

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Diagnóstico de enfermedad celíaca en dieta sin gluten: análisis  
de linfocitos recirculantes en sangre periférica tras  
provocación corta con gluten**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**María Corzo Martínez**

**Directoras**

**María Concepción Núñez Pardo de Vera  
Natalia López Palacios  
Miren Garbiñe Roy Ariño**

**Madrid**

**© María Corzo Martínez, 2024**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

Diagnóstico de enfermedad celíaca en dieta sin gluten: análisis de linfocitos recirculantes en sangre periférica tras provocación corta con gluten

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Corzo Martínez

DIRECTORAS

María Concepción Núñez Pardo de Vera

Natalia López Palacios

Miren Garbiñe Roy Ariño

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA



## TESIS DOCTORAL

Diagnóstico de enfermedad celíaca en dieta sin gluten: análisis de linfocitos recirculantes en sangre periférica tras provocación corta con gluten

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA DEL HOSPITAL CLÍNICO SAN CARLOS



PROGRAMA DE DOCTORADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA PRESENTADA POR

María Corzo Martínez

DIRECTORAS

María Concepción Núñez Pardo de Vera

Natalia López Palacios

Miren Garbiñe Roy Ariño

The background features a light blue laurel wreath on the left side, partially enclosed by a large, thin, light blue circular arc that curves around it. A horizontal grey band is positioned across the middle of the page, containing the title text.

# AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas involucradas directa o indirectamente en la realización de este trabajo.

En primer lugar, a las principales responsables de su planteamiento, desarrollo y llegada a término, mis directoras de tesis: la Dra. Concepción Núñez Pardo de Vera por su inestimable dedicación e implicación, tanto a nivel profesional como personal, trabajando mano a mano conmigo, empujando cuando era necesario y aportando espacio, comprensión y paciencia cuando así lo requerí; gracias por guiarme hasta el final de este arduo camino; la Dra. Natalia López Palacios, por la aportación de la visión clínica indispensable en este proyecto y por transmitir la ilusión por su profesión y el compromiso con los pacientes; y la Dra. Miren Garbiñe Roy Ariño por trasladar sus conocimientos sobre el linfograma intraepitelial y compartir su pasión por la inmunología y la investigación.

Del mismo modo, este trabajo no habría sido posible sin la participación del Dr. Sergio Farras Villalba del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, la Dra. Eva Martínez-Ojinaga Nodal del Hospital Universitario La Paz, el Dr. Andrés Bodas Pinedo y, de nuevo, la Dra. Natalia López Palacios del Hospital Universitario Clínico San Carlos por su papel en el reclutamiento de pacientes, esencial para el desarrollo de este proyecto. Asimismo, cabe destacar la labor de las enfermeras que han efectuado la toma de muestras contribuyendo con este estudio y agradecer profundamente a cada uno de los participantes, tanto pacientes como voluntarios.

A su vez, quiero agradecer a la Unidad de Citometría de flujo del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos y al Laboratorio de Diagnóstico Hematológico, Celular e Inmunodeficiencias del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz por facilitar el uso de sus instalaciones y equipos.

También, agradezco al Servicio del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Mútua Terrassa y en especial al Dr. Fernando Fernández Bañares y a la Dra. Maria Esteve por su colaboración y apoyo en esta temática.

Igualmente, al Dr. Pedro Antonio Reche Gallardo y Dra. Marta Gómez Perosanz del Grupo de Inmunobiología Linfocitaria del Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid por su participación y asesoramiento en la realización de los estudios ELISpot.

Paralelamente, quiero agradecer a la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos y en particular al Laboratorio de Genética y bases moleculares de enfermedades complejas por haber sido mi casa durante estos tres años y medio; de nuevo, a la Dra. Concepción

Núñez Pardo de Vera y a la Dra. Elena Urcelay García por haber hecho posible mi estancia allí y a todas las compañeras que han formado parte de mi día a día, tanto las que me enseñaron a mi llegada sus conocimientos y habilidades, el gusto por el buen hacer, el pensamiento crítico y la excelencia en el desarrollo de su trabajo como a las que intenté trasladárselo cuando fue mi turno; estoy a todas agradecida por haberme hecho sentir acogida desde el primer día hasta el último; especialmente a Sara, con la que he compartido los mejores y peores momentos del doctorado, quien me ha levantado cuando he caído y viceversa, le agradezco enormemente haber formado equipo y caminado conmigo hasta el final y agradezco a la ciencia por haberme regalado su invaluable amistad.

A mi círculo más cercano, personas que, sin saberlo, han tenido un papel fundamental en la realización de este trabajo. Gracias a mi familia, a mi hermano, por ser el pilar fundamental de mi vida, escucharme, entenderme y darme consejo siempre que lo he necesitado y a mis padres, por proporcionarme espacio y tener paciencia en los peores días; a mi pareja, por aparecer en mi vida para sumar, por creer en mí y apoyarme en todo momento, y a su familia por ser un oasis de normalidad, alegría y cariño; y a mis amigos, los que están cerca y los que se sienten cerca, a pesar de no estarlo: gallegas, casafranquinos y madrileños, gracias por ser tanto fuente de desconexión como receptores de desahogos y recargar mi energía para enfrentarme a todo.

También quiero hacer una mención a las personas que me lo pusieron difícil, porque acabaron siendo el mejor entrenamiento para la paciencia y la fortaleza mental y emocional, haciéndome crecer como profesional y persona.

Y finalmente, gracias a mí misma, por no dar cabida a la rendición, pero a la vez haber aprendido a priorizarme, por querer seguir creciendo en todos los sentidos y demostrarme que soy capaz de ello.

*A mis abuelas y abuelos*



# ÍNDICE

---

GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	4
SUMMARY.....	7
INTRODUCCIÓN.....	10
1. LA ENFERMEDAD CELÍACA.....	10
2. EPIDEMIOLOGÍA.....	10
3. GRUPOS DE RIESGO .....	11
4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....	11
4.1. Manifestaciones gastrointestinales .....	11
4.2. Manifestaciones extradigestivas.....	12
4.3. Consenso de sintomatología clínica .....	12
5. ETIOLOGÍA .....	13
5.1. Factores genéticos .....	13
5.2. Factores ambientales .....	16
5.2.1. Gluten .....	16
5.2.2. Otros factores ambientales.....	16
6. PATOGÉNESIS .....	17
7. SENSIBILIDAD AL TRIGO NO CELÍACA.....	19
8. DIAGNÓSTICO (GUÍAS ACTUALES) .....	20
8.1. Serología .....	20
8.1.1. Anticuerpos anti-transglutaminasa tisular tipo 2 (ATG2) isotipo IgA.....	20
8.1.2. Anticuerpos anti-endomisio (EMA) isotipo IgA.....	21
8.1.3. Anticuerpos anti-péptidos desamidados de gliadina (PDG) isotipos IgG e IgA.....	21
8.2. Histología.....	22
8.3. Estudio genético.....	23
8.4. Linfograma intraepitelial .....	24
8.5. Provocación con gluten .....	25
8.6. Algoritmos y problemáticas diagnósticas .....	26
9. DIETA SIN GLUTEN (DSG).....	28
10. NUEVOS ABORDAJES PARA EL DIAGNÓSTICO DE EC EN DSG .....	28
10.1. Provocación corta.....	29
10.1.1. Estudios ELISpot.....	29
10.1.2. Estudios de tetrámeros.....	30
10.1.3. Estudios con citometría de masas .....	31

---

10.1.4. Ensayos de detección de citoquinas: interleukina-2 (IL-2).....	32
11. CITOMETRÍA DE FLUJO .....	32
OBJETIVOS.....	34
MATERIAL Y MÉTODOS.....	35
1. SUJETOS DE ESTUDIO.....	35
1.1. Edad adulta .....	35
1.1.1. Características demográficas y diagnósticas.....	36
1.2. Edad pediátrica .....	40
2. PROVOCACIÓN CON GLUTEN .....	40
2.1. Provocación corta.....	41
2.1.1. Recogida de muestras.....	41
2.1.2. Procesamiento de muestras .....	41
2.1.2.1. Aislamiento de PBMCs.....	42
2.1.2.2. Análisis por citometría de flujo en sangre periférica.....	43
2.1.2.3. Aislamiento de DNA mediante “salting out” .....	46
3. LINFOGRAMA INTRAEPITELIAL .....	47
3.1. Procesamiento de muestras .....	47
3.2. Análisis por citometría de flujo .....	47
4. ELISpot.....	50
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS .....	51
5.1. Análisis de la respuesta de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> y $\gamma\delta^+$ tras provocación corta .....	51
5.2. Validez interna: sensibilidad y especificidad .....	52
5.2.1. Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic).....	52
5.2.2. Sensibilidad y Especificidad.....	52
5.3. Validez externa: valores predictivos (VPP y VPN) .....	53
5.4. Razones de verosimilitud (RVP y RVN) .....	53
5.5. Variación interoperador .....	54
5.5.1. Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI).....	54
5.5.2. Gráficos de Bland-Altman .....	54
5.5.3. Gráficos de Acuerdo-Supervivencia.....	55
6. SOFTWARE DE ANÁLISIS Y RECOGIDA DE DATOS .....	55
RESULTADOS .....	56
1. RESPUESTA DE LINFOCITOS T CD8 <sup>+</sup> Y $\gamma\delta^+$ TRAS PROVOCACIÓN CORTA.....	56
1.1. Pacientes con EC .....	56
1.2. Participantes sin EC.....	60
2. VALIDEZ DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA .....	64

---

2.1.	Validez interna: sensibilidad y especificidad .....	64
2.1.1.	Curvas ROC: Selección de variable y punto de corte .....	64
2.1.2.	Clasificación de casos.....	67
2.1.3.	Cálculo de la Sensibilidad y Especificidad .....	68
2.2.	Validez externa: valores predictivos (VPP y VPN) y razones de verosimilitud (RVP y RVN) 68	
2.3.	VARIACIÓN INTEROPERADOR .....	69
2.3.1.	Coefficiente de Correlación Intraclase (CCI).....	69
2.3.2.	Gráficos de Bland-Altman .....	69
2.3.3.	Gráficos de Acuerdo - Supervivencia.....	71
3.	ESTUDIO CD62L.....	72
4.	APLICACIÓN DE LA PRUEBA PROPUESTA A PACIENTES DE PRÁCTICA CLÍNICA .....	74
4.1.	DSG autoadministrada.....	74
4.2.	Casos complejos.....	75
5.	APLICACIÓN DE LA PRUEBA PROPUESTA EN PARTICIPANTES EN EDAD PEDIÁTRICA .....	76
6.	COMPARACIÓN CON OTRAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS .....	79
6.1.	ELISpot.....	79
6.2.	Linfograma intraepitelial en DSG .....	81
	DISCUSIÓN .....	84
	CONCLUSIONES .....	97
	BIBLIOGRAFÍA.....	98



# GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ACG	<i>American College of Gastroenterology</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cells</i> (Células presentadoras de antígenos)
APC	<i>Allophycocyanin</i> (Aloficocianina)
APC/Cy7	<i>Allophycocyanin / Cyanine7</i> (Aloficocianina / Cianina7)
ATG2	Anti-transglutaminasa tisular tipo 2
AUC	<i>Area Under the Curve</i> (Área bajo la curva)
BCIP	<i>5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate</i> (5-bromo-4 -cloro-3-indolfosfato)
BV421	<i>Brilliant Violet™ 421</i>
Bx	Biopsia
CC	Caso Complejo
CCI	Coefficiente de Correlación Intraclase
CCIA	Coefficiente de Correlación Intraclase de acuerdo absoluto
CD	<i>Cluster of differentiation</i> (Grupos / antígenos de diferenciación)
Cd	<i>Crypt depth</i> (Profundidad de la cripta)
CE	Control Enfermo
CRAs	<i>Cytokine Release Assays</i> (Ensayos de liberación de citoquinas)
CS	Control Sano
CyTOF	<i>Cytometry by Time of Flight</i> (Citometría de masas por tiempo de vuelo)
d0	día 0
d6	día 6
DCG	Dieta Con Gluten
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DSG	Dieta Sin Gluten
DSGA	Dieta Sin Gluten Autoadministrada
DTT	Ditiotreitol
Dx	Diagnóstico
EC	Enfermedad Celíaca
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ácido etilendiaminotetraacético)
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> (Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)
ELISpot	<i>Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay</i> (Ensayo Inmunospot ligado a enzimas)
EMA	<i>Endomysial Antibody</i> (Anticuerpos anti-endomisio)
ESPGHAN	<i>European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition</i>
ESsCD	<i>European Society for the Study of Coeliac Disease</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> (Suero Bovino Fetal)
FITC	<i>Fluorescein IsoTioCyanate</i> (Isotiocianato de fluoresceína)
FN	Falso Negativo
FP	Falso Positivo
FS	<i>Forward Scatter</i> (Dispersión frontal)
GWAS	<i>Genome Wide Association Studies</i> (Estudios de asociación del genoma completo)
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (Solución salina equilibrada de Hanks)
HLA	<i>Human Leukocyte Antigens</i> (Antígenos leucocitarios humanos)
Id	Identificador
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleukina

LIE	Linfocito Intraepitelial
lncRNA	<i>Long non-coding Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico no codificante de cadena larga)
M0	<i>Marsh 0</i>
M1	<i>Marsh 1</i>
M2	<i>Marsh 2</i>
M3	<i>Marsh 3</i>
mAb	<i>monoclonal Antibody</i> (Anticuerpo monoclonal)
MAdCAM-1	<i>Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule 1</i> (Molécula de Adhesión Celular Adesina de Mucosas-1)
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complejo Principal de Histocompatibilidad)
MICA	<i>MHC class I Chain-related molecule A</i> (Molécula A relacionada con la cadena del MHC de Clase I)
miRNA	<i>micro Ribonucleic Acid</i>
MSD	<i>Meso Scale Discovery</i>
N	Tamaño muestral
NBT	<i>Nitro Blue Tetrazolium</i> (Nitroazul de tetrazolio)
NC	No Compatible
NKG2D	<i>Natural Killer Group 2 member D</i> (Receptor activador de células NK grupo 2, miembro D)
NO EC	No Enfermedad Celíaca
NR	No Realizada
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (Células mononucleares de sangre periférica)
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Tampón fosfato salino)
PCC	Pediátrico Caso Complejo
PDG	Péptidos Desamidados de Gliadina
PDSGA	Pediátrico con Dieta Sin Gluten Autoadministrada
PE	<i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)
PE/Cy7	<i>Phycoerythrin / Cyanine 7</i> (Ficoeritrina / Cianina 7)
PEA	<i>Proximity Extension Assay</i> (Ensayo por extensión de proximidad)
PEC	Pediátrico con Enfermedad Celíaca
PerCP/Cy5.5	<i>Peridinin-Chlorophyll-Protein / Cyanine 5.5</i> (Complejo peridinin-clorofila-proteína / Cianina 5.5)
PHA	<i>Phytohemagglutinin</i> (Fitohemaglutinina)
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i> (Característica Operativa del Receptor)
rpm	revoluciones por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i> (medio Roswell Park Memorial Institute)
RVN	Razón de Verosimilitud Negativa
RVP	Razón de Verosimilitud Positiva
SA	<i>Streptavidin</i> (Estreptavidina)
SDS	Dodecilsulfato Sódico
SFC	<i>Spot Forming Cell</i> (Célula formadora de punto)
SIBO	<i>Small Intestine Bacterial Overgrowth</i> (Sobrecrecimiento bacteriano intestinal)
SIMOA	<i>Single Molecule Array</i>
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i> (Polimorfismo de un único nucleótido)
SS	<i>Side Scatter</i> (Dispersión lateral)
STMT	Tampón Sacarosa, TrisHCl, MgCl <sub>2</sub> , Triton X-100
STNC	Sensibilidad al Trigo No Celíaca
T <sub>CM</sub>	<i>T cells Central Memory</i> (células T de la Memoria Central)

TCR $\gamma\delta$	<i>T Cell Receptor <math>\gamma\delta</math></i> (Receptor de Células T $\gamma\delta$ )
TE	Tampón Tris-EDTA
T <sub>EM</sub>	<i>T cells Effector Memory</i> (células T de la Memoria Efectora)
TG2	Transglutaminasa tisular tipo 2
Vh	<i>Villous height</i> (Altura de la vellosidad)
VN	Verdadero Negativo
VP	Verdadero Positivo
VPN	Valor Predictivo Negativo
VPP	Valor Predictivo Positivo
WGO	<i>World Gastroenterology Organisation</i>



# RESUMEN

---

***Diagnóstico de enfermedad celíaca en dieta sin gluten: análisis de linfocitos recirculantes en sangre periférica tras provocación corta con gluten.***

## Introducción

La enfermedad celíaca (EC) es un trastorno sistémico mediado por el sistema inmunológico, causado por la ingesta de gluten que afecta a individuos genéticamente susceptibles. Se caracteriza por la presencia de enteropatía, anticuerpos específicos y genética HLA-DQ compatible con la enfermedad. Presenta una prevalencia de alrededor del 1% a nivel mundial. Sin embargo, se trata de una enfermedad claramente infradiagnosticada.

El diagnóstico resulta sencillo en pacientes con sospecha por sintomatología, elevación de anticuerpos específicos en sangre y alteraciones histológicas que remiten con el establecimiento de una dieta sin gluten (DSG), actualmente, el único tratamiento disponible para la EC. Sin embargo, no todos los casos ofrecen evidencias tan claras y algunos suponen un verdadero reto diagnóstico para los profesionales, como aquellos que presentan lesiones de bajo grado o EC seronegativa. Existe también la problemática de los pacientes que, por moda o desconocimiento, retiran el gluten de su dieta sin haber sido diagnosticados. Esto imposibilita la realización de las pruebas diagnósticas actuales cuando acuden a consulta. El proceso diagnóstico de estos individuos se puede alargar considerablemente, requiriendo la realización de una prueba de provocación larga que muchos pacientes rechazan por miedo a la sintomatología clínica.

Actualmente, existen diferentes aproximaciones para intentar abordar el diagnóstico en DSG reduciendo el tiempo de exposición al gluten. Diversos estudios evidenciaron la existencia de linfocitos T de memoria que se conservan a lo largo del tiempo a pesar del mantenimiento de una DSG y pueden ser detectados en sangre periférica de pacientes con EC tras una provocación corta con gluten. Dichas células expresan el receptor de la integrina  $\beta 7$ , indicando direccionamiento a intestino, además del marcador de activación CD38.

## Objetivos

### Objetivo principal

Poner a punto un nuevo método diagnóstico para enfermedad celíaca válido para pacientes en dieta sin gluten.

### Objetivos secundarios

1. Establecer el punto de corte de la prueba propuesta y analizar su validez interna y externa.
2. Calcular la reproducibilidad de la prueba mediante el análisis de la variación interoperador.

3. Evaluar la utilidad del procedimiento descrito en la práctica clínica habitual.
4. Comparar la eficacia de la nueva prueba con la que ofrece el linfograma intraepitelial, método que se puede emplear para el diagnóstico de enfermedad celíaca en dieta sin gluten.

## Material y métodos

Se incluyeron 144 participantes adultos: 68 correspondieron a voluntarios con diagnóstico conocido (29 con EC confirmada) y 76 a pacientes sin diagnóstico concluyente. Además, se estudiaron 13 niños. Todos los participantes habían mantenido una DSG estricta durante al menos el mes previo al estudio. La provocación corta consistió en la ingesta de 10 a 14 gramos de gluten diarios durante 3 días consecutivos, realizándose dos extracciones de sangre, una previamente a la exposición y otra al sexto día de haberla comenzado. Ambas muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo y comparadas entre sí con el fin de detectar la aparición de la subpoblación de linfocitos de interés  $CD8^+$  o  $\gamma\delta^+$  con los marcadores  $CD103^+\beta7^{hi}CD38^+$ .

Se evaluó la validez interna y externa de la prueba, estableciendo un punto de corte mediante el uso de curvas ROC y calculando la sensibilidad y especificidad, los valores predictivos (VP) y las razones de verosimilitud (RV). Asimismo, se analizó la variación interoperador.

Posteriormente se valoró la aplicación de la prueba a casos de diagnóstico incierto procedentes de práctica clínica y se comparó su funcionamiento con el linfograma intraepitelial en DSG.

## Resultados

Los análisis mostraron un aumento significativo de la proporción de las subpoblaciones de interés  $CD8^+CD103^+\beta7^{hi}CD38^+$  y  $\gamma\delta^+CD103^+\beta7^{hi}CD38^+$  respecto a las poblaciones totales de linfocitos  $CD8^+$  y  $\gamma\delta^+$  al sexto día tras la provocación corta en pacientes con EC seropositiva; siendo la subpoblación  $CD8^+$  más fácilmente analizable, resultó la variable de estudio escogida. Se pudo observar que la magnitud de la respuesta era significativamente mayor en pacientes con atrofia que en aquellos con lesiones de bajo grado. Se estableció como punto de corte el valor 0,0091, proporcionando valores de sensibilidad y especificidad del 97% y 95%, respectivamente. Tanto los VP como las RV revelaron una utilidad clínica altamente relevante, y el análisis de la variación interoperador corroboró su alta reproducibilidad, mostrando un valor de CCI cercano a 1. La prueba demostró ser un apoyo a las actualmente vigentes, funcionando de manera complementaria con el linfograma intraepitelial en DSG y resultando especialmente útil para la clasificación de pacientes

con diagnóstico incierto, por lo que se propone su incorporación a la práctica clínica mediante su inclusión en el algoritmo diagnóstico.

