaca (SGNC). La AT se define como una reacción inmunológica adversa mediada por IgE por proteínas de trigo, pero no a otros cereales. Dependiendo de la ruta de exposición a los alérgenos, la AT se clasifica en asma ocupacional (asma de panadero) y rinitis; alergia alimentaria (AA), que afecta la piel, el tracto gastrointestinal o el tracto respiratorio; anafilaxia inducida por ejercicio dependiente del trigo y urticaria de contacto. Los anticuerpos IgE juegan un papel central en la patogénesis de estas enfermedades. La SGNC ha sido reconocida como un nuevo síndrome relacionado con el gluten por la comunidad científica, pero el conocimiento sobre este síndrome todavía es incompleto con pocas certezas y muchos problemas sin resolver. Además de EC y AT, hay un tercer síndrome relacionado con el gluten en el que los mecanismos inmunológicos no están relacionados con la presencia de IgE, como en AT, o una respuesta inmune adaptativa caracterizada por la presencia de células T reactivas al gluten y anticuerpos dirigidos contra TTG o péptidos de gluten desaminados como en EC. Se cree que este síndrome, SGNC, surge de una respuesta inmune innata al gluten de la dieta no acoplada a una respuesta inmune adaptativa secundaria (Escudero-Hernández, 2016). Por lo tanto, el SGNC se considera un trastorno inmunomediado

caracterizado por una activación de la inmunidad innata, pero se necesitan más estudios para confirmar esto y determinar si la inmunidad adaptativa puede contribuir a su patogénesis.

El tratamiento de los trastornos relacionados con el gluten se basa en la exclusión de los cereales que contienen gluten de la dieta. Se debe hacer un seguimiento de los pacientes con entrevistas dietéticas y serología como marcadores de EC para garantizar el cumplimiento de la dieta, pero ninguno de estos métodos ofrece una medida precisa del cumplimiento de la dieta. Por lo tanto, se han desarrollado nuevas herramientas basadas en la determinación de GIP en heces y orina para un mejor seguimiento del cumplimiento de la DSG de una manera menos subjetiva y no invasiva.

Potencial inmunogénico de variantes de epítipo de α -gliadina

El trigo es uno de los cereales más cultivados en el mundo y constituye una fuente importante de energía, proteínas y fibra en la dieta. La creciente demanda mundial de trigo y su posterior consumo, con una producción anual de alrededor de 750 millones de toneladas, se debe a sus propiedades viscoelásticas únicas para su inclusión en productos alimenticios y a la industrialización y occidentalización (Shewry y Hey, 2015; Ozuna y Barro, 2018). El trigo ha evolucionado a través de la alopoliploidización, es decir, a través de la hibridación entre especies de los géneros *Aegilops* y *Triticum*, seguido de la duplicación del genoma (Feldman y Levy, 2012).

La principal especie de trigo que se cultiva en todo el mundo es el hexaploide *T. aestivum*, generalmente llamado trigo "común" o "pan". En términos de producción total, la siguiente variedad importante es el trigo duro tetraploide (*T. turgidum* L. subsp. *Durum* Desf.). Esto se adapta a climas secos y calientes y se usa ampliamente para la producción de pasta. Las especies de trigo común representan casi el 94% de la producción total, con el trigo duro representando el 5%, y otras formas de trigo alrededor del 1% (Petersen *et al.*, 2006; Arzani *et al.*, 2007).

Aunque el trigo siempre ha sido reconocido como un alimento fundamental, ciertas personas no pueden tolerar este cereal, ya que es responsable de patologías significativas, llamadas trastornos relacionados con el gluten, como la EC, la AT, la SGNC, ataxia al gluten y dermatitis herpetiforme (Ludvigsson *et al.*, 2013). Las proteínas del gluten son ricas en residuos de prolina y glutamina, lo que las hace resistentes a ser completamente digeridas en la vía gastrointestinal. La digestión parcial del gluten genera péptidos pequeños que provocan trastornos autoinmunes en personas celíacas. El