## Conclusiones

1. La exposición a 10 g de gluten diarios durante tres días (provocación corta) induce la aparición o incremento en sangre periférica de una población de linfocitos T activados y con direccionamiento a intestino ( $CD8^+CD103^+\beta7^hiCD38^+$ ) en pacientes en dieta sin gluten que presentan enfermedad celíaca. La detección y análisis de esta población mediante citometría de flujo permite el diagnóstico de una manera sencilla, rápida y poco invasiva.
2. El método descrito muestra un valor de sensibilidad de 96,8% y de especificidad de 94,7% para el diagnóstico de enfermedad celíaca seropositiva. Además, presenta un VPP = 90,9 y un VPN = 98,2, reflejando su utilidad en la clínica.
3. Se trata de un método diagnóstico altamente reproducible, con un valor de CCI de 0,992.
4. La prueba propuesta muestra un comportamiento bastante similar al linfograma intraepitelial, exceptuando los casos de EC seronegativa, en los que el linfograma intraepitelial parece ofrecer mejores resultados y ambas pruebas pueden emplearse de manera complementaria.
5. La provocación corta con análisis en sangre periférica de los linfocitos CD8 con fenotipo de re-direccionamiento intestinal permite plantear un nuevo algoritmo diagnóstico que ofrece una alternativa a la realización de una provocación larga seguida por serología y biopsia, procedimiento rechazado por un elevado número de pacientes.



# SUMMARY

---

## ***Diagnosis of Celiac Disease on a Gluten-Free Diet: Analysis of Recirculating Lymphocytes in Peripheral Blood after Short Gluten Challenge.***

### Introduction

Celiac Disease (CD) is a systemic immune-mediated disorder caused by gluten ingestion that affects genetically susceptible individuals. It is characterized by the presence of enteropathy, specific antibodies, and HLA-DQ genetics compatible with the disease. It has a prevalence of around 1% worldwide. However, it is a clearly underdiagnosed disease.

Diagnosis is straightforward in patients with suspicion due to symptoms, elevated specific antibodies in blood, and histological alterations that resolve with the establishment of a gluten-free diet (GFD), currently the only available treatment for CD. However, not all cases provide such clear evidence, and some represent a real diagnostic challenge for professionals, such as those with low-grade lesions or seronegative CD. There is also an issue with patients who, out of fashion or lack of awareness, remove gluten from their diet without having been diagnosed. This makes it impossible to perform current diagnostic tests when they come for medical consultation. The diagnostic process for these individuals can be considerably prolonged, requiring the performance of a long-term gluten challenge that many patients reject due to fear of clinical symptoms.

Currently, several approaches aim to address the diagnosis on a GFD by reducing gluten exposure time. Various studies have shown the existence of memory T lymphocytes that are preserved over time despite the maintenance of a GFD and can be detected in the peripheral blood of CD patients after a short gluten challenge. These cells express the  $\beta 7$  integrin receptor, indicating intestine homing, along with the activation marker CD38.

### Objectives

#### Main objective

Develop a new diagnostic method for celiac disease valid for patients on a gluten-free diet.

#### Secondary objectives

1. Establish the cut-off point of the proposed test and analyse its internal and external validity.
2. Calculate the reproducibility of the test by analysing interoperator variation.
3. Evaluate the usefulness of the described procedure in routine clinical practice.
4. Compare the efficacy of the new test with that offered by the intraepithelial lymphogram, a method that can be used for the diagnosis of celiac disease on a gluten-free diet.

---

## Materials and Methods

A total of 144 adult participants were included: 68 were volunteers with a known diagnosis (29 with confirmed CD) and 76 were patients without a conclusive diagnosis. Additionally, 13 children were studied. All participants had maintained a strict GFD for at least one month prior to the study. The short challenge consisted of the intake of 10 to 14 grams of gluten daily for 3 consecutive days, with two blood extractions being performed, one before exposure and another on the sixth day after it began. Both samples were analysed by flow cytometry and compared with each other in order to detect the appearance of the CD8<sup>+</sup> or  $\gamma\delta^+$  lymphocyte subpopulation of interest with the CD103<sup>+</sup> $\beta$ 7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> markers.

The internal and external validity of the test was evaluated, establishing a cut-off point using ROC curves and calculating sensitivity and specificity, predictive values (PV), and likelihood ratios (LR). Likewise, interoperator variation was analysed.

Subsequently, the application of the test to cases of uncertain diagnosis from clinical practice was assessed, and its performance was compared with the intraepithelial lymphogram on a GFD.

## Results

The analyses showed a significant increase in the ratio of the CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> $\beta$ 7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> and  $\gamma\delta^+$ CD103<sup>+</sup> $\beta$ 7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> subpopulations relative to the total CD8<sup>+</sup> and  $\gamma\delta^+$  lymphocytes at day six after short gluten challenge in seropositive CD patients; as the CD8<sup>+</sup> subpopulation was more easily analysable, it was the study variable of choice. It was observed that the magnitude of the response was significantly higher in patients with atrophy than in those with low-grade lesions. The value 0,0091 was established as the cut-off point, providing sensitivity and specificity values of 97% and 95%, respectively. Both the PV and LR revealed a highly relevant clinical utility, and the analysis of interoperator variation corroborated its high reproducibility, showing a ICC value close to 1. The test proved to be a support for those currently in force, functioning in a complementary manner with the intraepithelial lymphogram on a GFD and proving especially useful for the classification of patients with uncertain diagnosis and therefore, its incorporation into clinical practice is proposed by including it in the diagnostic algorithm.

## Conclusions

1. Exposure to 10 g of gluten daily for three days (short gluten challenge) induces the appearance or increase in peripheral blood of a population of activated T lymphocytes homing to the intestine ( $CD8^+CD103^+\beta7^hiCD38^+$ ) in coeliac disease patients on a gluten-free diet. The detection and analysis of this population by flow cytometry allows diagnosis in a simple, rapid, and minimally invasive manner.
2. The described method shows a sensitivity value of 96.8% and specificity of 94.7% for the diagnosis of seropositive celiac disease. Furthermore, it presents a PPV of 90.9 and a NPV of 98.2, reflecting its clinical utility.
3. It is a highly reproducible diagnostic method, with a ICC value of 0.992.
4. The proposed test shows a behaviour quite similar to the intraepithelial lymphogram, except for cases of seronegative CD, in which the intraepithelial lymphogram seems to offer better results and both tests can be used in a complementary manner.
5. Short gluten challenge with peripheral blood analysis of CD8 lymphocytes with an intestinal homing phenotype allows us to propose a new diagnostic algorithm, providing an alternative to the performance of a long gluten challenge followed by serology and biopsy, a procedure rejected by a large number of patients.



# INTRODUCCIÓN

## 1. LA ENFERMEDAD CELÍACA

La enfermedad celíaca (EC) es un trastorno sistémico mediado por el sistema inmunológico, causado por la ingesta de gluten y proteínas relacionadas que afecta a individuos genéticamente susceptibles. Se caracteriza por la presencia de enteropatía, anticuerpos específicos y genética HLA-DQ compatible con la enfermedad (HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8) (1). Sus manifestaciones clínicas dependen del consumo de gluten, siendo muy variadas debido al carácter sistémico de la enfermedad; en su patrón “clásico” cursa con síntomas gastrointestinales, pero también son comunes las manifestaciones extradigestivas, especialmente en individuos que debutan en edad adulta, lo que dificulta su diagnóstico (2).

## 2. EPIDEMIOLOGÍA

La EC presenta una prevalencia de alrededor del 1% a nivel mundial, aunque se cree que ha aumentado durante los últimos 30 años y se prevé que actualmente sea más elevada (3–5). El aumento de prevalencia de la enfermedad se considera en parte debido a la mejora en las herramientas diagnósticas y a la realización de *screening* a individuos de grupos de riesgo a padecer EC (6). Sin embargo, hay que considerar que se trata de una enfermedad claramente infradiagnosticada. La heterogeneidad en la sintomatología clínica, que incluye la existencia de formas asintomáticas o subclínicas, así como la sensibilidad insuficiente de los métodos diagnósticos actuales para detectar formas de la enfermedad de bajo grado parecen estar contribuyendo mayoritariamente a este hecho (3).

La EC afecta a un rango de edad muy amplio, comprendiendo desde pacientes en edad pediátrica hasta ancianos, aunque su prevalencia en edades infantiles es mucho más elevada (1:71 frente a 1:357 en España) (7). No obstante, más del 70% de los nuevos pacientes diagnosticados superan los 20 años de edad (6). Estudios de *screening* han descrito una prevalencia similar entre hombres y mujeres (8–11). Sin embargo, la EC se diagnostica comúnmente en una relación 2:1 mujeres frente a hombres, esto se cree que es debido a la presencia de comorbilidades asociadas a la EC en una mayor proporción en la población femenina y a una mayor preocupación de este género por la obtención de un diagnóstico final (12). Aunque existe mucha variabilidad, en las guías actuales se recoge una *ratio* de prevalencia en mujeres frente a hombres desde 1:3 a 1,5:1 en función de la población de estudio (6).

### 3. GRUPOS DE RIESGO

Existen ciertos grupos de riesgo, caracterizados por presentar mayor probabilidad de padecer EC. Los familiares de primer grado de pacientes con EC presentan una prevalencia más elevada de la enfermedad, que varía entre un 5-15%, pudiendo llegar al 30% en individuos con alto riesgo genético (HLA-DQ2.5). Además de ello, existen enfermedades asociadas al desarrollo de EC, las cuales pueden ser detectadas antes, durante o después del debut (13). En la Tabla 1 se recogen los grupos de riesgo y principales enfermedades asociadas. Estos individuos pueden ser asintomáticos, sin embargo, las guías actuales permiten la realización de un cribado en sujetos asintomáticos únicamente si pertenecen a grupos de riesgo (3,6).

**Tabla 1.** Principales grupos de riesgo y enfermedades asociadas a la EC (3).

Grupos de riesgo para la enfermedad celíaca		
Familiares asintomáticos con un miembro de la familia de primer grado (padres, hijos o hermanos) con diagnóstico confirmado de enfermedad celíaca		
Pacientes con enfermedades asociadas:		
Enfermedades autoinmunes y otras inmunopatías:	Trastornos neurológicos y psiquiátricos:	Otras asociaciones:
Diabetes mellitus tipo I Tiroiditis autoinmune Déficit selectivo de IgA Enfermedad inflamatoria intestinal Síndrome de Sjögren Lupus eritematoso sistémico Enfermedad de Addison Nefropatía por IgA Hepatitis crónica autoinmune Cirrosis biliar primaria Artritis reumatoide Psoriasis, vitiligo y alopecia	Encefalopatía progresiva Síndromes cerebelosos Demencia con atrofia cerebral Leucoencefalopatía Epilepsia con calcificaciones Esquizofrenia Neuropatía periférica o ataxia	Síndrome de Down (12%) Síndrome de Williams Síndrome de Turner Fibrosis quística Enfermedad de Hartnup Cistinuria Colitis microscópica Cardiomiopatía Fibromialgia

IgA: Inmunoglobulina A

### 4. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

#### 4.1. Manifestaciones gastrointestinales

Las manifestaciones gastrointestinales que se pueden encontrar en la EC son muy diversas y difieren en función de la edad de presentación. En niños de debut muy temprano se observa con más frecuencia un cuadro clásico de la enfermedad, en el que se manifiesta dolor y distensión abdominal, diarrea, náuseas o vómitos, asociados a clínica de malabsorción. En cambio, las manifestaciones gastrointestinales en el adulto concuerdan habitualmente con un cuadro de presentación no clásica, en el que se muestran síntomas inespecíficos como pirosis, cambios en el ritmo intestinal, flatulencia o meteorismo, en ocasiones de carácter leve, y que

pueden ser confundidos con otros trastornos funcionales digestivos como el síndrome de colon irritable o la dispepsia funcional, lo que dificulta y retrasa el diagnóstico de estos pacientes (13).

#### 4.2. Manifestaciones extradigestivas

La EC es una enfermedad multisistémica por lo que no sólo se presenta con síntomas digestivos e incluso, en ocasiones, las manifestaciones extraintestinales pueden ser los únicos síntomas presentados en algunas formas de la enfermedad, principalmente en pacientes que debutan en edad adulta. Derivan en gran medida de déficits nutricionales debidos a la malabsorción de micronutrientes, fenómenos de autoinmunidad o a la actividad proinflamatoria. La malabsorción en la EC resulta del daño a la mucosa del intestino delgado, con pérdida de superficie de absorción y reducción de las enzimas digestivas (6). Las consecuencias más comunes en edad pediátrica son la pérdida de peso o el retraso en el crecimiento. En el adulto, suelen englobar alteraciones a nivel de distintos sistemas (cutáneo, hematológico, neurológico...). Unas de las manifestaciones más comunes dentro de las alteraciones hematológicas son la anemia y la ferropenia, producidas por la malabsorción de hierro o vitamina B12 o un consumo excesivo de cobalamina en un contexto de disbiosis y que se manifiestan como cansancio, fatiga o debilidad. La inflamación crónica producida por la liberación de citoquinas unida a un déficit de calcio y vitamina D, puede conllevar el desarrollo de osteopenia y osteoporosis, siendo otro de los síntomas extraintestinales más prevalentes entre los pacientes con EC. Dentro de los síntomas neurológicos más descritos asociados a la EC se encuentra la ataxia por gluten. Existen diversas afecciones dermatológicas asociadas a la EC como la psoriasis o el eczema, pero la más frecuente es la dermatitis herpetiforme (14).

#### 4.3. Consenso de sintomatología clínica

Debido a la variabilidad clínica de la enfermedad, en el año 2013 se estableció un documento de consenso (15) en el que la sintomatología clínica se clasificó de acuerdo a los siguientes patrones:

- **Patrón de presentación clásico.** Los pacientes cursan con síntomas mayoritariamente digestivos como dolor abdominal y diarrea; o extradigestivos asociados a malabsorción como pérdida de peso y fallo en el crecimiento. Aunque es la que se presenta con mayor frecuencia en niños pequeños, se ha observado que la sintomatología clásica es la menos predominante en la población.

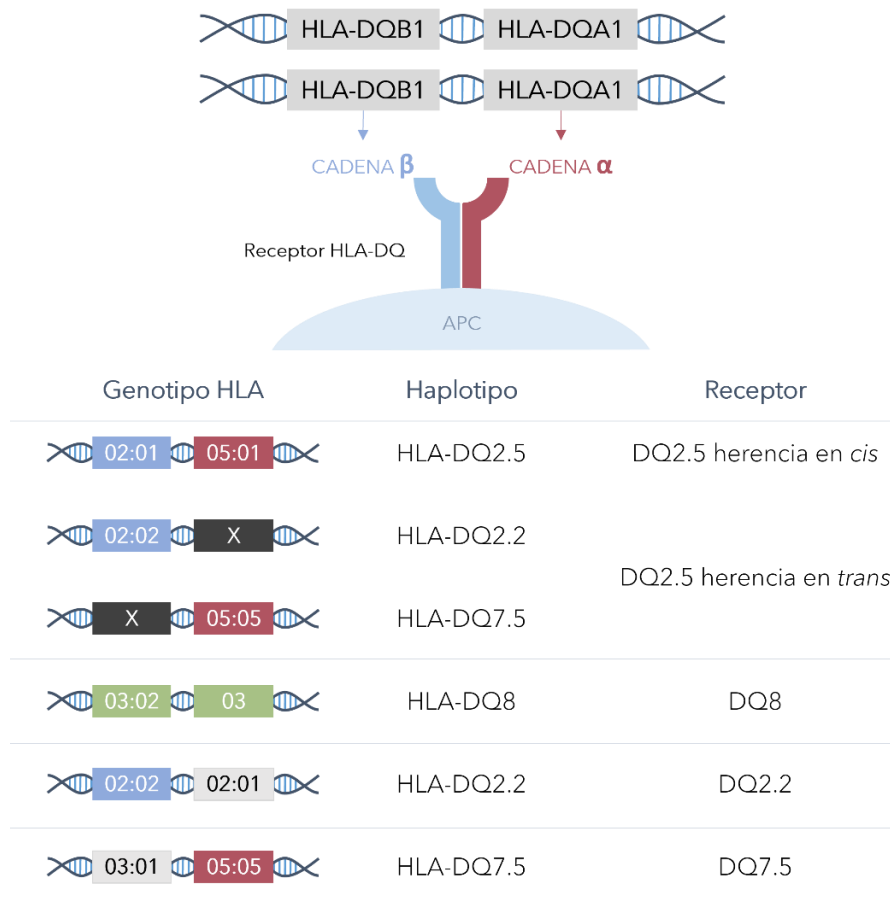
- **Patrón de presentación no clásico.** Aparece principalmente en adultos. Predominan las manifestaciones extraintestinales y en ocasiones sin síntomas digestivos.
- **Presentación subclínica.** Sin síntomas digestivos ni extradigestivos o tan leves que se encuentran por debajo del umbral de detección clínica. Por ello es común que no acudan a consulta y generalmente se trata de pacientes que han sido detectados mediante *screening* por ser familiares de primer grado de pacientes con EC o por presentar enfermedades asociadas como diabetes mellitus tipo 1, enfermedad tiroidea autoinmune o síndrome de Down.

## 5. ETIOLOGÍA

La EC se desarrolla como resultado de la interacción entre factores genéticos y ambientales (16).

### 5.1. Factores genéticos

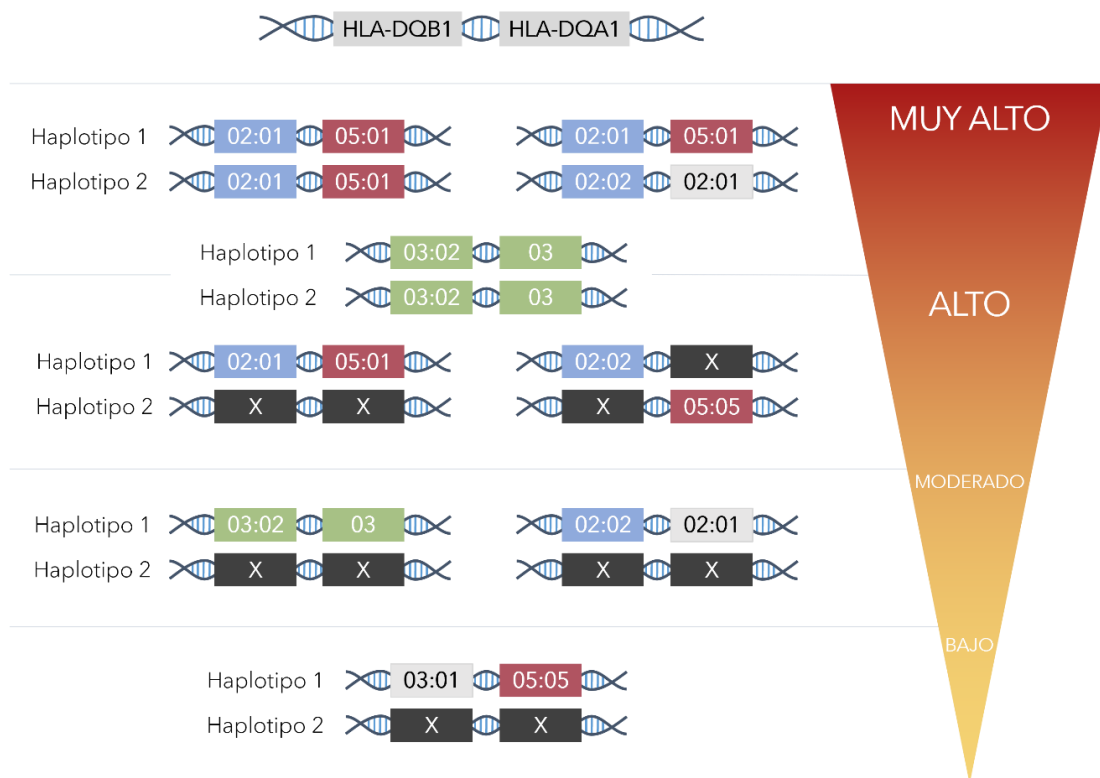
Existen diversos factores genéticos implicados en el desarrollo de la EC. Se trata de una enfermedad poligénica en la que intervienen tanto genes localizados en el complejo HLA como otros no relacionados con el mismo. El complejo HLA comprende múltiples genes que se encuentran situados en el brazo corto del cromosoma 6. El loci HLA es el determinante genético con mayor peso en la predisposición al desarrollo de esta enfermedad, en concreto los genes HLA de clase II HLA-DQA1 y HLA-DQB1. Ello se debe a que codifican los receptores HLA-DQ, que se sitúan en la membrana plasmática de las células presentadoras de antígenos (APC) y están implicados en la presentación antigénica de los péptidos derivados del gluten. Se trata de heterodímeros conformados por dos cadenas polipeptídicas ( $\alpha$  y  $\beta$ ), codificadas por los genes HLA-DQA1 y HLA-DQB1, respectivamente (Figura 1).