modelo más aceptado para explicar la inmunopatogénesis EC es el modelo de dos señales (Brandtzaeg, 2006) caracterizado por una primera respuesta inmune innata seguida de una respuesta adaptativa secundaria específica de antígeno. Según este modelo, ciertos péptidos, como el péptido de gliadina de 19 mer, desencadenan una respuesta inmune innata (Maiuri *et al.*, 2003) caracterizada principalmente por la producción de IL-15 por las células epiteliales. El resultado es la ruptura de la barrera epitelial, al aumentar la permeabilidad e inducir la apoptosis de los enterocitos (Maiuri *et al.*, 2000). Como consecuencia, los péptidos inmunoadaptativos, como el 33-mer, ahora pueden alcanzar la lámina propia donde son desaminados por la transglutaminasa tisular (tTG2). Tal desamidación proporciona una carga negativa a los péptidos de gliadina y, por lo tanto, aumenta su afinidad para unirse dentro del enlace HLA-DQ2 / 8, que también es el 'gen de susceptibilidad' en CD, expresado en la superficie de las células dendríticas (DC) (Qiao *et al.*, 2004; Ráki *et al.*, 2006; Tollefsen *et al.*, 2006) Las DC son, por lo tanto, centrales en la patogénesis de la EC, ya que presentan un antígeno de gluten para las células T (Bernardo, 2013), lo que impulsa la progresión de la respuesta inmune adaptativa específica del antígeno proinflamatorio, que se convertirá en la sintomatología de la enfermedad.

En trabajos anteriores, la secuenciación de próxima generación y la secuenciación de Sanger de α -gliadinas de los trigos diploides y poliploides proporcionaron seis tipos de α -gliadinas con grandes diferencias en sus frecuencias. Los epítomos canónicos de CD y sus variantes se identificaron en los diferentes tipos de α -gliadinas (Ozuna *et al.*, 2015). En el capítulo 4, utilizamos los datos de secuencia obtenidos en (Ozuna *et al.*, 2015), y ahora nos hemos extendido explorando la abundancia de diferentes DQ2.5-glia- α 1, DQ2.5-glia- α 2 y DQ2.5-glia-variantes del epítomo α 3 por especie en trigos diploides y poliploides. Además, de estudiar el potencial inmunogénico de estas variantes de epítomos en especies de trigo probando su capacidad de unión a anticuerpos monoclonales anti-33-mer (moAbs) e induciendo la proliferación de células T. Nuestro estudio mostró que los epítomos canónicos DQ2.5-glia- α 1 y DQ2.5-glia- α 3 fueron más frecuentes que DQ2.5-glia- α 2. La modificación natural más abundante se encontró en el dominio DQ2.5-glia- α 3 en todas las secuencias estudiadas. Sin embargo, esta variante disminuyó su inmunogenicidad con respecto al epítomo canónico. Por otro lado, una de las variantes más representativas de DQ2.5-glia- α 2 (40%) mostró una inmunogenicidad equivalente al epítomo canónico. Nuestros resultados proporcionaron un enfoque racional para la introducción o selección de sustituciones de aminoácidos naturales para eliminar la toxicidad de tres epítomos de células T de α -gliadina, manteniendo las propiedades tecnológicas del trigo comercial.

Los resultados obtenidos sobre el potencial inmunogénico de las α -gliadina supone un paso más en el conocimiento de las fracciones que pueden ser tóxicas para los pacientes celíacos. Esto podría ayudar, en un futuro, a la obtención variedades de trigo más saludables y con menor contenido en gluten tóxico para el colectivo celíaco. Este hecho resultaría de gran valor para los pacientes celíacos desde un punto de vista nutricional, permitiendo mejorar la calidad de vida de este colectivo.