**Figura 1.** Formación del receptor HLA-DQ. Alelos y haplotipos que confieren susceptibilidad a la EC (17).

Los loci HLA-DQ son altamente polimórficos, existiendo numerosos alelos cuyas combinaciones se asocian a distintos niveles de susceptibilidad al desarrollo de la EC en función de la afinidad que presenten los receptores resultantes a unir péptidos del gluten. En poblaciones de ascendencia europea, aproximadamente el 90% de los pacientes con EC presentan el heterodímero HLA-DQ2.5, codificado por los alelos DQA1\*05 y DQB1\*02, pudiendo encontrarse en posición *cis* (situados en el mismo cromosoma, heredado de uno de los progenitores) formando el haplotipo DQ2.5 o en posición *trans* (situados en diferentes cromosomas, heredados uno de cada progenitor), resultante fundamentalmente de la combinación de los haplotipos DQ2.2 (HLA-DQA1\*02:01 y HLA-DQB1\*02:02) y DQ7.5 (HLA-DQA1\*05 y HLA-DQB1\*03:01). La mayoría de los pacientes con EC que no presentan dicha variante expresan el heterodímero HLA-DQ8, codificado por los alelos HLA-DQA1\*03 y HLA-DQB1\*03:02 siempre apareciendo en posición *cis*. La herencia únicamente de uno de los alelos necesarios para la formación de HLA-DQ2.5 (DQA1\*05 o DQB1\*02) comprende del 1 al 11% de los pacientes con EC, si bien es verdad que, aunque el alelo DQA1\*05 (haplotipo DQ7.5) no está siempre considerado como alelo que confiera riesgo, se ha descrito su presencia en los individuos con EC que carecen del resto de receptores, considerándose compatible con el

desarrollo de la enfermedad. La gradación del riesgo genético o susceptibilidad a padecer EC, no sólo se ve afectada por el tipo de alelo heredado, sino también por el denominado efecto de dosis: el número de copias que se reciban de cada uno de ellos (Figura 2).



**Figura 2.** Gradación del riesgo genético para la EC (17).

Además de los factores genéticos HLA-DQ, se han descrito diversas variantes genéticas asociadas al riesgo a desarrollar EC. Los estudios genómicos realizados a gran escala como los *Genome Wide Association Studies* (GWAS) y el estudio Immunochip, han descrito más de 27 variantes asociadas que explican aproximadamente el 54% de la heredabilidad de la EC (18,19), a la cual se estima que las variantes no HLA aportan un 15% aproximadamente. Sin embargo, la mayoría de las variantes genéticas asociadas con la EC se encuentran en regiones no codificantes e interpretar su papel resulta complejo, pudiendo además muchas de ellas tener efectos de manera específica en función de un tipo celular o tejido. Asimismo, los estudios de metilación realizados revelan una compleja mezcla de patrones determinados genéticamente y adquiridos ambientalmente que aún están por dilucidar por completo. Según los diferentes estudios sobre miRNA realizados tanto en biopsias intestinales como en miRNA circulantes, su expresión se encuentra alterada en pacientes con EC y se cree que podrían estar involucradas en múltiples vías que participan en la patogénesis, así como se ha visto que lo estarían también determinados lcnRNA que podrían tener una función reguladora en la expresión de otros genes a distintos

niveles, lo que concordaría con su situación cercana a muchos SNPs que han sido asociados con la EC (18).

## 5.2. Factores ambientales

### 5.2.1. *Gluten*

El gluten es una mezcla compleja de prolaminas, proteínas de reserva que se encuentran en las semillas del trigo, cebada y centeno, principalmente, y presentan un alto contenido en los aminoácidos prolina y glutamina, lo que da lugar a su nombre. El gluten del trigo está compuesto por gluteninas de alto y bajo peso molecular que conforman una red proteica que aporta elasticidad, y por gliadinas que confieren viscosidad y se subdividen en  $\alpha$ -gliadinas,  $\gamma$ -gliadinas y  $\omega$ -gliadinas. Por su parte, las prolaminas que se encuentran en la cebada y el centeno, se denominan hordeínas y secalinas, respectivamente. Debido a su alto contenido en prolina, las prolaminas del gluten son resistentes a la digestión completa por las enzimas digestivas humanas, resultando en péptidos grandes, de 20 a 50 aminoácidos, capaces de atravesar el epitelio intestinal y algunos de los cuales son susceptibles de resultar inmunogénicos, desencadenando los procesos inflamatorios asociados a la EC (20).

### 5.2.2. *Otros factores ambientales*

Además del gluten, se sabe que existen otros factores ambientales implicados en el desarrollo de la enfermedad. Entre los factores propuestos, destaca el posible papel de la microbiota intestinal y las infecciones víricas. Se han observado diferencias en las proporciones de ciertas poblaciones bacterianas a nivel intestinal entre individuos sanos y pacientes con EC, si bien es verdad que todavía no está claro si estas alteraciones están implicadas en el desarrollo de la enfermedad o son consecuencia de la misma (21,22). La microbiota intestinal puede metabolizar de una manera diferente los péptidos del gluten dejando al descubierto epítomos más inmunogénicos, o incluso actuar induciendo cambios proinflamatorios en el propio epitelio (23,24). Por otro lado, se ha estudiado también la posible implicación de distintas clases de virus en el desarrollo de la EC (25). Bouziat et al. demostraron que los reovirus son capaces de modificar la homeostasis en el intestino e inducir la pérdida de tolerancia frente a antígenos de la dieta, determinando una “impronta” que puede desencadenar una respuesta inmunitaria y proinflamatoria (26). También destaca el papel que las infecciones por enterovirus pueden tener en el desarrollo de EC (27).

## 6. PATOGÉNESIS

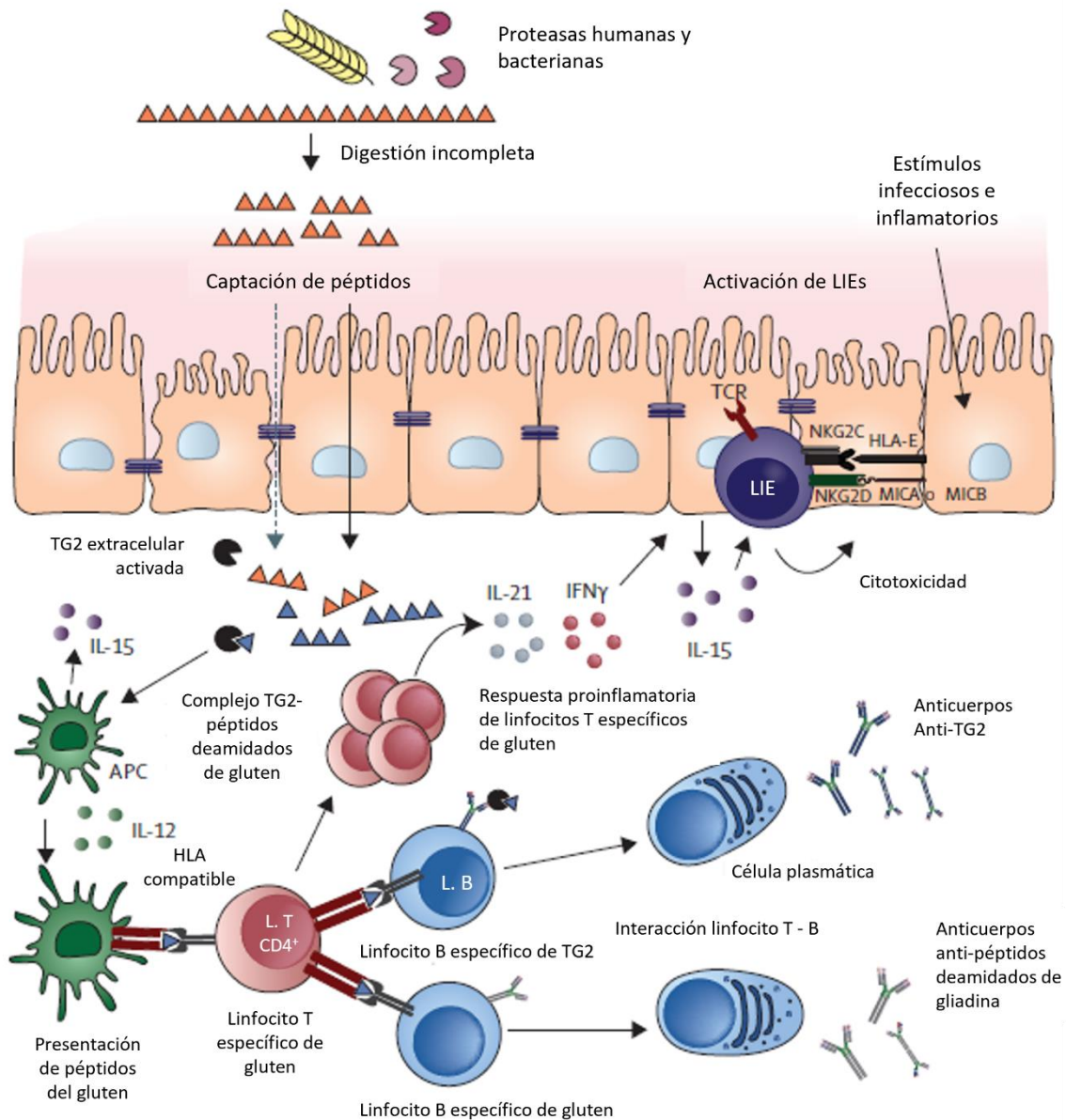
En el desarrollo de la EC entran en juego tanto la inmunidad adaptativa como la innata (Figura 3). Como se ha mencionado anteriormente, la digestión parcial del gluten provocada por su alto contenido en prolina, tiene como consecuencia la presencia de los fragmentos resultantes en el espacio luminal del intestino. Los péptidos de gluten son transportados a la lámina propia principalmente mediante mecanismos transcelulares, sin embargo, también pueden debilitar las uniones intercelulares entre enterocitos, lo cual, unido a los procesos de citotoxicidad que tienen lugar en el epitelio, favorece el aumento de la permeabilidad intestinal contribuyendo a su paso.

Es en la lámina propia donde tiene lugar la respuesta inmunitaria adaptativa (28,29). Tras la entrada de los péptidos derivados del gluten al epitelio intestinal, la enzima transglutaminasa tisular tipo 2 (TG2) actúa sobre ellos realizando una desamidación, que convierte los residuos de glutamina (Q) en glutamato (E), aportando carga negativa a la molécula y aumentando así su afinidad por las moléculas HLA-DQ. Dicha afinidad es dependiente además de la posición de estas cargas negativas, ya que son utilizadas como sitio de anclaje facilitando la unión. Los epítomos reconocidos por el receptor HLA-DQ2.5 suelen presentar los residuos de glutamato en posiciones centrales: P4, P6 o P7, mientras que en los epítomos restringidos al HLA-DQ8 suelen ocupar posiciones situadas en los extremos: P1 y/o P9. Por su parte, la afinidad de la TG2 por los péptidos del gluten también es dependiente de secuencias concretas de aminoácidos, en las que la glutamina y la prolina se encuentran separadas por uno o dos residuos (QXP, QXXP). Existen multitud de epítomos diferentes que pueden unirse a las moléculas HLA-DQ de las células presentadoras de antígeno y ser reconocidos por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de los pacientes con EC, sin embargo, algunos péptidos son capaces de hacerlo en una proporción importante de los pacientes y son por ello denominados péptidos inmunodominantes. Hasta la fecha, se han descrito multitud de péptidos inmunodominantes, siendo los más conocidos y estudiados los que se unen al HLA-DQ2.5 (20,30).

A través de la presentación antigénica mediada por las células presentadoras de antígeno (APC), los linfocitos T CD4<sup>+</sup> entran en contacto con péptidos derivados del gluten, con lo que se activan e interaccionan con linfocitos B, permitiendo la producción de anticuerpos frente al gluten y la TG2. La presencia de autoanticuerpos frente a TG2, podría ser explicada mediante la formación de un complejo hapteno-carrier (31); los linfocitos B serían capaces de internalizar complejos formados por TG2 y péptidos de gluten, presentando en su membrana los fragmentos desamidados reconocibles por los linfocitos T CD4<sup>+</sup>; se produciría entonces una activación mutua entre ambas células que permitiría la producción de anticuerpos anti-TG2 (32). Esta colaboración se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (33). Al activarse, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> producen citoquinas proinflamatorias como

IL-15, IL-21 e IFN- $\gamma$ , que además de favorecer la producción de anticuerpos por parte de los linfocitos B, regulan los procesos de citotoxicidad y destrucción del epitelio intestinal mediante la expansión de los linfocitos intraepiteliales T CD8+ y su conversión en células citolíticas (34). Asimismo, algunos péptidos parecen tener un efecto tóxico directo que condiciona en la mucosa celiaca una situación de estrés bajo la cual, se produce la expresión de MICA y la liberación de IL-15, a su vez, por parte de los enterocitos; esta citoquina proinflamatoria induce la transformación citotóxica de los linfocitos intraepiteliales (LIE) y la expresión de NKG2D mediante el cual interactúan con los enterocitos gracias a la unión a su ligando MICA, induciendo su apoptosis y pudiendo contribuir a la destrucción de las microvellosidades intestinales y el consecuente aplanamiento del epitelio característico de la EC(28,29).

Los linfocitos intraepiteliales son una población diversa de células que se encuentran en el epitelio intestinal y desempeñan un papel importante tanto en la respuesta inmunitaria defensiva contra patógenos como en la respuesta tolerogénica frente a otros antígenos (35). Una vez activados, un porcentaje de los linfocitos T pueden permanecer muchos años como células de memoria central ( $T_{CM}$ ) o efectora ( $T_{EM}$ ). Las  $T_{CM}$  se localizan en su mayoría en órganos linfoides secundarios, y aunque también pueden estar presentes en sangre o bazo, son muy escasas en tejidos no linfoides (36). Presentan la capacidad de autorrenovación homeostática prolongada en ausencia de antígeno y pueden estimular a las células dendríticas, ayudar a los linfocitos B y generar una nueva ola de células efectoras en caso de una reexposición. Carecen de función citotóxica o inflamatoria, ya que son pobres productores de citoquinas efectoras como IFN- $\gamma$  (36–38). Las  $T_{EM}$  se alojan en tejidos periféricos no linfoides (incluidos piel, pulmón, hígado, intestino y especialmente en las mucosas) y sitios de inflamación y migran entre ellos. Aunque su tasa de proliferación es baja, tienen capacidad de secreción de citoquinas efectoras como IFN- $\gamma$  activada por antígeno y presentan gránulos citotóxicos intracelulares en los que expresan granzima B y perforina, lo que les otorga una función efectora. Proporcionan una respuesta rápida en el sitio de acción actuando de primera barrera ante la reexposición (39–41).



**Figura 3.** Principales mecanismos de patogénesis implicados en la EC. (Adaptada de (29)).

## 7. SENSIBILIDAD AL TRIGO NO CELÍACA

La sensibilidad al trigo no celíaca (STNC) se caracteriza por la presencia de sintomatología clínica similar a la que se observa en pacientes con EC, que con frecuencia tienen lugar al poco tiempo de haber consumido alimentos con gluten y que desaparecen tras la retirada de estos alimentos de la dieta. No existen pruebas específicas para su diagnóstico, el cual, por tanto, requiere descartar tanto la EC como la alergia al trigo cuando el paciente todavía se encuentra manteniendo una dieta con gluten (6). Se trata de una entidad que hay que tener presente cuando se establece el diagnóstico de EC en formas seronegativas o con lesiones mucosas de bajo grado.

## 8. DIAGNÓSTICO (GUÍAS ACTUALES)

Para realizar un correcto diagnóstico de la EC existen distintas guías disponibles. En el caso de la población pediátrica, la más utilizada es la publicada por la *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN) (42), mientras que para el diagnóstico en población adulta las más destacadas actualmente son: *European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders* (6), *American College of Gastroenterology (ACG) Guidelines Update: Diagnosis and Management of Celiac Disease* (43) y *World Gastroenterology Organisation Global Guidelines (WGO)* (44). Además, a nivel nacional, se publicó en el año 2018 el *Protocolo para el diagnóstico precoz de la Enfermedad Celíaca* (3) que recoge los criterios para el diagnóstico tanto de niños como de adultos en Atención Primaria y Atención Especializada. Todas las guías publicadas a día de hoy basan el diagnóstico de individuos con sospecha clínica o grupos de riesgo, en las pruebas de serología, histología y/o genética, sin embargo, el protocolo nacional incluye como novedad el uso del linfograma intraepitelial al menos en ciertas situaciones.

### 8.1. Serología

Una característica de los pacientes con EC mientras mantienen una dieta con gluten (DCG) es la presencia de anticuerpos en sangre, cuya determinación se emplea en el diagnóstico de esta enfermedad. Se trata de una prueba poco invasiva, cuya realización actualmente se recomienda en pacientes que presentan síntomas o signos asociados a EC o como prueba de *screening* en individuos que pertenezcan a grupos de riesgo. Se debe realizar únicamente cuando el paciente se encuentre manteniendo una DCG, puesto que los anticuerpos dejan de ser detectables al retirar el gluten de la dieta, del mismo modo, se pueden obtener valores fluctuantes o en el límite de cuantificación cuando la ingesta de gluten diario del paciente es baja, por lo que el resultado se debe considerar en conjunto con el resto de las pruebas diagnósticas (6). Los test serológicos utilizados actualmente en el diagnóstico de la EC son:

#### 8.1.1. Anticuerpos anti-transglutaminasa tisular tipo 2 (ATG2) isotipo IgA

Están dirigidos frente al enzima TG2. La prueba se realizaba comúnmente mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), aunque actualmente en muchos centros comienza a ser sustituido por quimioluminiscencia. Constituye la prueba de elección en la práctica clínica tanto para despistaje o diagnóstico como para seguimiento, al tratarse de un método sencillo, barato y poco invasivo. Presentan una sensibilidad en torno al 94%, y una especificidad alrededor del 96% (42). Se deben realizar acompañados de una

determinación de la IgA total para descartar déficit selectivo de IgA, en cuyo caso se utilizará el isotipo IgG (6,45).

### 8.1.2. *Anticuerpos anti-endomisio (EMA) isotipo IgA*

Se dirigen también frente a la TG2. La prueba se realiza por inmunofluorescencia indirecta sobre cortes tisulares de esófago de primate, donde da un patrón muy característico a nivel del endomisio de la submucosa. Su sensibilidad es ligeramente menor que la de los ATG2, sin embargo, es el test serológico que presenta mayor especificidad para el diagnóstico de EC, próxima al 100% (46). A pesar de ello se suelen utilizar menos que los ATG2, ya que se trata de una técnica más cara y que presenta cierta subjetividad, lo que la hace operador-dependiente (1). Se suele utilizar el ATG2 como test inicial, y posteriormente, el EMA como confirmación si fuera necesario (6).

### 8.1.3. *Anticuerpos anti-péptidos desamidados de gliadina (PDG) isotipos IgG e IgA*

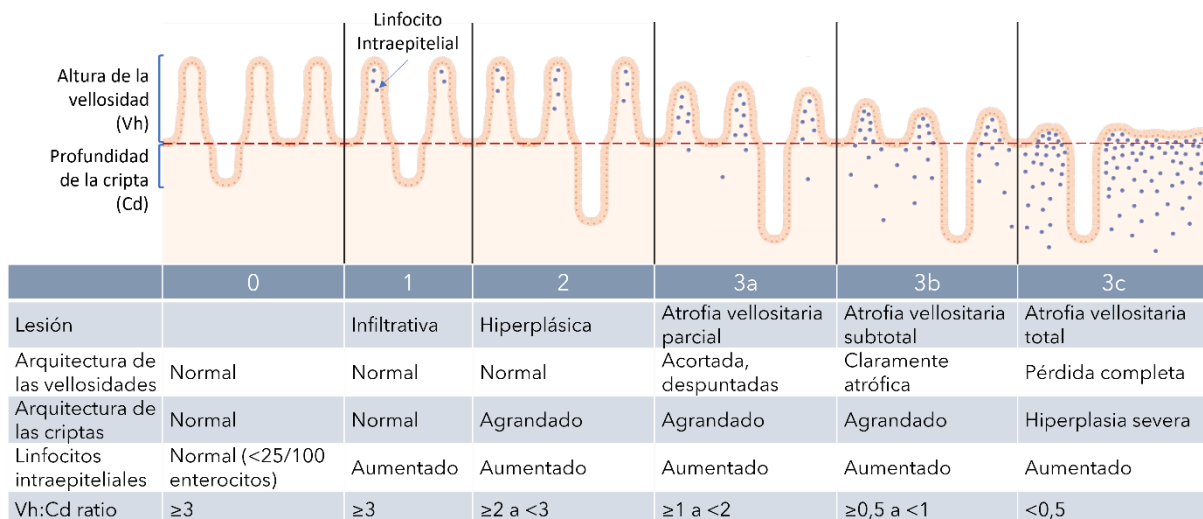
Están dirigidos a la detección de péptidos inmunodominantes desamidados por la TG2 tras la digestión de la gliadina. La técnica utilizada más frecuentemente es el ELISA, para el que se reportan valores de sensibilidad y especificidad en torno al 80-95% y 80-90%, respectivamente, siendo menores que los mostrados por los ATG2 y EMA (47). Además de ello, se ha descrito una disminución de estos valores al ser evaluados en su aplicación a la práctica clínica (48,49), lo cual refuerza la tendencia a disminuir su utilización. En la última guía diagnóstica de la EPSGHAN se desaconseja la utilización de los PDG IgA e IgG cuando la IgA sérica es normal. Únicamente se indica la realización de un test PDG IgG en los casos de déficit de IgA y resultando sólo indicativo de sospecha de EC, requiriéndose una biopsia confirmatoria(42). Por su parte, Hoerter et al. describieron que el VPP de este test tomado de manera aislada era sólo del 15%, resultando falsos positivos en el porcentaje restante, recalcando que su verdadera utilidad radicaría en su utilización en combinación con los ATG2-IgA, caso en el que estos verían aumentada su eficacia diagnóstica (6,50).

Aunque es poco frecuente, existe un porcentaje de pacientes que carecen de anticuerpos en sangre. Su prevalencia no se encuentra todavía bien definida, pero se calcula que se encuentren representando aproximadamente del 2 al 15% de la población con EC. Los criterios para confirmar su diagnóstico son la presencia de atrofia vellositaria, habiendo descartado otras posibles causas de atrofia; genética compatible HLA-DQ2 o HLA-DQ8; y la respuesta a una DSG (6,51).