Validación clínica de un biomarcador para el seguimiento del paciente celíaco

Un tercio de los pacientes con EC se exponen al gluten a pesar de los mejores esfuerzos para realizar modificaciones en la dieta (Barratt *et al.*, 2011; Matoori *et al.*, 2013; Commino *et al.*, 2016; Moreno *et al.*, 2017). Además, del 36% al 55% de los pacientes que confirman la adhesión completa a una DSG no logran la remisión histológica, posiblemente debido a lapsos involuntarios en su ingesta diaria de gluten (Hall *et al.*, 2013; Tio *et al.*, 2012; Stoven *et al.*, 2012; Matoori *et al.*, 2013). La prevalencia de atrofia vellositaria persistente ha cambiado con el tiempo, hay mayores tasas de recuperación en los últimos años. Las diferencias sociales asociadas con la atrofia persistente sugieren que el acceso a una DSG y / o educación sobre un DSG afecta la recuperación de la mucosa (Lebwohl *et al.*, 2014). Actualmente, los métodos para evaluar la adherencia a la DSG comprenden un cuestionario dietético, serología o síntomas clínicos; sin embargo, ninguno de estos métodos genera una medida directa o precisa de la adherencia a la dieta. La biopsia del intestino delgado es el método "estándar de oro" para el diagnóstico de EC. Sin embargo, de acuerdo con la mayoría de las guías clínicas, su papel en el seguimiento de los pacientes se limita a los casos que involucran una falta de respuesta clínica o la recurrencia de los síntomas (Husby y Bai, 2019; Lähdeaho *et al.*, 2011; Sharkey *et al.*, 2013; Silvester *et al.*, 2017; Ludvigsson *et al.*, 2014).

La validación de nuevas técnicas de diagnóstico menos invasivas y asequibles podría mejorar la identificación de los pacientes celíacos que están expuestos regularmente al gluten (voluntaria o involuntariamente) mientras siguen una DSG. Los anticuerpos monoclonales que pueden ayudar a detectar de manera sensible y específica los péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) se han utilizado en el desarrollo de inmunoensayos para la detección del consumo inadvertido de gluten mediante la medición de GIP en muestras humanas (heces y orina) (Comino *et al.*, 2016; Moreno *et al.*, 2017; Comino *et al.*, 2012; Comino *et al.*, 2019; Gerasimidis *et al.*, 2018; Roca *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2019; Cebolla *et al.*, 2018). En el capítulo 5 nuestro objetivo en este

estudio fue evaluar no solo la utilidad clínica de medir las concentraciones de GIP en orina como un biomarcador de cumplimiento de la dieta en pacientes celíacos en comparación con otros métodos alternativos, sino también acceder a su utilidad como predictor de actividad histológica.

En nuestro estudio, encontramos que una cuarta parte de la cohorte a DSG presentaba lesiones duodenales tipo Marsh II-III. Según nuestros resultados, entre el 60% y el 80% de estos pacientes habrían pasado por alto si hubiéramos considerado solo los resultados de la serología, los síntomas o las puntuaciones del cuestionario y no hubiéramos realizado una biopsia duodenal. Los posibles efectos adversos acumulados en el futuro en estos pacientes con daño histológico podrían no haberse atribuido al consumo de gluten, y otras pruebas alternativas se habrían prescrito de manera improductiva para detectar otras etiologías (Comino *et al.*, 2016; Moreno *et al.*, 201; Ludvigsson *et al.*, 2014; Comino *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2019).

En los pacientes celíacos de reciente diagnóstico, es decir, que aún no comenzaron una DSG, las concentraciones de GIP en orina fueron significativamente más altas que en los pacientes que ya estaban a DSG. Sin embargo, en este grupo, había cuatro pacientes con concentraciones inferiores al LQ, confirmando que muchos pacientes eliminan o reducen el gluten en su dieta antes de completar las pruebas de diagnóstico, cuando sospechan que pueden ser celíacos, lo que dificulta llegar a un diagnóstico preciso (Comino *et al.*, 2016; Comino *et al.*, 2019). Estos resultados sugieren que, durante el diagnóstico, la medida de GIP en orina podría ayudar a verificar si se había ingerido previamente una cantidad sustancial de gluten para validar los resultados negativos de las pruebas serológicas y la ausencia de daño histológico.

En la cohorte a DSG, la determinación de GIP en tres muestras de orina en tres días diferentes dentro de la misma semana es un enfoque especialmente conveniente para confirmar la adherencia a DSG a corto plazo y parece predecir con precisión la ausencia de lesiones histológicas. Por lo tanto, el análisis de GIP en orina es un método preciso que permite la detección de la exposición a cantidades muy pequeñas de gluten. Si estas exposiciones a pequeñas cantidades de gluten no son frecuentes, no inducirían una recaída de la lesión intestinal en pacientes celíacos tratados, aunque se detectan en la orina. Además, puede haber pacientes con diferentes niveles de sensibilidad histológica cuando se exponen a las mismas cantidades de gluten. Por lo tanto, una prueba positiva de GIP no se usa para predecir la presencia de daño histológico durante el seguimiento del paciente, sino para detectar exposiciones inadvertidas al gluten, lo que nos permite planificar una intervención dietética.