## 8.2. Histología

La realización de una biopsia duodenal fue durante muchos años el patrón oro para el diagnóstico de la EC, aunque desde el año 2012 la ESPGHAN permite el diagnóstico sin biopsia en niños con anticuerpos elevados bajo ciertas circunstancias. Al igual que las pruebas serológicas, se debe realizar mientras el paciente mantiene una DCG, ya que las lesiones tienden a normalizar con el tiempo cuando éste deja de ser consumido. Se realiza una endoscopia digestiva alta en la que se valoran alteraciones macroscópicas de la mucosa duodenal y se lleva a cabo la toma de biopsias múltiples, mínimo una a nivel de bulbo y cuatro de la segunda porción duodenal debido a la existencia de lesiones parcheadas, en las que no todo el intestino se encuentra afectado y que puede conducir al análisis de un fragmento con mucosa normal. Para establecer el grado de la lesión, la clasificación más empleada es la de Marsh-Oberhuber (Figura 4), que atiende a los cambios observados en la mucosa intestinal (52,53), distinguiendo:

- **Marsh 0:** mucosa normal.
- **Marsh 1:** lesión infiltrativa con aumento de linfocitos intraepiteliales ( $\geq 25/100$  enterocitos).
- **Marsh 2:** lesión hiperplásica con aumento de linfocitos intraepiteliales y elongación de las criptas.
- **Marsh 3:** lesión destructiva que incluye (además de lo anterior) atrofia vellositaria, pudiendo ser parcial (3a), subtotal (3b) o total (3c).



**Figura 4.** Clasificación de Marsh-Oberhuber para la evaluación del grado de la lesión de la mucosa intestinal. Vh: altura de la vellosidad (*villous height*); Cd: profundidad de la cripta (*Crypt depth*). (Adaptada de (29))

Se debe tener en cuenta que las lesiones intestinales que presenta un paciente con EC no son patognomónicas y pueden coincidir con las producidas por otras afecciones como la enfermedad de Crohn, sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SIBO) o infección por

*Helicobacter pylori*, entre otras. Esto, sumado a que la evaluación de la biopsia duodenal presenta cierta subjetividad dependiente del patólogo, hace necesaria la realización de otras pruebas complementarias para concluir en un diagnóstico adecuado.

Según las guías actuales, si los títulos de ATG2 son muy elevados (superando 10 veces el límite normal), no se considera imprescindible la realización de una biopsia intestinal en pacientes en edad pediátrica con consentimiento paterno, siempre que se confirme la positividad de anticuerpos mediante el análisis de EMA en una segunda muestra (42). Quedan excluidos del diagnóstico sin biopsia los niños que presentan deficiencia de IgA o diabetes mellitus tipo I.

En adultos, es recomendable también en práctica clínica la realización de una biopsia de seguimiento para comprobar la normalización de la mucosa intestinal en pacientes con persistencia de síntomas o pacientes asintomáticos tras 2 años desde la retirada del gluten de la dieta sobre todo en casos de diagnóstico a edades avanzadas ( $\geq 40$  años) o de debut con malabsorción grave (6,43).

### 8.3. Estudio genético

Aproximadamente el 99% de los pacientes con EC presentan los heterodímeros de riesgo HLA-DQ2 o -DQ8. Su ausencia permite descartar el diagnóstico de forma bastante fiable, pero su presencia no implica confirmarlo, ya que se encuentran presentes en aproximadamente un 30-40% de la población general, por consiguiente, se trata de un factor necesario pero no suficiente para el desarrollo de la EC. La determinación del HLA como prueba diagnóstica tiene por tanto, un alto valor predictivo negativo y puede ser de utilidad para descartar la enfermedad en grupos de riesgo o casos con diagnóstico dudoso. Respecto a los grupos de riesgo, se puede llevar a cabo este estudio genético aún bajo la ausencia de síntomas (16,54,55): una genética compatible con la enfermedad supondrá la realización de pruebas serológicas periódicas, mientras que una genética no compatible descartaría la enfermedad evitando continuar con el proceso diagnóstico. En el caso de pacientes con diagnóstico incierto, como individuos con sospecha clínica pero serología negativa, lesiones histológicas de bajo grado o discrepancias entre los resultados de serología y biopsia; ante una genética no compatible, se plantearía un diagnóstico alternativo, mientras que de ser compatible, se sugieren diferentes enfoques dependiendo del caso para poder llegar a un diagnóstico concluyente. Además, el estudio genético también encuentra valor en sujetos que no responden a la DSG y en aquellos que decidieron adoptarla

por iniciativa propia, antes de obtener un diagnóstico final. (56) En estos casos, sólo los pacientes con genética compatible continúan el estudio de despistaje de EC.

#### 8.4. Linfograma intraepitelial

Los LIE representan en torno al 5-15% de las células del epitelio duodenal (57); y en un individuo sano aproximadamente el 70% corresponden a linfocitos T (LIE CD3<sup>+</sup>), mientras que la porción restante (LIE CD3<sup>-</sup>) habitualmente se halla en torno al 20% en adultos y al 40% en niños. Sin embargo, un hecho característico de la EC es la infiltración del epitelio intestinal por linfocitos que son activados durante la respuesta inmunitaria ante la ingesta de gluten. Se corresponde con un estadio inicial de linfocitosis histopatológica que se detecta como un aumento de la población de LIE CD3<sup>+</sup> en la mucosa intestinal de pacientes con EC activa, además de esto, la subpoblación CD3<sup>+</sup>TCRγδ<sup>+</sup> pasa con frecuencia a representar en torno al 20-30% de ella, cuando la proporción habitualmente presentada en individuos sanos no supera el 10%; por el contrario, la población de LIE CD3<sup>-</sup> disminuye su presencia considerablemente hasta valores menores al 10% (35).

El descenso en la población CD3<sup>-</sup> se considera un marcador de integridad de la mucosa, no siendo por tanto específico de la EC. Tras el establecimiento de la DSG, la proporción de LIE CD3<sup>-</sup> se va reestableciendo a medida que desaparecen las lesiones intestinales y se produce la normalización de la mucosa. Sin embargo, el aumento en la proporción de LIE TCRγδ<sup>+</sup> es un marcador característico de la enteropatía celíaca. Esta subpoblación suele mantenerse elevada en el epitelio intestinal de individuos con EC, en ocasiones años después de retirar el gluten de la dieta, sin embargo, algunos pacientes que mantienen una DSG estricta presentan valores menores al 10%, lo que haría pensar que el gluten está implicado tanto en la funcionalidad como en el número de las subpoblaciones de LIE y pequeñas transgresiones fueran las causantes del mantenimiento de esta a lo largo de los años. La contracción de la memoria efectora del compartimento mucoso por DSG estricta durante largo tiempo podría ser la razón de la falta de sensibilidad en esta prueba.

El linfograma intraepitelial analiza estos cambios en las proporciones celulares de manera sencilla mediante citometría de flujo, valorando el porcentaje de LIE respecto al total del epitelio y los porcentajes de LIE TCRγδ<sup>+</sup> y de LIE CD3<sup>-</sup> respecto al total de LIE. La metodología de esta técnica es sencilla, su principal requerimiento es un citómetro de flujo, disponible en la mayoría de los hospitales, y resulta además rápida y económica, requiriendo únicamente un fragmento de biopsia intestinal que se toma durante el mismo procedimiento de endoscopia que se realiza

por práctica clínica para el diagnóstico de EC (35,58). Los valores de sensibilidad y especificidad son elevados, aunque pueden variar entre diferentes poblaciones de estudio. En el meta-análisis realizado por el grupo de Fernández-Bañares en 2019, que englobó a 519 pacientes y 440 controles, se obtuvo una sensibilidad del 93% y una especificidad del 98% (58). En cuanto únicamente a la población pediátrica, recientemente se han descrito valores de 94% de sensibilidad y 95% de especificidad (59,60).

Este método puede resultar útil en el diagnóstico de pacientes que retiraron el gluten de la dieta previamente a la obtención de un diagnóstico concluyente debido al mantenimiento de los valores elevados de LIE TCR $\gamma\delta^+$  (61), como se pudo corroborar en el análisis sistemático realizado por Fernández-Bañares et al. que incluyó una cohorte de 200 pacientes que mantuvieron una DSG durante un tiempo medio de 5 años (58). Al distinguir patrones distintivos de la EC, puede descartar casos de STNC aunque ya se encuentren en DSG y además, es capaz de detectar casos de EC potencial, caracterizada por serología positiva sin la existencia de atrofia. Actualmente en España se utiliza de manera rutinaria en muchos hospitales y se incluyó en el Protocolo de Diagnóstico Precoz de la EC en 2018 (3). Por su parte, las guías diagnósticas de la European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) y la ESPGHAN recomiendan el análisis de LIE TCR $\gamma\delta^+$  como apoyo en casos de difícil diagnóstico (6,42). En estos casos, que incluyen pacientes que no poseen genética HLA de riesgo, en los que la serología resulta negativa o está presente a títulos bajos, o que muestran daño histológico leve que puede ser debido a otras patologías, el linfograma intraepitelial ha demostrado ser de utilidad (35,58).

### 8.5. Provocación con gluten

La prueba de provocación se realiza en pacientes que se encuentran manteniendo una DSG pero carecen de un diagnóstico firme previo, bien al no haber realizado las pruebas habituales de serología y biopsia en DCG, o bien al haber obtenido resultados poco concluyentes, como es el caso de pacientes con lesiones histológicas de bajo grado, serología negativa o resultados discrepantes entre serología e histología, que pueden hacer sospechar de otros orígenes para el daño histológico. Sin embargo, estos pacientes indican habitualmente una mejoría sintomática al eliminar el gluten de la dieta, por lo que siguen bajo sospecha de EC.

La provocación consiste en el restablecimiento de una dieta con gluten durante un período de tiempo determinado, tras el cual, se realizarán las pruebas de serología y, cuando procede, biopsia esperando la reaparición de anticuerpos en sangre y el daño histológico supuestamente inducidos por la ingesta de gluten. Actualmente no existe un consenso sobre la duración de la

provocación y la cantidad de gluten a ingerir. Se han realizado estudios valorando el efecto tanto de la utilización de diversas cantidades de gluten como de la variación del tiempo de administración. Lähdeaho et al. mantuvieron un tiempo de administración de 12 semanas y establecieron dos grupos en los que compararon la administración de una dosis baja de gluten de 1 - 3 g diarios frente a una dosis moderada de 3 - 5 g, observando daño en la mucosa del 67% de los pacientes y reaparición de anticuerpos en el 43% de los casos, independientemente de la dosis ingerida, si bien es verdad que dosis moderadas desencadenaron síntomas más severos, provocando que muchos pacientes no finalizaran el estudio (62). Posteriormente, el grupo de Leffler puso a prueba la administración de 3 a 7,5 g diarios de gluten valorando además distintos tiempos, observando cambios significativos tanto en la histología como en el recuento de LIE a día 14 del comienzo de la provocación, mientras que los anticuerpos en sangre no aumentaron considerablemente hasta el día 28, lo que ocurrió en un 55% de los casos al considerar ATG2 o 75% al tener en cuenta ATG2 y PDG (63). Se necesitan más evidencias para alcanzar un acuerdo en relación al establecimiento de una dosis de gluten y tiempo de administración estandarizados. A pesar de esto, actualmente en la práctica clínica se suele aconsejar consumir unos 10 g de gluten al día durante un período de tiempo de 6 a 8 semanas (6,43).

La provocación con gluten proporciona una solución al diagnóstico de individuos que se encuentran en DSG, sin embargo, su aplicabilidad en la práctica clínica se ve reducida ya que muchos pacientes se niegan a exponerse al gluten de nuevo durante un período de tiempo tan largo, principalmente debido al temor a sufrir una recaída clínica.

#### 8.6. Algoritmos y problemáticas diagnósticas

El diagnóstico de la EC resulta sencillo en casos en los que existe sospecha por sintomatología asociada a la enfermedad y se observa una elevación de anticuerpos específicos en sangre concordante con alteraciones histológicas que remiten con el establecimiento de una DSG. Sin embargo, no todos los casos ofrecen evidencias tan claras y algunos suponen un verdadero reto diagnóstico para los profesionales. Para facilitar el diagnóstico de los pacientes con EC se han elaborado algoritmos que guían al especialista en la toma de decisiones a lo largo del proceso. En la Figura 5, se muestra el algoritmo diagnóstico incluido en el *Protocolo de diagnóstico precoz de la Enfermedad Celíaca* para su uso en Atención Especializada.

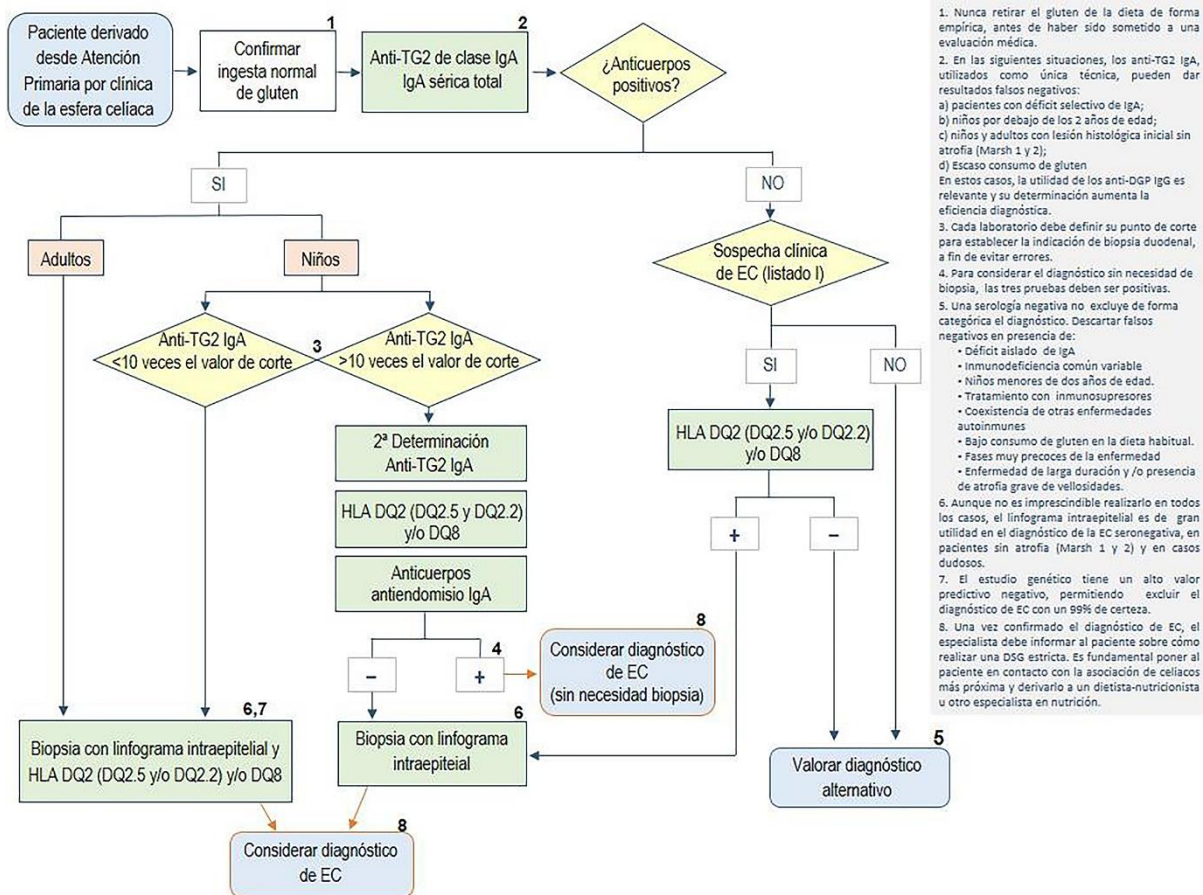


Figura 5. Secuencia de actuación diagnóstica de la EC en Atención Especializada (3).

En primer lugar, el especialista debe asegurarse de que el paciente se encuentra manteniendo una DCG en el momento de la realización de las pruebas. Esto es de vital importancia para un correcto diagnóstico, ya que los anticuerpos específicos en sangre desaparecen con la retirada del gluten de la dieta, del mismo modo que la mucosa duodenal se reestablece con el tiempo, evitando la detección de las posibles lesiones histológicas provocadas por su ingesta. Seguidamente, se realiza una determinación de ATG2 junto con una medida de los niveles de IgA totales para descartar un déficit selectivo de IgA que enmascare el resultado. Ante la obtención de una serología positiva, se realizará la biopsia duodenal exceptuando (como ya se ha mencionado) casos en edad pediátrica con valores de ATG2 IgA que superan 10 veces el punto de corte y EMA IgA positivo obtenido de una segunda muestra. En este algoritmo, se indica también la determinación del linfograma intraepitelial junto con el estudio histológico, evitando de este modo la realización de una segunda endoscopia ante una situación compleja. Ante un resultado negativo en la serología, no debe descartarse el diagnóstico de EC, ya que este tipo de pacientes conforman el 2-15% de los pacientes con EC. La EC seronegativa puede deberse a múltiples factores (Figura 5) y llegar a un diagnóstico concluyente resulta complejo debido a que las lesiones histológicas no son patognomónicas, en estos casos, el linfograma

intraepitelial supone un apoyo muy importante. El proceso diagnóstico de estos individuos se puede alargar considerablemente, requiriendo la comprobación de la remisión de los síntomas y las lesiones intestinales tras el mantenimiento de una DSG (lo cual puede extenderse de 1 a 2 años) y en ocasiones, la realización de una prueba de provocación larga seguida de una nueva determinación serológica y biopsia duodenal para verificar la recidiva (3). Del mismo modo, se encuentra la problemática de lesiones histológicas de bajo grado, que pueden encontrarse también en pacientes con STNC debido al consumo de alimentos con gluten, por lo que debe descartarse esta condición.

## 9. DIETA SIN GLUTEN (DSG)

La DSG constituye, hasta la fecha, el único tratamiento disponible para la EC. Se debe mantener de por vida y conlleva la remisión de los síntomas clínicos, la desaparición de los anticuerpos específicos y la normalización de las lesiones intestinales. El tiempo de recuperación varía entre pacientes, pero se suele alcanzar la remisión clínica a partir de dos semanas, la normalización serológica entre 6 y 12 meses, y la desaparición de las lesiones intestinales puede prolongarse dos años o más (64).

Existen pocos casos en los que los pacientes, a pesar de permanecer en DSG durante al menos 12 meses no muestran reversión de las lesiones histológicas ni remisión de síntomas asociados a la malabsorción. Se considera EC refractaria y para diagnosticarla adecuadamente es necesario corroborar la correcta adherencia del paciente a la DSG además de descartar otros posibles diagnósticos como enteropatía autoinmune o enfermedad de Crohn (3).

## 10. NUEVOS ABORDAJES PARA EL DIAGNÓSTICO DE EC EN DSG

Como ya se ha comentado, existe la problemática de los pacientes que, por moda o desconocimiento, retiran el gluten de su dieta sin haber sido diagnosticados. Esto imposibilita la realización de las pruebas diagnósticas actuales cuando acuden a consulta. Además, existen individuos en los que dada la complejidad diagnóstica se recomienda iniciar una DSG como prueba adicional a obtener un diagnóstico.

En la literatura existen diferentes aproximaciones para intentar abordar el diagnóstico en DSG reduciendo el tiempo de exposición al gluten, es decir, la duración de la provocación.

## 10.1. Provocación corta

### 10.1.1. Estudios ELISpot

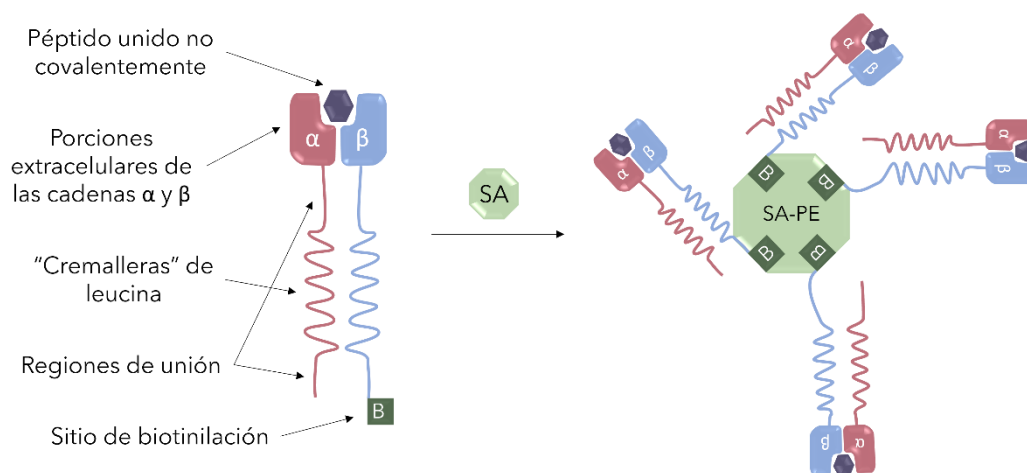
En el año 2000, el grupo de Anderson estudió la respuesta de linfocitos T extraídos de muestras de sangre periférica de pacientes con EC al estimularlos *in vitro* con diferentes péptidos de gluten con el fin de identificar epítomos inmunodominantes. Plantearon que la respuesta de estas células a la gliadina podría ser similar a la descrita en modelos de autoinmunidad e infección crónica, en los que se produce una reacción inicial a un número limitado de epítomos dominantes, seguida de un *epitope spreading*, y emplearon entonces células de pacientes extraídas durante la realización de una provocación con gluten, es decir, en los que ya se había producido el estímulo inicial. Los participantes consumieron 200 g de pan blanco diarios durante 3 días y, mediante la técnica de ELISpot, se pudo observar empleando células mononucleares aisladas de su sangre periférica (PBMCs) y estimuladas por péptidos inmunodominantes, la producción de IFN- $\gamma$ , que alcanzaba su máximo cuando se empleaban PBMCs aisladas de sangre extraída a días 6-8 del inicio de la provocación. Ya en este primer estudio, se planteó la existencia de linfocitos T de memoria que se mantenían a lo largo del tiempo a pesar del mantenimiento de una DSG probablemente en parte debido a la exposición a trazas de gluten, que son comunes incluso en alimentos etiquetados como “sin gluten” (65).