Los resultados obtenidos mostraron que aproximadamente el 58% de los pacientes a DSG fueron expuestos a cantidades de gluten, detectables por los resultados positivos de GIP en orina, pero solo el 16% de ellos presentaron resultados serológicos positivos. Esta baja sensibilidad de las pruebas serológicas en el seguimiento a la adherencia de la DSG pudo deberse a que los pacientes no exhibieron concentraciones positivas de anti-tTG nuevamente en la ingestión de pequeñas cantidades de gluten (Comino *et al.*, 2016; Silvester *et al.*, 2017; Ludvigsson *et al.*, 2014; Gerasimidis *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2019; Kelly *et al.*, 2015). Por otro lado, menos de un tercio de los pacientes que estuvieron expuestos al gluten informaron haber experimentado síntomas, dato similar a los resultados de otros estudios sobre la enfermedad celíaca no sensible (Dewar *et al.*, 2012). Por lo tanto, ni el hecho de que los pacientes permanecieran asintomáticos, ni el hecho de que tuvieron resultados serológicos negativos implicaron que no habían consumido gluten y que no corrían el riesgo de desarrollar lesiones histológicas y complicaciones como resultado de su condición.

En nuestro estudio, no encontramos una concordancia entre los resultados del cuestionario CDAT y las exposiciones al gluten de los pacientes, basadas en la detección de GIP en orina que es una medida objetiva de la ingesta real de gluten a corto plazo. A partir de estos resultados y de publicaciones anteriores, parece que medir la concentración de GIP en orina es un enfoque complementario efectivo para las evaluaciones de dietistas.

Teniendo en cuenta la cinética de la eliminación de GIP en orina (descrita por Comino *et al.* 2012 y Moreno *et al.* 2017), en este estudio, tres muestras de orina por paciente, agrupadas entre el fin de semana (sábado y domingo) y el día de la cita médica del paciente, fueron recogidos. Esta estrategia tenía dos objetivos: primero, detectar el gluten consumido durante un período significativo de la semana y segundo, incluir los días en que se espera que las personas consuman alimentos fuera de su hogar con más frecuencia. Los resultados revelaron que hubo aproximadamente un aumento del 30% en las transgresiones dietéticas durante el fin de semana en comparación con el día de la cita.

Con el fin de determinar la validez estadística de medir las concentraciones de GIP como un biomarcador de lesiones histológicas, se determinaron el NPV, PPV, la especificidad y la sensibilidad de la medida de GIP en orina. Se demostró que la medida de GIP en orina en 3 días de la semana, incluido el fin de semana, podría ser la mejor opción para confirmar la adherencia a GFD a corto plazo, y el alto valor predictivo

confirmó que la recuperación de la mucosa intestinal había sido efectiva (96.87 (83,78, 99,92), VPN). Una sola prueba fecal de GIP podría ser más sensible que una sola prueba de GIP de orina porque el intervalo de tiempo para la detección de GIP sería mayor y podría evitarse la posibilidad de que el paciente se adhiriera a un GFD solo para la visita médica (Comino *et al.*, 2016; Comino *et al.*, 2012; Comino *et al.*, 2019) Sin embargo, la mayoría de los laboratorios y pacientes clínicos prefieren recolectar y manipular muestras de orina, incluso si hay más muestras para analizar.

La validación de GIP en orina como un biomarcador de la ausencia del daño intestinal en pacientes celíacos tratados, es un método sensible, clínicamente probado para el seguimiento de pacientes celíacos. Con este biomarcador se puede evitar biopsias invasivas para determinar la recuperación de la mucosa intestinal en estos pacientes. Este novedoso procedimiento parece ser la herramienta más fiable, no solo para predecir el cumplimiento correcto de la adherencia a la DSG, sino para el seguimiento del estado de la enfermedad. Además, La determinación de GIP en orina ha sido propuesta por primera vez en un algoritmo de seguimiento del paciente celíaco.