En estudios posteriores, pretendieron caracterizar esas células reactivas a la estimulación con péptidos de gliadina y, mediante la utilización de *beads* inmunomagnéticas, deplecionaron selectivamente distintas poblaciones celulares, concluyendo que las células productoras de IFN- $\gamma$  que detectaban en los ensayos ELISpot eran linfocitos T CD4<sup>+</sup> que parecían expresar además la integrina  $\alpha 4\beta 7$  (que se une a MAdCAM-1 y está asociada con el direccionamiento a la lámina propia del epitelio intestinal) y estaban restringidos por HLA-DQ, en concreto por HLA-DQ2 debido al tipo de péptidos empleado. También observaron que estas células no eran detectadas en circulación si no se había mantenido una DSG durante al menos las 2 semanas previas al estudio, tiempo tras el cual su presencia aumentaba 8 veces, y hasta 200 veces cuando se mantuvo la DSG estricta durante 8 semanas o más. Se planteó la idea de que la provocación con gluten estimulara células de memoria en el tejido linfoide asociado al intestino que se sucediera del paso de linfocitos T efectores a la sangre periférica a través del ducto torácico, lo cual concordaría con el hecho de que la secreción de IFN- $\gamma$  (observada mediante los ensayos ELISpot) es

característica de células efectoras y de memoria, mientras que las *naïve* comienzan secretando IL-2 y tardan más en adquirir esta capacidad (66).

### 10.1.2. Estudios de tetrámeros

Los multímeros o tetrámeros de HLA-DQ2.5-gliadina de clase II son una herramienta muy útil para detectar y evaluar la respuesta inmunitaria antígeno-específica. A diferencia del ELISpot o el ELISA, que se basan en una detección indirecta mediante la medida de la producción de determinadas moléculas, los tetrámeros, proporcionan una forma de detección directa de los linfocitos T que expresan una molécula TCR concreta (67). Consisten en cuatro moléculas de MHC cargadas con un único péptido y unidas a una molécula de estreptavidina que está acoplada a un marcador fluorogénico (68) (Figura 6).



**Figura 6.** Esquema de la estructura del tetrámero de HLA de clase II. SA = estreptavidina, PE = ficoeritrina (Adaptado de (69)).

En 1996 Altman et al. ingeniaron esta estructura tetramérica que daba solución al problema de la elevada tasa de disociación que presentaban los complejos existentes MHC-péptido con los TCR de los linfocitos T. Con esta nueva disposición se originaba una unión estable que permitía la visualización directa de estas células. Sin embargo, un requerimiento de esta técnica es el conocimiento previo del epítipo que es específicamente reconocido, por ello, el grupo de Quarsten et al. encontró especial utilidad en el estudio de EC, la única enfermedad autoinmune en la que se conoce el antígeno desencadenante de la reacción, el gluten, y en 2001, generaron los primeros tetrámeros DQ2-péptido específicos para tres epítopos de gliadina, consiguiendo marcar diferencialmente los linfocitos T que los reconocían (67). Esta tecnología, junto con el descubrimiento de nuevos epítopos inmunogénicos, abrió la posibilidad de utilizar los tetrámeros como herramienta diagnóstica para pacientes en DSG, mediante la tinción y detección por citometría de flujo, de la

población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> que aparece en sangre periférica en pacientes celíacos tras una provocación con gluten de tres días, obteniendo un AUC = 0,95 con una sensibilidad y especificidad del 97 y 95% respectivamente. Además, pudieron comprobar que esta población correspondía con células que expresaban un fenotipo de memoria efectora (CD62L<sup>-</sup> CD45RA<sup>-</sup>), activadas (CD38<sup>+</sup>) y con direccionamiento a intestino ( $\beta$ 7<sup>+</sup>) (70).

La utilización tanto de esta técnica como de los estudios ELISpot se encuentra restringida a pacientes HLA-DQ2 o HLA-DQ8, para los cuales se conocen numerosos péptidos inmunogénicos, pero no pueden ser utilizadas en pacientes con otra genética, que si bien es cierto que representan un pequeño porcentaje de la población celíaca, su presencia se ve aumentada cuando se consideran casos complejos o de difícil diagnóstico, siendo además estos los más proclives a haber comenzado una DSG autoadministrada debido a la demora en la obtención de un diagnóstico concluyente. Además de esto, los requerimientos técnicos y el coste económico de este procedimiento dificultan su posible implantación en la práctica clínica al no encontrarse al alcance de muchos laboratorios y hospitales.

### 10.1.3. Estudios con citometría de masas

En el año 2013, Han et al. utilizaron la citometría de masas por tiempo de vuelo (CyTOF) para caracterizar en mayor profundidad las células que surgían en sangre periférica de pacientes con EC en DSG sometidos a una provocación con gluten de 3 días. Observaron que no sólo se inducía la aparición de linfocitos T CD4<sup>+</sup> sino también de las poblaciones CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ , cuya respuesta también parecía estar mediada por TCR, indicando que era antígeno-específica, según sugirieron los análisis de expresión *single-cell*. En cuanto a la caracterización de estas poblaciones, observaron que expresaban el receptor de la integrina  $\beta$ 7, indicando direccionamiento a intestino, además del marcador de activación CD38 y carecían de la expresión de CD62L y CD45RA, lo cual evidenciaba su fenotipo de memoria efectora (71). Estudios recientes de caracterización de esta población mostraron que la población de LIE de memoria son reprogramados tras la reexposición al gluten, adquiriendo un fenotipo efector y recirculando a los 6 días de la ingestión (72).

La citometría de masas permite la visualización de hasta 40 marcadores diferentes, por lo que se trata de una herramienta muy útil para la caracterización de poblaciones celulares a nivel de investigación, sin embargo, es un método muy costoso y no al alcance de todos los laboratorios, ya que se requiere un equipamiento específico que no es comúnmente utilizado en laboratorios convencionales, por lo que su aplicación en la práctica clínica no sería viable actualmente.

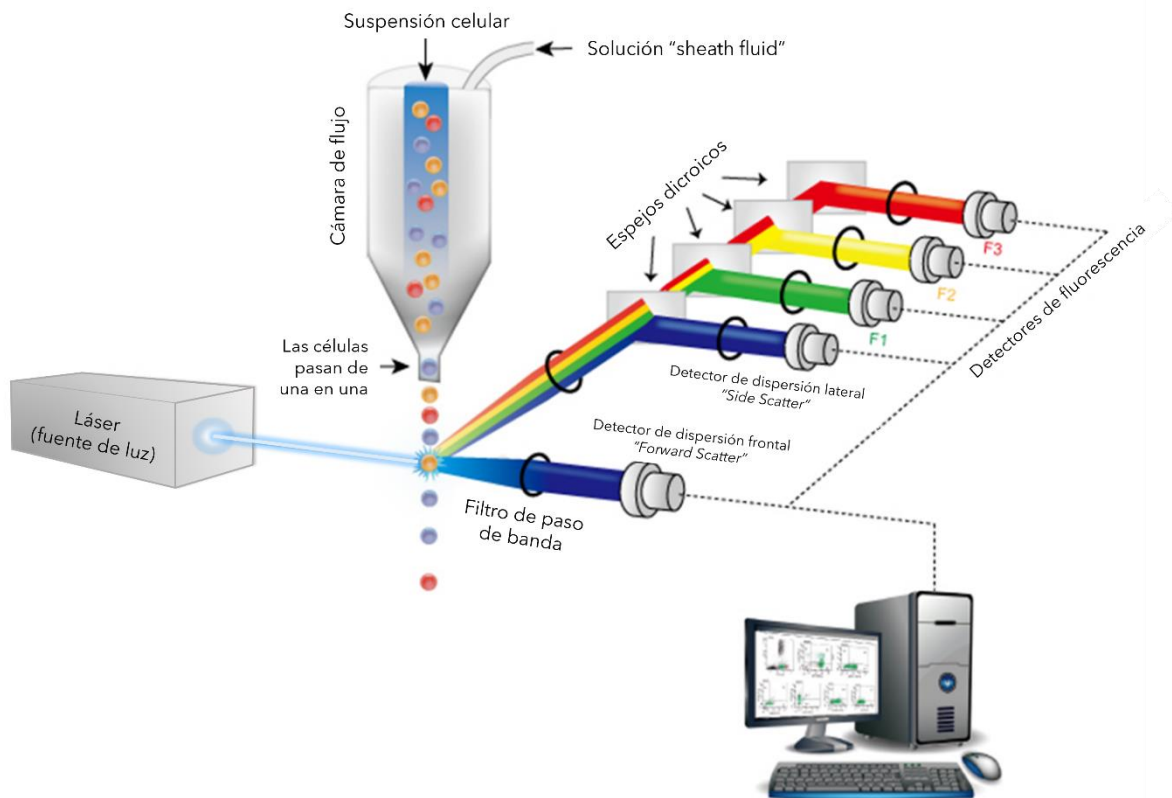
#### 10.1.4. Ensayos de detección de citoquinas: interleukina-2 (IL-2)

Existen diversas tecnologías para la detección de moléculas liberadas por las células al medio como Luminex, Meso Scale Discovery (MSD), Proximity Extension Assay (PEA) o Single Molecule Array (SIMOA) (73), que permiten el análisis de la producción de citoquinas aportando una mejorada sensibilidad con respecto a otras anteriormente utilizadas como el ELISA y resultado muy útiles en la búsqueda de nuevos biomarcadores para la EC. Inicialmente, se analizaron variaciones en los perfiles de expresión de múltiples citoquinas en muestras de pacientes tras la exposición al gluten (74). Estudios posteriores, pusieron el foco en la detección de citoquinas como posible apoyo en la monitorización y diagnóstico, en particular la IL-2, describiéndola como un marcador temprano, que aparece en plasma a las 4h de la ingesta de gluten requiriendo una única dosis y una mínima cantidad de muestra (500  $\mu$ L) (75,76). A su vez, y aunque se desconoce su implicación en la patogenia de la enfermedad, se ha asociado con la gravedad de los síntomas (77). Estudios recientes se han servido del incremento en la capacidad de detección de los métodos ultrasensibles basados en electroquimioluminiscencia mediante los cuales se han podido detectar diferencias en los niveles de IL-2 en sangre completa de pacientes con EC en DSG sin necesidad de provocación con gluten, valiéndose de la estimulación con péptidos de gliadina. Se trata de un método altamente sensible y específico para pacientes en DSG, que evita la realización de una provocación (78,79), pero con la limitación de la utilización de péptidos dependientes de la genética HLA-DQ del paciente.

## 11. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de flujo es una técnica avanzada que permite analizar y clasificar las células presentes en una muestra biológica. Esta técnica se basa en la detección de características físicas y químicas de partículas (en este caso células), mediante la medición de la dispersión y la emisión de luz cuando son sometidas a un láser. Las células deben encontrarse en suspensión en un fluido, generalmente una solución salina, y al ser adquiridas por el citómetro entran en flujo laminar, tras pasar un filtro, se disponen de manera individual para atravesar el haz de luz, obteniendo datos de su tamaño, volumen y granularidad en función de la dispersión del mismo. Además de esto, se emplean anticuerpos marcados con fluorocromos para identificar y cuantificar distintos marcadores celulares, como antígenos de superficie o proteínas intracelulares. De la misma manera, las células pasan a través del haz de distintos láseres que emiten a diferentes longitudes de onda. Cuando un determinado fluorocromo es excitado, emite una señal luminosa a una longitud de onda mayor, que es recogida por un sensor. Las señales obtenidas son procesadas y convertidas en datos digitalizados

proporcionales a la cantidad de luz emitida por cada célula (Figura 7). De esta manera, es posible obtener y cuantificar múltiples parámetros a nivel de una única célula de una población heterogénea, pudiendo identificar diferentes subpoblaciones contenidas en ella y cuantificar diferentes niveles de expresión de moléculas concretas. Esta capacidad de análisis multiparamétrico hace que la citometría de flujo sea una herramienta de gran valor en el diagnóstico de diversas enfermedades, incluyendo trastornos hematológicos, inmunodeficiencias, enfermedades autoinmunes y cáncer. Gracias a su versatilidad y precisión ha revolucionado este campo, proporcionando información valiosa para la toma de decisiones clínicas y la personalización del tratamiento. Por ello, se trata de una técnica extensamente utilizada, que se encuentra frecuentemente establecida para uso diagnóstico en muchos hospitales y laboratorios a nivel internacional (80,81).



**Figura 7.** Bases del funcionamiento de un citómetro de flujo. (Adaptada de (82)).



# OBJETIVOS

### Objetivo principal

Poner a punto un nuevo método diagnóstico para enfermedad celíaca válido para pacientes en dieta sin gluten.

### Objetivos secundarios

1. Establecer el punto de corte de la prueba propuesta y analizar su validez interna y externa.
2. Calcular la reproducibilidad de la prueba mediante el análisis de la variación interoperador.
3. Evaluar la utilidad del procedimiento descrito en la práctica clínica habitual.
4. Comparar la eficacia de la nueva prueba con la que ofrece el linfograma intraepitelial, método que se puede emplear para el diagnóstico de enfermedad celíaca en dieta sin gluten.



# MATERIAL Y MÉTODOS

## 1. SUJETOS DE ESTUDIO

Se incluyeron 157 participantes, 144 adultos y 13 niños, mayoritariamente reclutados en el Hospital Universitario Clínico San Carlos, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz y Hospital Universitario La Paz (Madrid) durante 7 años (septiembre de 2014 a septiembre de 2021). Un número reducido de participantes se reclutó a través de llamamiento a través de Asociaciones de pacientes u otro medio de difusión del proyecto. Para poder evaluar la precisión diagnóstica, se emplearon algunos datos correspondientes a pacientes procedentes del Hospital Universitari Mutua Terrassa. Todos los participantes se encontraban en DSG de al menos un mes de duración en el momento del estudio.

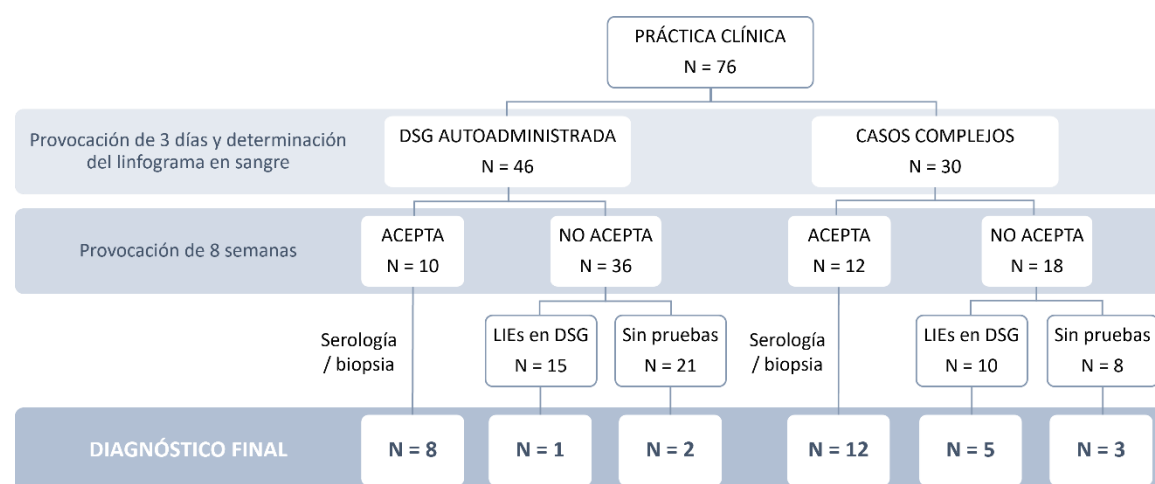
Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes o de sus representantes legales en caso de menores de edad antes de comenzar el estudio, el cual contaba con la aprobación del Comité de Ética de los hospitales correspondientes.

### 1.1. Edad adulta

Una parte de los participantes correspondía a individuos adultos con diagnóstico ya establecido que se prestaron voluntarios para el estudio (N = 68), los cuales fueron clasificados en 4 grupos: pacientes con EC (N = 29); controles sanos (N = 21), definidos como individuos sin sintomatología clínica ni patologías conocidas en los que se descartó EC en base a la serología ATG2; controles enfermos (N = 4), constituido por pacientes que habían acudido a la consulta de Aparato Digestivo por sospecha de EC pero en los que se había descartado la enfermedad; y pacientes con sensibilidad al trigo no celíaca (STNC) (N = 14) que fueron incluidos como grupo independiente con el fin de evaluar posibles diferencias en la respuesta respecto a los controles enfermos.

Por otro lado, se incluyeron casos estudiados en consulta que de acuerdo a la práctica clínica habitual requerían una prueba de provocación con gluten (N = 76). Este último grupo se dividió en dos subgrupos: DSG autoadministrada (N = 46), constituido por pacientes que por decisión propia retiraron el gluten de la dieta antes de haberse realizado las pruebas necesarias para recibir un diagnóstico de acuerdo a los protocolos vigentes; y casos complejos (N = 30), integrado por pacientes con las pruebas diagnósticas realizadas, pero en los que no fue posible establecer un diagnóstico concluyente debido principalmente a discrepancias entre los resultados de la serología y la histología. Los pacientes de estos dos subgrupos comenzaban el estudio tras una provocación inicial de tres días, tras la cual se les recomendaba continuar con gluten durante 8 semanas. Al cabo de este período, se llevaba a cabo el diagnóstico

convencional incluyendo pruebas serológicas y endoscopia digestiva alta con toma de biopsias para la realización de una evaluación histopatológica y del linfograma intraepitelial. En caso de rechazo de la provocación larga por parte del paciente, se le propuso la realización de una gastroscopia para la determinación del linfograma intraepitelial en DSG. Tras seguir este procedimiento, algunos de estos pacientes obtuvieron un diagnóstico concluyente (Figura 8).



**Figura 8.** Diagrama de flujo de los participantes incluidos en los subgrupos dieta sin gluten (DSG) autoadministrada y casos complejos.

Todos los participantes habían mantenido durante al menos el mes previo al estudio una DSG estricta. En el caso de los voluntarios sanos, se les proporcionó información detallada sobre cómo mantener esta dieta.

Durante el desarrollo del proyecto uno de los participantes padeció gastroenteritis en el tiempo de provocación, mostrando una respuesta mucho mayor a lo observado. El análisis de sus muestras requirió la inclusión de tres individuos que acudieron al Hospital Clínico San Carlos por presentar una gastroenteritis, con el fin de evaluar el comportamiento de la prueba propuesta ante una posible movilización de linfocitos por causa diferente a la EC.

### 1.1.1. Características demográficas y diagnósticas

De todos los participantes se recogió la edad en el momento de estudio y el sexo, así como los resultados de las pruebas diagnósticas (serología ATG2, genética HLA y biopsia duodenal). En el caso de pacientes con EC, se indicó también la edad de diagnóstico. Estas variables se muestran en la Tabla 2.

En el caso de pacientes con DSG autoadministrada o pacientes con diagnóstico complejo, sus principales características diagnósticas se muestran en detalle en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

**Tabla 2.** Características demográficas y diagnósticas de los participantes en los distintos grupos de estudio.

	Voluntarios para estudio				Práctica clínica	
	EC N = 29	STNC N = 14	Controles enfermos N = 4	Controles sanos N = 21	Casos complejos N = 30	DSG Autoadministrada N = 46
<b>Edad (años)</b>						
Media ± ET	45,3 ± 2,9	41,8 ± 3,7	37,3 ± 5,2	39,2 ± 2,8	41 ± 2,3	38,9 ± 1,6
Rango	21-83	19-62	24-49	23-63	20-70	21-68
<b>Edad debut (años)</b>						
Media ± ET	39,9 ± 2,8					
Rango	19-80					
<b>Sexo (N, % mujeres)</b>	21 (72,4)	13 (92,9)	4 (100)	18 (85,7)	24 (77,4)	38 (82,6)
<b>Tiempo en DSG (años)</b>						
Media ± ET	5,3 ± 0,9	2,8 ± 0,9	1,4 ± 1,3	0,1 ± 0	2,9 ± 0,5	1,2 ± 0,2
Rango	0,3-16	0,4-12	0,1-4	0,1-0,1	0,1-10	0,1-5
<b>Serología (N, %)</b>						
NR	0	0	0	0	0	26 (56,52)
Negativo ATG2	6 (20,7) <sup>1</sup>	14 (100)	3 (75)	21(100)	23 (76,7)	18 (39,1)
Positivo ATG2	23 (79,3)	0	1 (25)	0	7 (23,3) <sup>2</sup>	2 (4,4)
<b>Histología (N, %)</b>						
NR	0	3 (21,4)	1 (25)	20 (95,2)	0	31 (67,4)
Marsh 0	0	8 (57,1)	3 (75)	1 (4,8) <sup>4</sup>	7 (23,3)	13 (28,3)
Marsh 1	12 (41,4)	3 (21,4)	0	0	14 (46,7)	1 (2,2)
Marsh 2	0	0	0	0	1 (3,3)	1 (2,2)
Marsh 3a	5 (17,2)	0	0	0	5 (16,7)	0
Marsh 3b	9 (31)	0	0	0	2 (6,7)	0
Marsh 3c	2 (6,9)	0	0	0	0	0
<b>Genética (N, %)</b>						
NR	0	1 (7,1)	0	0	0	1 (2,2)
DQ2.5	25 (86,2)	4 (28,6)	0	12 (57,1)	16 (53,3)	19 (41,3)
DQ8	2 (6,9)	1 (7,1)	0	1 (4,8)	1 (3,3)	8 (17,4)
DQ2.2	1 (3,5)	3 (21,8)	1 (25)	1 (4,8)	3 (10)	5 (10,9)
DQ7.5	1 (3,5)	2 (14,3)	1 (25)	2 (9,5)	4 (13,3)	5 (10,9)
No compatible	0	3 (21,8)	2(50)	5 (23,8)	5 (16,7)	8 (17,4)

DSG = dieta sin gluten; EC = enfermedad celíaca; NR = no realizada; STNC = sensibilidad al trigo no celíaca. <sup>1</sup> Todos los pacientes seronegativos mostraron un linfograma intraepitelial celíaco y respuesta clínica e histológica a la DSG. <sup>2</sup> Uno de los pacientes mostraba anticuerpos fluctuantes (positivo débil o negativo). <sup>3</sup> Dato de histología no incluido de dos pacientes M3 de los que no se conoce el grado. <sup>4</sup> Biopsia posterior a la prueba de provocación de 3 días. <sup>5</sup> Dato no incluido de un paciente con genética compatible pero sin indicar alelos.