REFERENCIAS

- Arzani, A.; Ashraf, M.** (2017). Cultivated Ancient Wheats (*Triticum* spp.): A Potential Source of Health-Beneficial Food Products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 16, 477–488.
- Barratt, S.M., Leeds, J.S., Sanders, D.S.** (2011). Quality of life in coeliac disease is determined by perceived degree of difficulty adhering to a gluten-free diet, not the level of dietary adherence ultimately achieved. *J Gastrointest Liver Dis*; 20:241–5.
- Bernardo, D.** (2013). Human intestinal dendritic cells as controllers of mucosal immunity. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 105, 279–290.
- Brandtzaeg, P.** (2006). The changing immunological paradigm in coeliac disease. *Immunol. Lett.*, 105, 127–139.
- Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D.A., De Giorgio, R., Catassi, C., Fasano, A.** (2019). Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med*; 17:1–20.
- Cebolla, Á., Moreno, M.L., Coto, L., Sousa, C.** (2018). Iuten immunogenic peptides as standard for the evaluation of potential harmful prolamins content in food and human specimen. *Nutrients*; 10:1–16.

Comino, I., Fernández-Bañares, F., Esteve, M., Ortigosa, L., Castillejo, G., Fombuena, B., Ribes-Koninckx, C., Sierra, C., Rodríguez-Herrera, A., Salazar, J.C., Caunedo, Á., Marugán-Miguelsanz, J.M., Garrote, J.A., Vivas, S., Lo Iacono, O., Nuñez, A., Vaquero, L., Vegas, A.M., Crespo, L., Fernández-Salazar, L., Arranz, E., Jiménez-García, V.A., Montes-Cano, M.A., Espín, B., Galera, A., Valverde, J., Girón, F.J., Bolonio, M., Millán, A., Martínez Cerezo, F., Guajardo, C., Alberto, J.R., Rosinach, M., Segura, V., León, F., Marinich, J., Muñoz-Suano, A., Romero-Gómez, M., Cebolla, Á., Sousa, C. (2016). Fecal Gluten Peptides Reveal Limitations of Serological Tests and Food Questionnaires for Monitoring Gluten-Free Diet in Celiac Disease Patients. *Am J Gastroenterol*; 111:1456–1465.

Comino, I., Real, A., Vivas, S., Síglez, M.Á., Caminero, A., Nistal, E., Casqueiro, J., Rodríguez-Herrera, A., Cebolla, A., Sousa, C. (2012). Monitoring of gluten-free diet compliance in celiac patients by assessment of gliadin 33-mer equivalent epitopes in feces. *Am J Clin Nutr*; 95:670–677.

Comino, I., Segura, V., Ortigosa, L., Espín, B., Castillejo, G., Garrote, J.A., Sierra, C., Millán, A., Ribes-Koninckx, C., Román, E., Rodríguez-Herrera, A., Díaz, J., Silvester, J.A., Cebolla, Á., Sousa, C. (2019). Prospective longitudinal study: use of faecal gluten immunogenic peptides to monitor children diagnosed with coeliac disease during transition to a gluten-free diet. *Aliment Pharmacol Ther*; 49:1484–1492.

Costa, A.F., Sugai, E., Temprano, M.P., Niveloni, S.I., Vázquez, H., Moreno, M.L., Domínguez-Flores, M.R., Muñoz-Suano, A., Smecuol, E., Stefanolo, J.P., González, A.F., Cebolla-Ramírez, Á., Mauriño, E., Verdú, E.F., Bai, J.C. (2019). Gluten immunogenic peptide excretion detects dietary transgressions in treated celiac disease patients. *World J Gastroenterol*; 25:1409–1420.

Dewar DH, Donnelly SC, McLaughlin SD, Johnson MW, Ellis HJ, Ciclitira PJ. (2012). Celiac disease: management of persistent symptoms in patients on a gluten-free diet. *World J Gastroenterol*; 18:1348–1356.

Elli, L., Branchi, F., Tomba, C., Villalta, D., Norsa, L., Ferretti, F., Roncoroni, L. (2015). Maria Teresa Bardella Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World J Gastroenterol*; 21(23): 7110-7119

Escudero-Hernández, C., Peña, A., Bernardo, D. (2016). Immunogenetic Pathogenesis of Celiac Disease and Non-celiac Gluten Sensitivity. *Curr Gastroenterol Rep*, 18, 36.

Feldman, M.; Levy, A.A. (2012). Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. *Genetics*, 192, 763–774.