**Tabla 4.** Características de los participantes incluidos en el grupo de Casos Complejos.

Id	Tiempo en DSG (años)	Edad en Provocación	HLA	Pruebas previas al estudio								Pruebas tras estudio						Dx Final			
				Serología		Histología	Linfograma (DCG)		Linfograma (DSG)		No acepta Provocación larga		Acepta Provocación larga								
				ATG2	EMA		% $\gamma\delta$	% CD3 <sup>-</sup>	% $\gamma\delta$	% CD3 <sup>-</sup>	Linfograma (DSG)		ATG2 (DCG)	Histología (DCG)	Linfograma (DCG)						
						% $\gamma\delta$					% CD3 <sup>-</sup>	% $\gamma\delta$			% CD3 <sup>-</sup>						
CC1	3	55	No compatible	+	-	M2						33,7	5,8							EC	
CC2	10	38	DQ8	-	-	M3			2,7	12,6		1,69	16,65								
CC3	0,1	44	DQ2.5	+	-	M0						0,86	10,57								
CC4	6	41	DQ7.5	+	-	M1						15,9	3,8								EC
CC5	0,1	28	DQ7.5	-	-	M1						4,14	4,18								
CC6	5	49	No compatible	+	+	M1			10,8	7,2											EC
CC7	0,1	52	DQ2.2	+	-	M3						56,53	0,01								EC
CC8	2	70	DQ7.5	-	-	M1						13,5	0,6								EC
CC9	2	35	DQ2.5	-	-	M1						4,7	22,2								
CC10	2	57	No compatible	-	-	M3			3,5	15,5		1,1	15,5								EC
CC11	4	40	No compatible	+ <sup>1</sup>	-	M1															NO EC
CC12	7	34	DQ2.5	-	-	M3			2,45	25											
CC13	0,5	38	DQ2.2	-	-	M1															NO EC
CC14	6	29	DQ2.5	-	-	M1															NO EC
CC15	2	32	DQ2.2	-	-	M3			4,1	3,45											
CC16	2	36	DQ2.5	+	+	M0															EC
CC17	2	48	DQ2.5	-	-	M1															NO EC
CC18	1,3	37	DQ2.5	+	-	M1			8,5	6,5											EC
CC19	5	40	Compatible <sup>2</sup>	-	-	M3															NO EC
CC20	4	25	DQ7.5	-	-	M1						5,43	1,76								
CC21	0,4	35	DQ2.5	-	-	M0	11,5	18,45													NO EC
CC22	6	38	DQ2.5	-	-	M1															
CC23	5	69	DQ2.5	+	-	M3			4,18	4,64											EC
CC24	1	-	DQ2.5	-	-	M0	21,8	2,45													
CC25	-	27	DQ2.5	-	-	M1															NO EC
CC26	0,7	40	No compatible	-	-	M3	1,50	17,00													
CC27	0,5	20	DQ2.5	+	+	M0															EC
CC28	0,1	57	DQ2.5	-	-	M0															NO EC
CC29	3	43	DQ2.5	+	+	M0						18,94	11,3								EC potencial
CC30	2	33	DQ2.5	+	-	M1															EC

ATG2 = anticuerpos antitransglutaminasa tipo 2; DCG = dieta con gluten; DSG = dieta sin gluten; Dx = diagnóstico; EMA = anticuerpos antiendomiso; - = negativo; + = positivo; M = Marsh; EC = enfermedad celíaca. + = anticuerpos determinados con el kit comercial Aeskulisa tTg-A de Grifols sin EMA o con EMA negativo: Serología Negativa. <sup>1</sup> Aeskulisa tTg-A + (en contexto de hepatitis aguda isquémica grave). <sup>2</sup> HLA sin especificar. <sup>3</sup> Anticuerpos negativos, pero dieta baja en gluten durante la reintroducción.

## 1.2. Edad pediátrica

La prueba de provocación corta con gluten de tres días se evaluó en 13 pacientes adicionales, entre los que se encontraron 3 casos con EC diagnosticada en la infancia que querían confirmación y 10 niños procedentes de práctica clínica, incluyendo 3 que se encontraban en DSG autoadministrada, en los cuales se terminó descartando la enfermedad, y 7 casos complejos, en uno de los cuales se terminó confirmando el diagnóstico. Los datos de estos pacientes se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Características de los participantes en el estudio en edad pediátrica.

Id	Grupo	Edad	HLA	Serología	Histología	LIE	Dx Final
PEC1	EC	35	DQ2.5	+	M3		EC
PEC2	EC	17	DQ2.2	+	M3		EC
PEC3	EC	12	DQ2.5	+	Sin		EC
PDSGA1	DSG Autoadministrada	10	DQ2.5	-	Sin		NO EC
PDSGA2	DSG Autoadministrada	8	DQ2.5	-	Sin		NO EC
PDSGA3	DSG Autoadministrada	9	DQ2.2	-	M0	NC	NO EC
PCC1	Caso Complejo	6	NC	-	M3	NC	NO EC
PCC2	Caso Complejo	17	NC	-	M3	NC	NO EC
PCC3	Caso Complejo	12	NC	-	M3	NC	NO EC
PCC4	Caso Complejo	10	NC	-	M0	NC	NO EC
PCC5	Caso Complejo	13	DQ2.5	-	M0	NC	NO EC
PCC6	Caso Complejo	10	DQ7.5	+	Sin		EC
PCC7	Caso Complejo	14	NC	+	M3	NC	NO EC

DSG: Dieta Sin Gluten; Dx: diagnóstico; EC: Enfermedad Celíaca; M0: Marsh 0; M3: Marsh 3; NC: No compatible.

## 2. PROVOCACIÓN CON GLUTEN

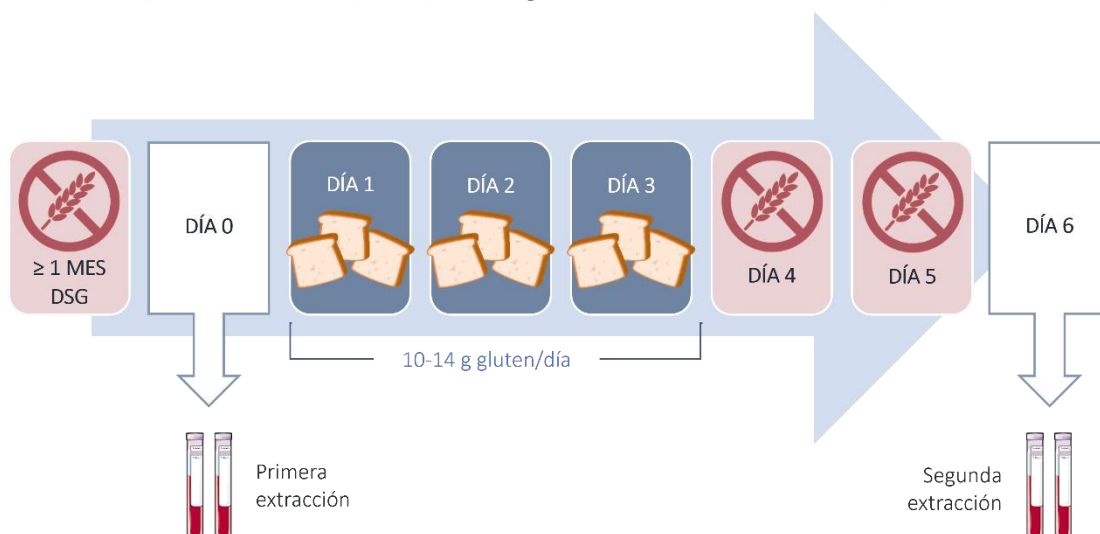
La provocación corta consistió en la ingesta de 10 a 14 gramos de gluten cada día durante 3 días consecutivos. Para ello, cada participante consumió 160-200 gramos de pan blanco de molde diarios, lo que equivale a 6-8 rebanadas (dependiendo de su grosor y tamaño), a lo largo de cada mañana (días 1 a 3) (Figura 9).

La provocación larga, propuesta a los pacientes con diagnóstico incierto, consistió en el seguimiento de una dieta libre (conteniendo gluten) durante 8 semanas. Algunos pacientes, dada su sintomatología, decidieron tomar una cantidad pequeña de gluten diaria (establecida en al menos dos rebanadas de pan o similar).

## 2.1. Provocación corta

### 2.1.1. Recogida de muestras

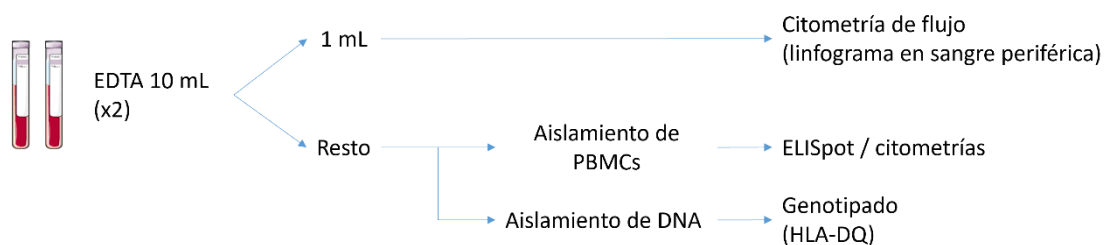
Al comienzo del estudio, momento en el que todos los participantes se encontraban en DSG ( $\geq 1$  mes), a los sujetos se les extrajo una primera muestra de sangre periférica. Este momento fue considerado como “día 0” y tras él se sucedieron tres días de exposición al gluten (“días 1, 2 y 3”), en los cuales ingirieron las rebanadas de pan de molde con gluten. Durante los “días 4, 5 y 6” se restableció la DSG, y se finalizó la prueba con una segunda extracción de sangre periférica el “día 6”. Cada muestra de sangre extraída constó de 2 tubos EDTA (*Vacutainer® K2E (EDTA) 18.0 mg* de 10 mL de BD Ref. 367525).



**Figura 9.** Esquema resumen de la prueba de provocación corta con gluten de tres días.

### 2.1.2. Procesamiento de muestras

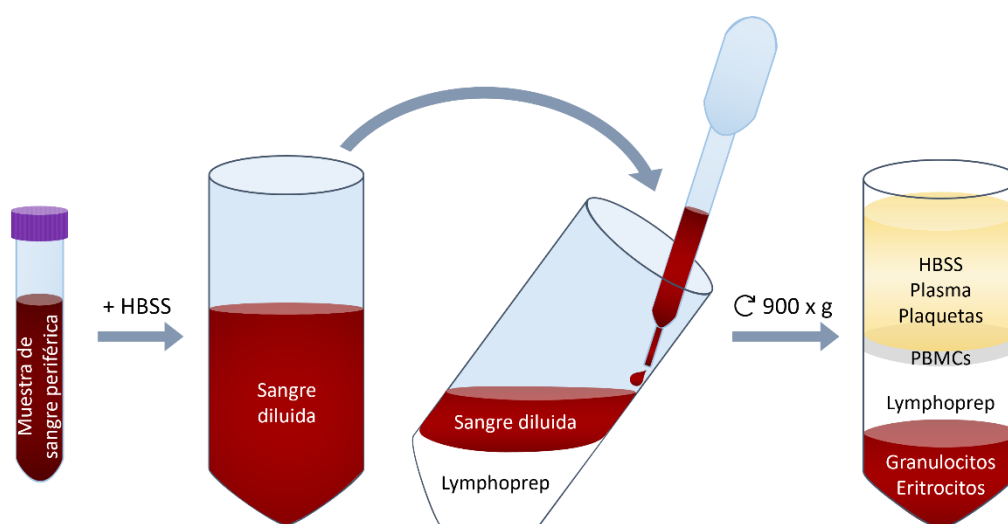
En el momento de la recepción de la muestra y en condiciones de esterilidad, se separó 1 mL de sangre de uno de los tubos EDTA para la realización del análisis por citometría de flujo (Apartado 2.2.1). La muestra restante se utilizó para el aislamiento de PBMCs y DNA. (Figura 10).



**Figura 10.** Esquema resumen del procesamiento de las muestras de sangre periférica tras su extracción.

## 2.1.2.1. Aislamiento de PBMCs

El aislamiento de PBMCs se llevó a cabo mediante centrifugación por gradiente de densidad, bajo condiciones de esterilidad trabajando en una cabina de flujo laminar y siguiendo la técnica aséptica. Debido al volumen de muestra contenido en cada tubo EDTA, ambos se procesaron por separado, realizándose dos aislamientos por extracción. Para ello se comenzó diluyendo la muestra en 1,5 volúmenes de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  estéril vertiendo la sangre en un tubo de centrifuga de 50 mL, y realizando dos lavados con 10 y 5 mL de HBSS, respectivamente, para aprovechar toda la muestra que se hubiera podido quedar en las paredes del tubo EDTA, obteniendo un volumen final de 25 mL de sangre diluida. En otro tubo de centrifuga de 50 mL se vertieron 10 mL de Lymphoprep™ (Stemcell technologies Ref: #007851/07861) atemperado y, con él inclinado, se fue añadiendo poco a poco la sangre diluida por la pared del tubo con ayuda de una pipeta *Pasteur*, con especial cuidado de no mezclar las dos fases. Tras centrifugar a 900 x g durante 21 minutos a temperatura ambiente y sin freno, se observaron cuatro fases: una fase superior amarillenta compuesta de plasma, plaquetas y HBSS, un halo blanquecino conformado por PBMCs, una fase transparente de Lymphoprep™ y una última fase que incluye eritrocitos y granulocitos, la cual se conservó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (tras retirar el resto de fases) para la realización del aislamiento de DNA (Apartado 2.1.2.3.) (Figura 11).



**Figura 11.** Esquema del proceso de aislamiento de PBMCs por centrifugación en gradiente de densidad.

Para recoger el halo de PBMCs, se descartó con una pipeta *Pasteur* la primera fase de suero hasta aproximadamente un centímetro antes del halo,

entonces, se aspiró la fase de PBMCs con cuidado de no recoger Lymphoprep™ y se depositó en un tubo de centrifuga de 15 mL. Se realizó entonces un primer lavado completando el volumen con HBSS y centrifugando a 320 x g, durante 10 minutos a T ambiente. Las células se resuspendieron en 5 mL de HBSS para proceder a su conteo. Se tomaron 10 µL de la suspensión celular y se mezclaron homogéneamente con 10 µL de una dilución 1:4 de azul tripán en PBS para evaluar la viabilidad celular. El azul tripán penetra la membrana celular de las células muertas, tiñéndolas con un color azul que las hace distinguibles de las células vivas blancas y refractantes que conservan la integridad de la membrana. Se cargaron 10 µL de esta mezcla en una cámara de Neubauer que se observó bajo el microscopio óptico (se siguieron los criterios para el conteo habituales (83)). Durante este proceso, se realizó un segundo lavado de las PBMCs, centrifugando de nuevo a 300 x g, durante 10 minutos y a temperatura ambiente.

Se congelaron de 5 a 8 millones de células por criovial empleando 1 mL de medio de congelación (dilución al 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) en suero fetal bovino (FBS) inactivado) preparado en el momento del procesamiento y enfriado a 4 °C previo uso. Con una micropipeta de 1.000 µL se fue añadiendo el medio de congelación gota a gota sobre las células previamente resuspendidas, despacio y manteniendo una ligera agitación con la mano. Todo el proceso se llevó a cabo manteniendo las muestras en hielo. Una vez añadido el medio necesario, se repartió la suspensión celular en los crioviales y se introdujeron en un Mr. Frosty previamente enfriado a 4 °C que se llevó a un congelador a -80 °C durante 24-48 horas, tiempo tras el cual, se trasladaron a un tanque de nitrógeno líquido para su almacenamiento.

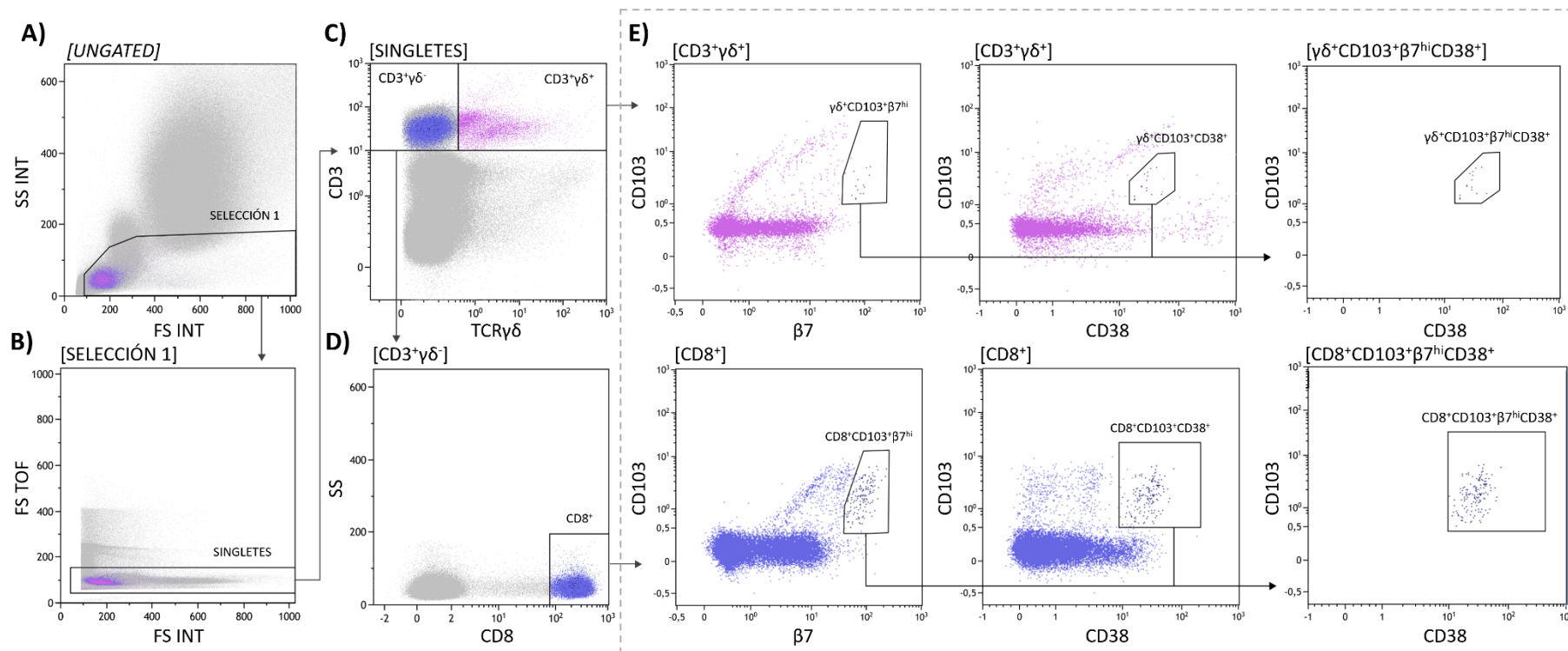
#### *2.1.2.2. Análisis por citometría de flujo en sangre periférica*

Se utilizaron 350 µL del mL de sangre separada previamente para citometría, que se transfirieron al tubo donde se realizaría la tinción, reservando el resto por si fuera necesario repetir la prueba. Se añadieron 4,5 µL por muestra de cada uno de los anticuerpos monoclonales indicados en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Detalle de los anticuerpos monoclonales empleados en la citometría en sangre periférica para la prueba de provocación corta con gluten de tres días.