Gerasimidis, K., Zafeiropoulou, K., Mackinder, M., Ijaz, U.Z., Duncan, H., Buchanan, E., Cardigan, T., Edwards, C.A., McGrogan, P., Russell, R.K. (2018). Comparison of clinical methods with the faecal gluten immunogenic peptide to assess gluten intake in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*; 67:356–360.

Grupo de trabajo del Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. (2018). Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Servicio de Evaluación del Servicio Canario de la Salud (SESCS)

Hall, N.J., Rubin, G.P., Charnock, A. (2013). Intentional and inadvertent non-adherence in adult coeliac disease. A cross-sectional survey. *Appetite*; 68:56–62.

Husby, S., Bai, J.C. (2019). Follow-up of Celiac Disease. *Gastroenterol Clin North Am*; 48:127–136.

Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I. R., Mearin, M. L., Phillips, A., Shamir, R., Troncone, R., Giersiepen, K., Branski, D., Catassi, C., Lelgeman, M., Mäki, M., Ribes-Koninckx, C., Ventura, A., Zimmer, K. P., ESPGHAN Working Group on Coeliac Disease Diagnosis; ESPGHAN Gastroenterology Committee; European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. (2012). European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatric Gastroenterol Nutr*, 54, 136-160.

Jabri, B. and Sollid, L. M. (2006). Mechanisms of disease: immunopathogenesis of celiac disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol*, 3, 516-525.

Kasarda, D. (2013). Can an increase in celiac disease be attributed to an increase in gluten content of wheat as a consequence of wheat breeding? *J Agric Food Chem*, 61, 1155-1159.

Kelly, C.P., Bai, J.C., Liu, E., Leffler, D.A. (2015). Advances in diagnosis and management of celiac disease. *Gastroenterology*;148: 1175–1186.

Lähdeaho, M.L., Mäki, M., Laurila, K., Huhtala, H., Kaukinen, K. (2011). Smallbowel mucosal changes and antibody responses after low- and moderate-dose gluten challenge in celiac disease. *BMC Gastroenterol*; 11:129.

Lebwohl, B., Murray, J.A., Rubio-Tapia, A., Green, P.H., Ludvigsson, J.F. (2014). Predictors of persistent villous atrophy in coeliac disease; a population based study. *Aliment Pharmacol Ther*; 39:488–495.

Leffler, D. A.; Schuppan, D. (2010). Update on serologic testing in celiac disease. *Am J Gastroenterol*, 105, 2520-2524.

Ludvigsson, J. F., Leffler, D. A., Bai, J. C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P. H., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, C. P., Leonard, J. N., Lundin, K. E., Murray, J. A., Sanders, D. S., Walker, M. M., Zingone, F., Ciacci, C. (2013). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*, 62, 43-52.

Ludvigsson, J.F., Bai, J.C., Biagi, F., Card, T.R., Ciacci, C., Ciclitira, P.J., Green, P.H., Hadjivassiliou, M., Holdoway, A., van Heel, D.A., Kaukinen, K., Leffler, D.A., Leonard, J.N., Lundin, K.E.A., McGough, N., Davidson, M., Murray, J.A., Swift, G.L., Walker, M.M., Zingone,

F., Sanders, D.S., BSG Coeliac Disease Guidelines Development Group; British Society of Gastroenterology. (2014). Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British society of gastroenterology. *Gut*; 63:1210–1228.

Ludvigsson, J.F., Leffler, D.A., Bai, J.C., Biagi, F., Fasano, A., Green, P.H., Hadjivassiliou, M., Kaukinen, K., Kelly, C.P., Leonard, J.N., Lundin, K.E., Murray, J.A., Sanders, D.S., Walker, M.M., Zingone, F., Ciacci, C. (2012). The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut*; 62(1):43-52.

Lundin, K. E. A. (2014). Non-coeliac gluten sensitivity - why worry? *BMC Med*, 23, 12-86.

Maiuri, L.; Ciacci, C.; Auricchio, S.; Brown, V.; Quarantino, S.; Londei, M. (2000). Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*, 119, 996–1006.

Maiuri, L.; Ciacci, C.; Ricciardelli, I.; Vacca, L.; Raia, V.; Auricchio, S.; Picard, J.; Osman, M.; Quarantino, S.; Londei, M. (2003). Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*, 362, 30–37.

Makharia, G. K., Catassi, C., Goh, K. L., Mulder, C. J. (2012). Celiac disease. *Gastroenterol Res Pract*, 2012, 758560.

Matoori, S., Fuhrmann, G., Leroux, J.C. (2013). Celiac disease: A challenging disease for pharmaceutical scientists. *Pharm Res*; 30:619–626.

Mitea, C., Salentijn, E.M.J, van Veelen, P., Goryunova, S.V., van der Meer, I.M., van den Broeck, C., Mujico, J.R., Montserrat, V., Gilissen, L.J.W.J., Drijfhout, J.W., Dekking, L., Koning, F., Smulders, M.J.M. (2010) A universal approach to eliminate antigenic properties of alpha-gliadin peptides in celiac disease. *PLoS One*. Dec 16;5(12):e15637

Moreno, M.L., Cebolla, Á., Muñoz-Suano, A., Carrillo-Carrion, C., Comino, I., Pizarro, Á., León, F., Rodríguez-Herrera, A., Sousa, C. (2017). Detection of gluten immunogenic peptides in the urine of patients with coeliac disease reveals transgressions in the gluten-free diet and incomplete mucosal healing. *Gut*; 66:250–257.

Morón, B., Bethune, M.T., Comino, I., Manyani, H., Ferragud, M., López, M.C., Cebolla, A., Khosla, C., Sousa, C. (2008b). Toward the assessment of food toxicity for celiac patients: characterization of monoclonal antibodies to a main immunogenic gluten peptide. *PLoS One* 3:e2294.

Morón, B., Cebolla, A., Manyani, H., Alvarez-Maqueda, M., Megias, M., Thomas, M. del C., López, M.C., Sousa, C. (2008a). 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.* 87:405-414.

Ozuna, C.V.; Barro, F. (2018). Characterization of gluten proteins and celiac disease-related immunogenic epitopes in the Triticeae: Cereal domestication and breeding contributed to decrease the content of gliadins and gluten. *Mol. Breed*, 38, 22.

Ozuna, C.V.; Iehisa, J.C.M.; Giménez, M.J.; Alvarez, J.B.; Sousa, C.; Barro, F. (2015). Diversification of the celiac disease-gliadin complex in wheat: A 33-mer peptide with six overlapping epitopes, evolved following polyploidization. *Plant J.*, 82, 794–805.

Peña, A.S. (2015). What is the best histopathological classification for celiac disease? Does it matter? *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 8(4), 239-243.

Petersen, G.; Seberg, O.; Yde, M.; Berthelsen, K. (2006). Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 39, 70–82.

Qiao, S.W.; Bergseng, E.; Molberg, O.; Xia, J.; Fleckenstein, B.; Khosla, C.; Sollid, L.M. (2004). Antigen Presentation to Celiac Lesion-Derived T Cells of a 33-Mer Gliadin Peptide Naturally Formed by Gastrointestinal Digestion. *J. Immunol*, 173, 1757–1762.

Ráki, M.; Tollefsen, S.; Molberg, Ø.; Lundin, K.E.A.; Sollid, L.M.; Jahnsen, F.L. (2006). A Unique Dendritic Cell Subset Accumulates in the Celiac Lesion and Efficiently Activates Gluten-Reactive T Cells. *Gastroenterology*, 131, 428–438.

Roca, M., Donat, E., Masip, E., Crespo Escobar, P., Fornes-Ferrer, V., Polo, B., Ribes-Koninckx, C. (2019). Detection and quantification of gluten immunogenic peptides in feces of infants and their relationship with diet. *Rev Esp Enferm Dig*; 111:106–110.

Sharkey, L.M., Corbett, G., Currie, E., Lee, J., Sweeney, N., Woodward, J.M. (2013). Optimising delivery of care in coeliac disease - Comparison of the benefits of repeat biopsy and serological follow-up. *Aliment Pharmacol Ther*; 38:1278–1291.

Shewry, P.R.; Hey, S.J. (2015). The contribution of wheat to human diet and health. *Food Energy Secur.*, 4, 178–202.

Silvester, J.A., Kurada, S., Szwajcer, A., Kelly, C.P., Leffler, D.A., Duerksen, D.R. (2017). Tests for Serum Transglutaminase and Endomysial Antibodies Do Not Detect Most Patients with Celiac Disease and Persistent Villous Atrophy on Gluten-free Diets: a Meta-analysis. *Gastroenterology*; 153:689–701.e1.