Especificidad	Clon	Fluorocromo	Casa comercial	N. Catálogo
Anti-CD3 humano	HIT3a	APC/Cy7	Biologend	300318
Anti-CD8 humano	SK1	APC	Biologend	344722
Anti-TCR $\gamma\delta$ humano	B1	BV421	Biologend	331218
Anti-CD103 humano	Ber-ACT8	FITC	BD	550259
Anti-integrina $\beta 7$ humana	FIB504	PE	Biologend	321204
Anti-CD38 humano	HIT3a	PerCP/Cy5.5	Biologend	303522

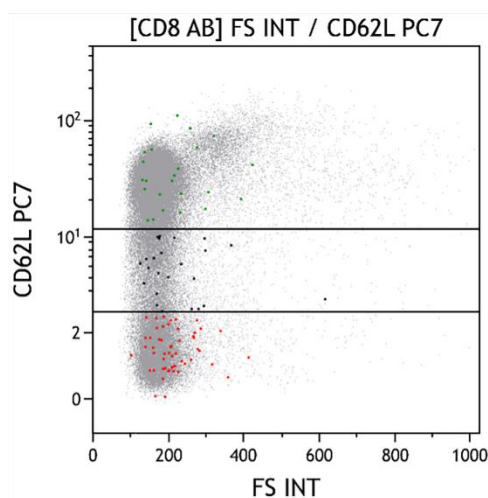
Tras una leve agitación con vórtex, se llevó a cabo una incubación durante 30 minutos a 4 °C y en oscuridad. Durante este tiempo, se prepararon 3 mL (por muestra) de una dilución de buffer de lisis utilizando BD *Facs Lysing solution* (cat. 349202) a una concentración 1:10 en H<sub>2</sub>O milli-Q y se enfrió a 4 °C antes de su uso. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 1 mL de la dilución de buffer de lisis y se agitó 10 segundos en vórtex a máxima velocidad; se añadieron los 2 mL restantes, volviendo a agitar durante otros 10 segundos. Para que la lisis de eritrocitos se llevara a cabo, se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. A continuación, se centrifugó 5 minutos a 320 x g a temperatura ambiente, descartando el sobrenadante por decantación y resuspendiendo el *pellet* en el volumen residual. Seguidamente, se realizó un lavado con 3 mL de PBS bajo las mismas condiciones de centrifugación y finalmente se resuspendió en un volumen final de 200  $\mu$ L para su adquisición en el citómetro. A lo largo del desarrollo de este estudio, se utilizaron los equipos FACSCanto™ de BD, Gallios y CytoFLEX de Beckman Coulter. Antes de realizar cada cambio, se analizaron muestras en paralelo para comprobar que no existían cambios entre el análisis realizado por distintos citómetros. En la Figura 12 se muestra la estrategia de *gating* utilizada para el análisis de los archivos de citometría utilizando el *software* Kaluza.



**Figura 12.** Estrategia de análisis de citometría de flujo para prueba de provocación corta con gluten. A) Se comenzó partiendo de la población de linfocitos ampliando la selección para incluir a linfocitos activados que presentan un mayor tamaño y complejidad. B) Se discriminaron los dobles. C) Se seleccionaron los linfocitos T CD3 $^+$  distinguiendo entre  $\gamma\delta^+$  y  $\gamma\delta^-$ , a partir de esta última se obtuvo la población CD8 $^+$  (D). E) De cada uno de estos dos grupos se buscó la subpoblación de interés CD103 $^+$   $\beta 7^{hi}$  CD38 $^+$ , presente en pacientes celíacos a día 6 tras la ingesta de gluten.

En algunas muestras se incluyó el marcador CD62L al panel de citometría de flujo descrito en el apartado anterior para valorar si la adición de este anticuerpo conferiría mayor especificidad a la prueba. Para ello se añadieron 4,5  $\mu\text{L}$  del anticuerpo monoclonal CD62L-PE/Cy7 (clon DREG-56, Biolegend, N. Catálogo 304822).

En caso de haber incluido CD62L, se añadieron *plots* para la visualización de su expresión en las distintas subpoblaciones de interés de linfocitos T  $\text{CD8}^+\text{CD103}^+\beta7^{\text{hi}}\text{CD38}^+$  ya identificadas (Figura 13)



**Figura 13.** *Plot* para el análisis de expresión de CD62L. En gris la población  $\text{CD8}^+$  total. Destacada en mayor tamaño la población de interés  $\text{CD8}^+\text{CD103}^+\beta7^{\text{hi}}\text{CD38}^+$ . Verde:  $\text{CD62L}^+$ ; negro:  $\text{CD62L}^{\text{low}}$ ; rojo:  $\text{CD62L}^-$ .

### 2.1.2.3. Aislamiento de DNA mediante “salting out”

Tras realizar el aislamiento de PBMCs el día de la extracción de sangre, se conservó a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  la última fase, que contenía granulocitos, para realizar el aislamiento de DNA. Antes de comenzar, se esperó hasta su completa descongelación a temperatura ambiente. De la misma manera, todos los reactivos necesarios se prepararon con anterioridad: STMT (109 g de sacarosa, 1,03 g de  $\text{MgCl}_2$ , 1 mL de Tris HCl pH 7,5, 10 mL de Triton X-100 (1%) y  $\text{H}_2\text{O}$  MiliQ enrasando a 1L); *buffer* B (12,5 mL de NaCl 3M, 24 mL de EDTA 0,5M pH 8 y  $\text{H}_2\text{O}$  MiliQ enrasando a 500 mL) y *buffer* TE (10 mL de Tris pH 7,5, 2 mL de EDTA 0,5M pH 8 y  $\text{H}_2\text{O}$  MiliQ enrasando a 1L). El STMT se mantuvo a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  la noche previa. Se comenzó realizando un primer lavado con 25 mL de tampón STMT frío, mezclando vigorosamente mediante *vórtex* y centrifugando a  $171 \times g$  y  $4\text{ }^\circ\text{C}$  durante 20 minutos. Se descartó el sobrenadante por decantación y se resuspendió el *pellet* de nuevo con ayuda del

vórtex. A continuación, se realizó un segundo lavado siguiendo el mismo procedimiento pero añadiendo 5 mL de *buffer* B antes de resuspender el *pellet*. Seguidamente, se adicionaron 125 µL de SDS 20% (a temperatura ambiente) y 125 µL de Proteinasa K (a 4 °C) y se incubó en un baño a 51 °C *overnight*. Pasado este tiempo, se incluyeron 1,75 µL de NaCl 6M a cada muestra y se centrifugó a 171 x g y 4 °C durante 30 minutos. Posteriormente, se traspasó el sobrenadante a un tubo de centrífuga de 15 mL con una pipeta *Pasteur* y se fue añadiendo isopropanol poco a poco, con cuidado de no mezclar las dos fases, hasta alcanzar una proporción 1:1. Llegado este punto, se mezclaron las fases por inversión hasta visualizar la hebra de DNA, que fue recogida utilizando un capilar de cristal y transferida a un tubo *Eppendorf* con etanol 70% donde se lavó para eliminar las sales y finalmente, a otro tubo *Eppendorf* con TE en el cual se dejó reposar de 5 a 10 minutos hasta quedar liberada del capilar, que se extrajo comprobando que no quedaran restos. Finalmente se dejó reposar 24 horas a temperatura ambiente para favorecer la homogeneización, tras lo cual se llevó a cabo la cuantificación de la concentración de DNA empleando un espectrofotómetro Nanodrop. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

### 3. LINFOGRAMA INTRAEPITELIAL

#### 3.1. Procesamiento de muestras

La realización del linfograma intraepitelial partió de muestras duodenales obtenidas durante la realización de gastroscopias realizadas de acuerdo a la práctica clínica habitual.

Las biopsias se recogieron en suero salino fisiológico y se procesaron en el momento o transfirieron a un tubo con 10 mL de medio completo (RPMI 1640 1x suplementado con 10% FBS descomplementado, 1% penicilina/estreptomina (10.000 U/mL) y 1% glutamina 200 mM) y se conservaron a 4 °C hasta su análisis, pudiendo realizarse hasta 24 horas tras la recogida.

#### 3.2. Análisis por citometría de flujo

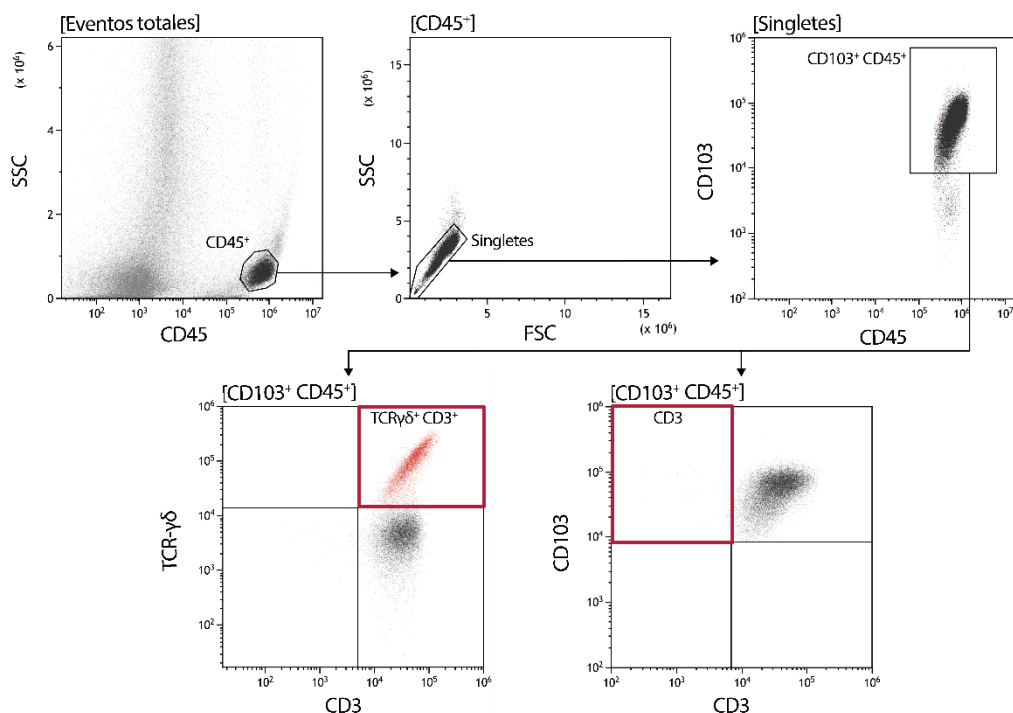
Se retiró el suero salino o el medio completo en el que se encontraba la biopsia con ayuda de una pipeta *Pasteur* y se sustituyó por 10 mL de medio completo fresco, al que se incorporaron 100 µL de DTT 0,1 M y 100 µL de EDTA 0,1 M. Tras ello, se incubó en un agitador rotatorio a 12 rpm y temperatura ambiente durante 45 minutos. Este paso se llevó a cabo en tubos de 20 mL para aumentar la disgregación mecánica producida por el movimiento. A continuación, se

recogió el sobrenadante y se transfirió a un tubo de centrifuga de 15 mL, descartando los restos de biopsia, y se centrifugó a 320 x g y temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras decantar el sobrenadante, se resuspendió el *pellet* en el volumen residual y se trasladó a un tubo de citometría, completando el volumen hasta 200  $\mu$ L con medio completo cuando fue necesario. Seguidamente, se procedió al marcaje añadiendo los anticuerpos monoclonales indicados en la Tabla 7.

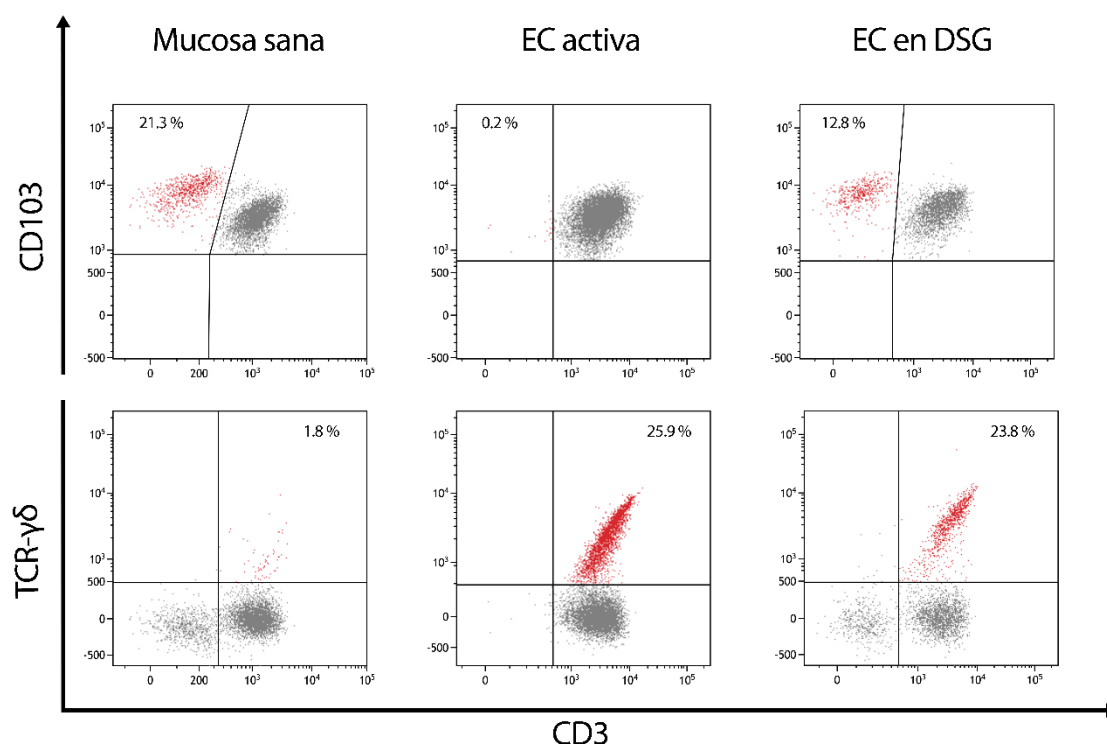
**Tabla 7.** Detalle de los anticuerpos monoclonales empleados en la citometría para la obtención del linfograma intraepitelial.

Especificidad	Clon	Fluorocromo	Casa comercial	N. Catálogo	Volumen ( $\mu$ L)
Anti-CD103 humano	Ber-ACT8	FITC	BD	550259	10
Anti-TCR $\gamma$ $\delta$ humano	11F2	PE	BD	333141	10
Anti-CD3 humano	SK7	PerCP-Cy5.5	BD	332771	7
Anti-CD45 humano	HI30	APC	BD	555485	5

Tras una leve agitación con vórtex, se incubó en oscuridad y a 4 °C de 20 a 30 minutos, tiempo tras el cual se realizó un lavado con 3 mL de PBS 1X centrifugando después a 320 x g durante 7 minutos. Finalmente, se decantó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en un volumen final de 400  $\mu$ L de PBS 1X para su adquisición en el citómetro. Se utilizaron los mismos equipos mencionados para el análisis de sangre periférica (ver apartado 2.1.2.2.) En la Figura 14 se muestra la estrategia de gating utilizada para el análisis de los datos de citometría utilizando el software Kaluza Analysis 2.1 (Beckman Coulter) y en la Figura 15 se recogen distintos patrones que se pueden observar en función del paciente.



**Figura 14.** Estrategia de análisis de citometría de flujo para linfograma intraepitelial. Se comenzó partiendo de la población de linfocitos CD45<sup>+</sup> y discriminando los dobletes. De dicha población, se seleccionaron aquellos eventos CD103<sup>+</sup> y finalmente se realizaron dos *plots*: uno enfrentando CD3 y TCR  $\gamma\delta$  para visualizar la población de linfocitos T  $\gamma\delta^+$ , doble positiva para dichos marcadores; y otro enfrentando CD3 y CD103 para visualizar las células CD3<sup>-</sup>, población CD3<sup>-</sup>CD103<sup>+</sup>. En la imagen se muestra un patrón celíaco, en el que la población de CD3<sup>-</sup> está disminuida por debajo del 10% del total de LIE y los linfocitos T  $\gamma\delta^+$  aumentados por encima del 10%, inversamente a lo que mostraría un control sano.



**Figura 15.** Distintos patrones de linfograma intraepitelial. Mucosa sana:  $\gamma\delta^+ < 10\%$ , CD3<sup>-</sup> > 10%; EC activa:  $\gamma\delta^+ > 10\%$ , CD3<sup>-</sup> < 10%; EC en DSG:  $\gamma\delta^+ > 10\%$  (Adaptado de (60)).

#### 4. ELISpot

La medida de la producción de IFN- $\gamma$  mediante ELISpot (*Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay*) requirió: placas ELISpot *PVDF plates, white*; el *Human IFN- $\gamma$  ELISpotBASIC kit (coating mAb (1-D1K), detection mAb (7-B6-1-biotin), streptavidin-ALP)* de Mabtech (cat: 3654-WP-10 y 3420-2A respectivamente) y el reactivo *BCIP/NBT Single Reagent, Blue/purple, Alkaline Phosphatase Substrate* de Merck (cat: ES006-500ML). Además, se necesitó RPMI y medio completo (ver 4.1.) para el tratamiento de las células.

Se emplearon como muestras las PBMCs aisladas de sangre periférica de pacientes y controles en provocación a días 0 y 6 descongeladas. Se analizó la producción de IFN- $\gamma$  ante la estimulación con péptidos del gluten reconocidos específicamente por las moléculas HLA-DQ2.5. Cada muestra se analizó bajo tres condiciones: “problema”, estimulada con el péptido QS-17, inmunogénico para individuos con HLA-DQ2.5: *QFPQPELPYPQPQS (deamidation product of p57-73 Q E65)* generado por ProteoGenix SAS con al menos un 90% de pureza; “control positivo”, para corroborar la reactividad de las células, estimulado con PHA (*Lectin from Phaseolus vulgaris (red kidney bean) Phytohemagglutinin PHA-P*, de Sigma-Aldrich (*ref. L1668*)); y “control negativo”, al que se añadió únicamente medio completo. Cada una de estas condiciones se analizó por triplicado (3 pocillos), resultando en un total de 9 pocillos por muestra. En cada placa se intentó incluir siempre representación de los distintos grupos de estudio (EC ya diagnosticada, control sano, pacientes estudiados por sospecha de EC) (Figura 16).

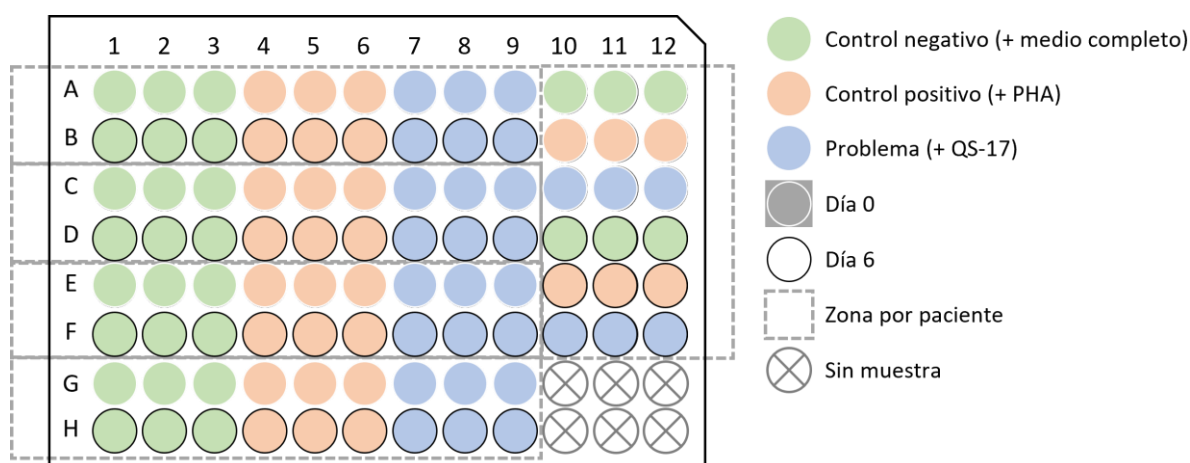


Figura 16. Esquema del diseño de los ensayos ELISpot.

Cada ensayo tuvo lugar durante cuatro días. En el primero de ellos, se cubrió el fondo de cada pocillo con 100  $\mu$ L de una dilución del anticuerpo primario anti-IFN- $\gamma$  (*coating mAb (1-D1K)*) en PBS estéril a una concentración final de 15  $\mu$ g/mL y se incubó a 4  $^{\circ}$ C *overnight*. Tras ello, se realizaron 5 lavados con 150  $\mu$ L por pocillo de PBS estéril y se bloquearon las uniones inespecíficas añadiendo 150

$\mu\text{L}$  de medio completo a cada pocillo e incubando durante 2 horas en una incubadora de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . Durante este tiempo, se procedió a la descongelación de las células y se evaluó su viabilidad mediante una tinción con azul tripán, tomando como óptimo un valor superior al 80%. Tras retirar el medio de bloqueo, las PBMCs se cultivaron en medio completo a una concentración de 200.000 células/pocillo en caso de los controles negativos y los estimulados con péptido de gliadina, y 50.000 células por pocillo en el caso de los controles positivos para evitar el exceso de señal. A cada pocillo se le incorporaron 80  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular y 50  $\mu\text{L}$  de la dilución de estímulo (PHA, péptido de gliadina o medio completo), siendo el volumen final del cultivo de 130  $\mu\text{L}$  por pocillo. Las placas se incubaron durante 36-39 horas en un incubador de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ . Para el proceso de revelado, se retiraron las células y se realizaron 5 lavados con 200  $\mu\text{L}$  de PBS por pocillo, tras lo cual se añadieron 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de una dilución del anticuerpo secundario (*detection mAb (7-B6-1-biotin)*) a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Tras 1 hora y media de incubación a temperatura ambiente y oscuridad, se realizaron otros 5 lavados con PBS seguidos de 1 hora de incubación con 100  $\mu\text{L}$  de una dilución de estreptavidina (*streptavidin-ALP*) bajo las mismas condiciones. Finalmente, se realizó un último lavado y se incubó con 100  $\mu\text{L}$  por pocillo del sustrato NBT-BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolfosfato nitro azul de tetrazolio) a temperatura ambiente y oscuridad durante 5-20 minutos, vigilando la aparición de puntos para evitar su confluencia, y se paró la reacción enzimática con agua del grifo. Para obtener el *Spot Forming Cell* (SFC) correspondiente al número de células secretoras de IFN- $\gamma$  total, se analizaron las placas utilizando un lector de ELISPOT (ImmunoSpot 5.0, CTL Analyzers) y el programa SmartCount (ImmunoSpot 5.0, CTL Analyzers). Los datos finales obtenidos para cada muestra problema corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar tras restar los valores obtenidos en el control negativo.