Singh, A., Pramanik, A., Acharya, P., Makharia, G.K. (2019). Non-invasive biomarkers for celiac disease. *J Clin Med*; 8:885

Soler, M., Estevez, M.C., Moreno, M.L., Cebolla, A., Lechuga, L.M. (2016). Label-free SPR detection of gluten peptides in urine for non-invasive celiac disease follow-up. *Biosens Bioelectron*; 79:158–164.

Sollid, L.M., Qiao, S.W., Anderson, R.P., Gianfrani, C., Koning, F. (2012). Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics*; 64(6):455-460.

Stoven, S., Murray, J.A., Marietta, E. (2012). Celiac Disease: advances in treatment via gluten modification. *Clin Gastroenterol Hepatol*; 10:859–862.

Tio, M., Cox, M.R., Eslick, G.D. (2012). Meta-analysis: Coeliac disease and the risk of all-cause mortality, any malignancy and lymphoid malignancy. *Aliment Pharmacol Ther*; 35:540–551.

Tollefsen, S.; Arentz-Hansen, H.; Fleckenstein, B.; Molberg, Ø.; Ráki, M.; Kwok, W.W.; Jung, G.; Lundin, K.E.A.; Sollid, L.M. (2006). HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *J. Clin. Investig.*, 116, 2226–2236.

van der Windt, D. A., Jellema, P., Mulder, C. J., Kneepkens, C. M., van der Horst, H. E. (2010). Diagnostic testing for celiac disease among patients with abdominal symptoms: a systematic review. *JAMA*, 303, 1738-1746.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

1. Las patologías relacionadas con el gluten presentan un espectro similar en cuanto a sintomatología clínica, sin embargo, existen diferencias entre ellas a nivel de su patogenia. La correcta interpretación de las pruebas diagnósticas y el adecuado conocimiento de la clínica conduce al abordaje apropiado de las mismas.
2. El tratamiento de los trastornos relacionados con el gluten se basa en la exclusión de la dieta de los cereales que contienen estas proteínas. Los pacientes con enfermedad celíaca deben someterse a una estricta dieta sin gluten para evitar complicaciones en su salud a corto y largo plazo. En contraste, en los pacientes con sensibilidad al gluten no celíaca la falta de adherencia a la dieta sólo condicionará recaídas sintomáticas. En el caso de los pacientes que padecen alergia al trigo solo se debe excluir este cereal.
3. El estudio de trigos de los géneros *Triticum* y *Aegilops* ha permitido determinar las sustituciones de aminoácidos naturales que eliminan la toxicidad de los principales epítomos capaces de estimular las células T de los pacientes celíacos, en la α -gliadina. Se ha demostrado que la introducción natural del aminoácido glutamina (Q) por histidina (H) en cualquier posición elimina la inmunogenicidad del epítomo.
4. El estudio de las variantes de los epítomos canónicos de las α -gliadinas de los trigos analizados ha demostrado que los cambios de aminoácidos más representativos son prolina (P) por serina (S) y arginina (R) por P, comprobándose que en la mayoría de los casos no conduce a la eliminación del potencial inmunogénico de la variante de epítomo.
5. La determinación de GIP en orina ha puesto de manifiesto por primera vez que el 18% de los pacientes reduce el consumo de gluten previo a diagnóstico de EC. Por lo tanto, la medida de GIP podría ayudar a verificar que se ha consumido gluten antes de considerar un resultado negativo en serología e histología.
6. El ensayo clínico de validación de GIP en orina ha demostrado que entre el 60% y el 80% de los pacientes con lesiones histológicas severas (Marsh II-III) tuvieron serología negativa, fueron asintomáticos y decían tener buena adherencia a la DSG según CDAT. Sin embargo, el 95% de estos pacientes presentaron GIP en orina.

7. La validación clínica de la determinación de GIP en orina predice la ausencia de lesión histológica con un VPN del 97% y una sensibilidad del 94% mediante recogida de tres muestras de orina en el periodo de una semana. El uso de este biomarcador ha permitido establecer por primera vez un algoritmo de seguimiento del paciente celíaco evitando la utilización de técnicas invasivas.