## 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

### 5.1. Análisis de la respuesta de linfocitos T $\text{CD8}^+$ y $\gamma\delta^+$ tras provocación corta

Previamente a la realización de los estadísticos de contraste, se analizó la normalidad de la distribución de cada una de las poblaciones de estudio utilizando el test de Shapiro-Wilk. Para analizar las diferencias en las proporciones de las poblaciones de interés  $\text{CD8}^+\text{CD103}^+\beta7^{\text{hi}}\text{CD38}^+$  y  $\gamma\delta^+\text{CD103}^+\beta7^{\text{hi}}\text{CD38}^+$  con respecto a sus poblaciones totales  $\text{CD8}^+$  y  $\gamma\delta^+$  a días 0 y 6 en los distintos grupos diagnósticos, se utilizó el contraste de Wilcoxon para muestras pareadas. Para la valoración estadística de diferencias observadas entre los distintos grupos diagnósticos, se eligió el contraste para muestras independientes U de Mann-Whitney, se consideraron significativos los valores de p por debajo de 0,05.

## 5.2. Validez interna: sensibilidad y especificidad

### 5.2.1. Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic)

Para la elección de la variable de estudio más apropiada para establecer una nueva metodología diagnóstica y el cálculo del punto de corte más adecuado conforme a la sensibilidad y especificidad deseada, se realizaron curvas ROC. Se valoraron como posibles variables la proporción de las poblaciones de interés  $CD8^+CD103^+B7^hiCD38^+$  y  $\gamma\delta^+CD103^+B7^hiCD38^+$  respecto a las poblaciones totales  $CD8^+$  y  $\gamma\delta^+$ , respectivamente, observadas a día 6, variables que de aquí en adelante se denominarán “%CD8 triples + d6” y “% $\gamma\delta$  triples + d6”, respectivamente. Para este análisis, se incluyeron los participantes pertenecientes al grupo de voluntarios para el estudio: los pacientes con diagnóstico concluyente de EC seropositiva previo a su inclusión en el estudio como grupo EC, y los controles sanos, controles enfermos y STNC como individuos sin EC. Se calculó el área bajo la curva (AUC) para ambas variables de estudio y se obtuvieron las coordenadas de cada una de ellas junto con la sensibilidad y especificidad correspondientes. Se comparó el AUC de ambas curvas utilizando el método de De Long. En base a estos valores, se escogió la variable y el punto de corte considerado más apropiado para la prueba. El objetivo fue obtener, con valores aceptables de sensibilidad, la mayor especificidad posible para intentar evitar los falsos positivos y diagnosticar erróneamente a un individuo sano, ya que el tratamiento de esta enfermedad, la dieta sin gluten, se debe mantener de por vida.

### 5.2.2. Sensibilidad y Especificidad

Los puntos de corte para establecer la sensibilidad y especificidad se obtuvieron mediante la realización de la curva ROC empleando los datos de la población de estudio voluntaria ya diagnosticada y añadiendo todos los participantes (caso complejo y DSG autoadministrada) que obtuvieron un diagnóstico definitivo siguiendo el protocolo habitual una vez finalizado el estudio. Se comparó el resultado de la prueba de provocación corta (positivo o negativo) con el diagnóstico final, clasificando los casos en: verdaderos positivos (VP), aquellos en los que se obtuvo un resultado positivo en la prueba coincidente con un diagnóstico final de EC; verdaderos negativos (VN), aquellos en los que se obtuvo un resultado negativo para la prueba coincidente con un diagnóstico final en el cual se descartó la enfermedad; falsos positivos (FP), aquellos en los que se obtuvo un resultado positivo en la prueba en contraposición a un diagnóstico final en el cual se descartó la enfermedad; y

falsos negativos (FN), aquellos en los que se obtuvo un resultado negativo para la prueba contrariamente a un diagnóstico final de EC.

Para el cálculo de la sensibilidad y especificidad de la población de estudio, se aplicaron las siguientes fórmulas utilizando los valores de VP, VN, FP y FN obtenidos.

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

### 5.3. Validez externa: valores predictivos (VPP y VPN)

Para valorar la validez externa de la prueba se calcularon los valores predictivos para la población de estudio. Utilizando también los datos de VP, VN, FP y FN obtenidos tras la clasificación de casos detallada en el apartado anterior, se calculó el Valor Predictivo Positivo (VPP), que indica la probabilidad de padecer la enfermedad realmente cuando el resultado obtenido en la prueba es positivo y el Valor Predictivo Negativo (VPN), que indica la probabilidad de no padecer la enfermedad cuando se ha obtenido un resultado negativo, aplicando las siguientes fórmulas:

$$VPP = \frac{VP}{VP + FP}$$

$$VPN = \frac{VN}{VN + FN}$$

Se debe tener en cuenta que los valores VPP y VPN dependen de la prevalencia de EC en la población de estudio. Los casos de EC entre los pacientes que acudan a una consulta de Aparato Digestivo general no serán los mismos que los que acudan a una consulta monográfica de EC.

### 5.4. Razones de verosimilitud (RVP y RVN)

Otro modo de evaluar la prueba diagnóstica fue el cálculo de las Razones de Verosimilitud, que relacionan en un solo concepto los valores de sensibilidad y especificidad. Se calculó la Razón de Verosimilitud Positiva (RVP), que representa la probabilidad de que la persona presente la enfermedad ante un resultado positivo; y la Razón de Verosimilitud Negativa (RVN), que indica la probabilidad de que la persona no muestre la enfermedad ante un resultado

negativo. Se utilizaron las fórmulas siguientes, que emplean los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos para la población de estudio.

$$RVP = \frac{\text{Sensibilidad}}{1 - \text{Especificidad}}$$

$$RVN = \frac{1 - \text{Sensibilidad}}{\text{Especificidad}}$$

## 5.5. Variación interoperador

### 5.5.1. Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI)

Para evaluar la concordancia de los resultados de la prueba de provocación con gluten de tres días, dos operadores diferentes analizaron de manera independiente los archivos de citometría de flujo obtenidos tras el procesamiento de las muestras, siguiendo la misma estrategia de “gating”. Se recogieron como datos a comparar: el número total de linfocitos T CD8<sup>+</sup> a día 0 (“N CD8 total d0”), el número de células de la población de interés CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>β7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> a día 0 (“N CD8 triples+ d0”), la proporción de dicha población sobre la de CD8<sup>+</sup> totales a día 0 (“% CD8 triples+ d0”), las mismas poblaciones para la extracción a día 6 (“N CD8 total d6”, “N CD8 triples+ d6” y “% CD8 triples+ d6”) y las mismas variables en relación a la población de linfocitos γδ<sup>+</sup> (“N γδ total d0”, “N γδ triples+ d0”, “%γδ triples+ d0”, “N γδ total d6”, “N γδ triples+ d6” y “%γδ triples+ d6”). Para cada una de estas variables, se realizó un análisis de la varianza de medidas repetidas con dos factores, calculando el Coeficiente de Correlación Intraclase de acuerdo absoluto (CCIA) siguiendo un modelo de efectos aleatorios.

### 5.5.2. Gráficos de Bland-Altman

El grado de concordancia también se evaluó mediante la elaboración de gráficos de Bland-Altman. Se realizaron para las cuatro variables que representan la proporción de la población de interés CD103<sup>+</sup>β7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> sobre la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y γδ<sup>+</sup> totales a días 0 y 6 de la provocación con gluten. Estos gráficos se construyeron estableciendo límites de tolerancia en torno a la media de las diferencias de las medidas aportadas por los dos operadores y en función de la desviación típica de las mismas.

### 5.5.3. Gráficos de Acuerdo-Supervivencia

Otra forma de evaluar el grado de concordancia entre los análisis de operadores diferentes fue mediante la realización de una adaptación de los gráficos de Acuerdo-Supervivencia propuesta por Luiz en 2003 (84). Estos gráficos se elaboraron para las variables “% CD8 triples+ d0”, “% CD8 triples+ d6”, “% $\gamma\delta$  triples+ d0” y “% $\gamma\delta$  triples+ d6”.

## 6. SOFTWARE DE ANÁLISIS Y RECOGIDA DE DATOS

Se creó un cuaderno de recogida de datos electrónico empleando la plataforma web REDcap ubicada en el servidor de la Fundación de Investigación Biomédica del Hospital Clínico San Carlos. En él se incluyeron variables demográficas y clínicas de los pacientes, así como los datos resultantes de los análisis de citometría de flujo. Los análisis estadísticos realizados se llevaron a cabo utilizando el paquete estadístico IBM SPSS v. 25. Como herramienta de visualización de datos y diseño de gráficos se utilizó Microsoft PowerBI Desktop v. 2.122.746.0 y Graphpad Prism 10.

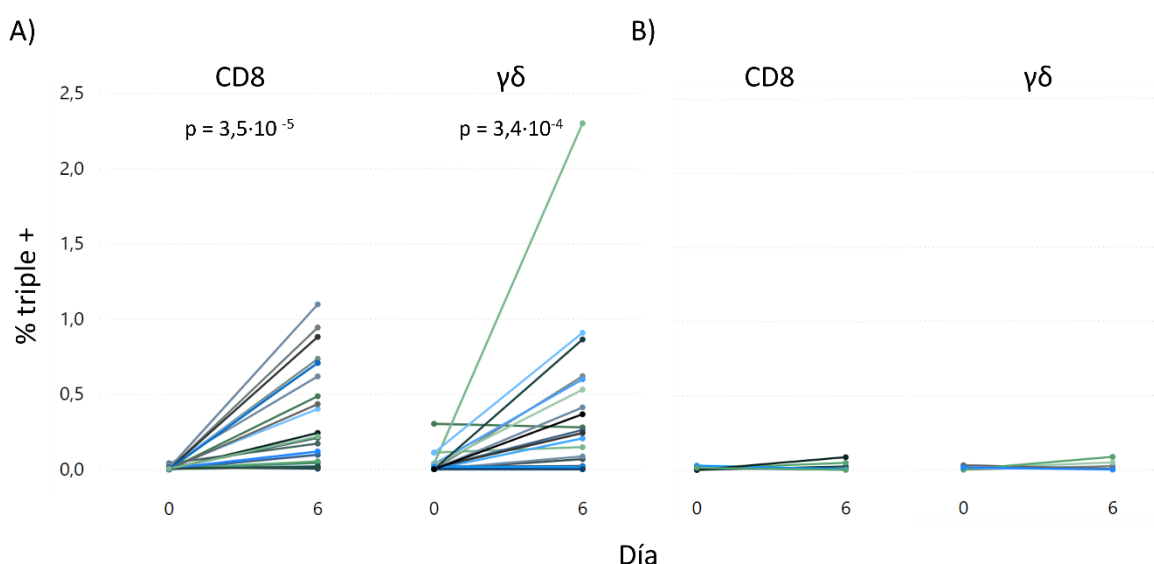


# RESULTADOS

## 1. RESPUESTA DE LINFOCITOS T CD8<sup>+</sup> Y $\gamma\delta$ <sup>+</sup> TRAS PROVOCACIÓN CORTA

### 1.1. Pacientes con EC

De los 29 voluntarios adultos con EC ya diagnosticada en el momento de inclusión en el estudio, 23 presentaban serología positiva y 6 serología negativa. El análisis de sus muestras mediante citometría de flujo (de manera basal y al sexto día tras el inicio de la provocación corta con gluten) valorando la proporción de las poblaciones de interés CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> $\beta$ 7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> y  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> $\beta$ 7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> respecto a las poblaciones generales CD8<sup>+</sup> o  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> detectó su presencia a día 6 de manera diferencial a lo observado a día 0, en 22 de los 23 individuos seropositivos en el caso de la población de CD8<sup>+</sup> (95,7%) y en 17 (73,9%) en el caso de la población  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>; sin embargo, sólo lo hizo en 3 de los 6 casos seronegativos para ambas poblaciones (50%) (Figura 17).



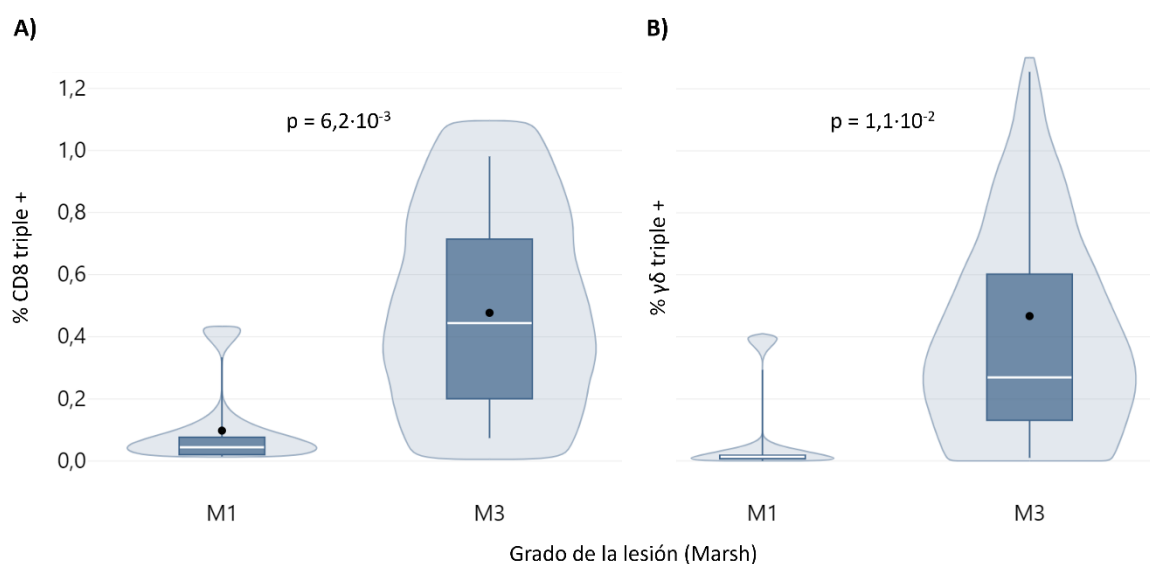
**Figura 17.** Proporción de las poblaciones de interés CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> $\beta$ 7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> y  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>CD103<sup>+</sup> $\beta$ 7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> con respecto a las poblaciones generales CD8<sup>+</sup> (% CD8 triple +) o  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> (%  $\gamma\delta$  triple +) de manera basal (0) y al sexto día (6) tras el inicio de la provocación corta con gluten en voluntarios con enfermedad celíaca seropositiva (A) y seronegativa (B).

El grupo de pacientes con EC seronegativa resultó de un tamaño muestral demasiado reducido para la realización de análisis estadísticos, por lo que se incluyeron sólo los pacientes con EC seropositiva.

El análisis de la normalidad de la distribución de los datos utilizando el test de Shapiro-Wilk valorando las variables “% CD8 triple + d0” y “% CD8 triple + d6”, “%  $\gamma\delta$  triple + d0” y “%  $\gamma\delta$  triple + d6” mostró valores significativos en todos los casos, por lo que se rechazó el supuesto de normalidad y se utilizaron pruebas no paramétricas en los siguientes análisis estadísticos.

El contraste de Wilcoxon para muestras pareadas concluyó que las diferencias observadas entre las proporciones observadas de las poblaciones de interés frente a sus poblaciones generales eran significativamente diferentes entre los días 0 y 6 de la provocación corta con gluten en los voluntarios con EC, con una  $p = 3,5 \cdot 10^{-5}$  para la población CD8 y  $p = 3,4 \cdot 10^{-4}$  para la población  $\gamma\delta$ .

Se quiso valorar la magnitud de respuesta mostrada por los participantes con EC en función del grado de la lesión histológica al diagnóstico. Para ello, se realizaron gráficos box-plot (Figura 18) en los que se representaron los valores de “%CD8 triple + d6” y “% $\gamma\delta$  triple + d6”, obtenidos por los participantes con EC seropositiva (N = 23), diferenciando los participantes que mostraron atrofia (Marsh 3) (N = 16) y los que presentaron una lesión tipo Marsh 1 (N = 7). Se pudo observar que la respuesta obtenida para estos últimos era en la gran mayoría de los casos de menor magnitud.



**Figura 18.** Magnitud de respuesta ante la prueba de provocación en participantes con EC seropositiva que mostraban Marsh 3 frente a los que mostraban Marsh 1 al diagnóstico. En el eje Y se representa la proporción de las poblaciones de interés: A) % CD8 triples + d6 y B) %  $\gamma\delta$  triples + d6. En azul claro se muestra la distribución de los casos. M = Marsh.

Estas diferencias observadas en la magnitud de la reacción entre pacientes con lesión tipo Marsh 1 y pacientes con atrofia resultaron estadísticamente significativas utilizando el contraste para muestras independientes U de Mann-Whitney, obteniéndose valores de  $p < 0,05$  para ambas variables analizadas.

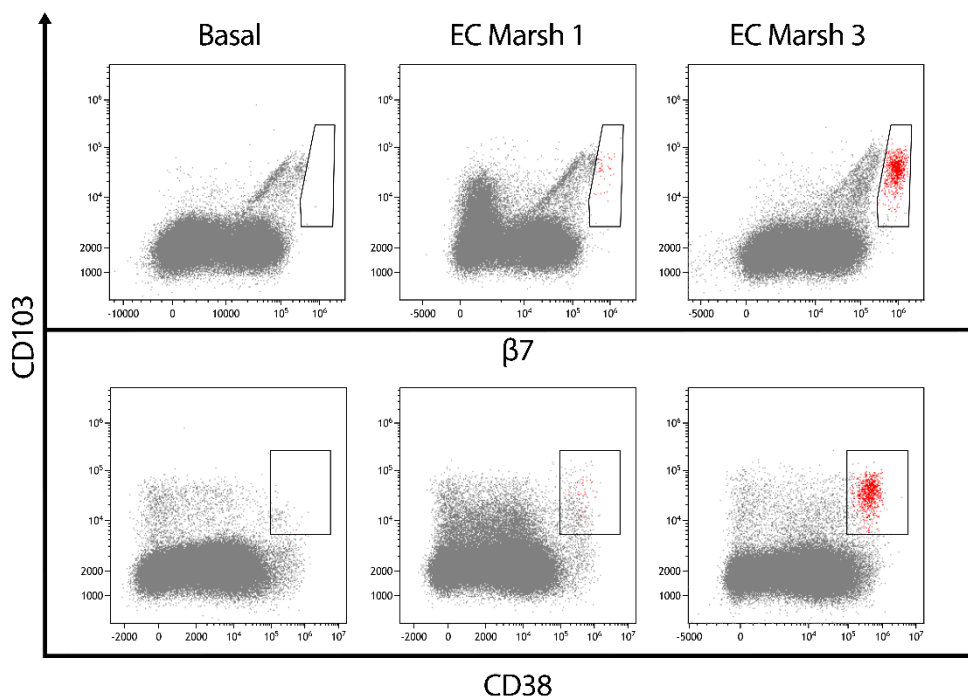
En la Tabla 8 se muestran los valores obtenidos de “% CD8 triples + d6” para todos los participantes con un diagnóstico de EC seropositiva ordenados de menor a mayor en función del valor obtenido a día 6. Se pudo comprobar que los participantes que presentaban una lesión

Marsh 1 al diagnóstico se agrupaban en su mayoría en la parte superior de la tabla, presentando respuestas de menor magnitud que los individuos que presentaban atrofia. En aquellos casos en que se detectó la presencia de la población también de manera basal, se valoró el aumento de la misma calculando el cociente del porcentaje observado a día 6 sobre el observado previamente a la reintroducción del gluten. Se observó que aparecían en un porcentaje inferior a la mitad del presente a día 6, siendo el menor valor calculado de 2,19 (EC30). Por tanto, se estableció como un criterio necesario para considerar un resultado positivo indicando presencia de la enfermedad, observar al menos un aumento del doble del % CD8 triples + a día 6 respecto a día 0.

**Tabla 8.** Respuesta a la provocación con gluten en pacientes con EC seropositiva indicando el grado de la lesión histológica al diagnóstico.

Id	Bx	% CD8 triple + d0	% CD8 triple + d6	Cociente %CD8 triple + (d6/d0)
EC30	M1	0,0060	0,0131	2,19
EC27	M1	0,0029	0,0190	6,62
EC24	M1	0,0041	0,0214	5,18
EC12	M1	0,0050	0,0443	8,82
EC19	M1	0,0064	0,0534	8,37
EC9	M3	0,0030	0,0966	32,04
EC7	M1	0	0,0996	-
EC28	M3	0,0067	0,1196	17,76
EC6	M3	0,0405	0,1713	4,23
EC8	M3	0,0064	0,2103	32,94
EC31	M3	0,0046	0,2178	47,64
EC21	M3	0	0,2425	-
EC3	M3	0,0096	0,4021	41,77
EC17	M1	0	0,4337	-
EC5	M3	0	0,4861	-
EC11	M3	0,0325	0,6177	19,03
EC14	M3	0,0142	0,7055	49,74
EC26	M3	0	0,7079	-
EC13	M3	0,0061	0,7349	119,58
EC16	M3	0,0020	0,8804	451,38
EC2	M3	0	0,9423	-
EC4	M3	0,0078	1,0960	139,66

M1: Marsh 1; M3: Marsh 3; EC: Enfermedad Celíaca; CC: Caso Complejo; Bx: biopsia.



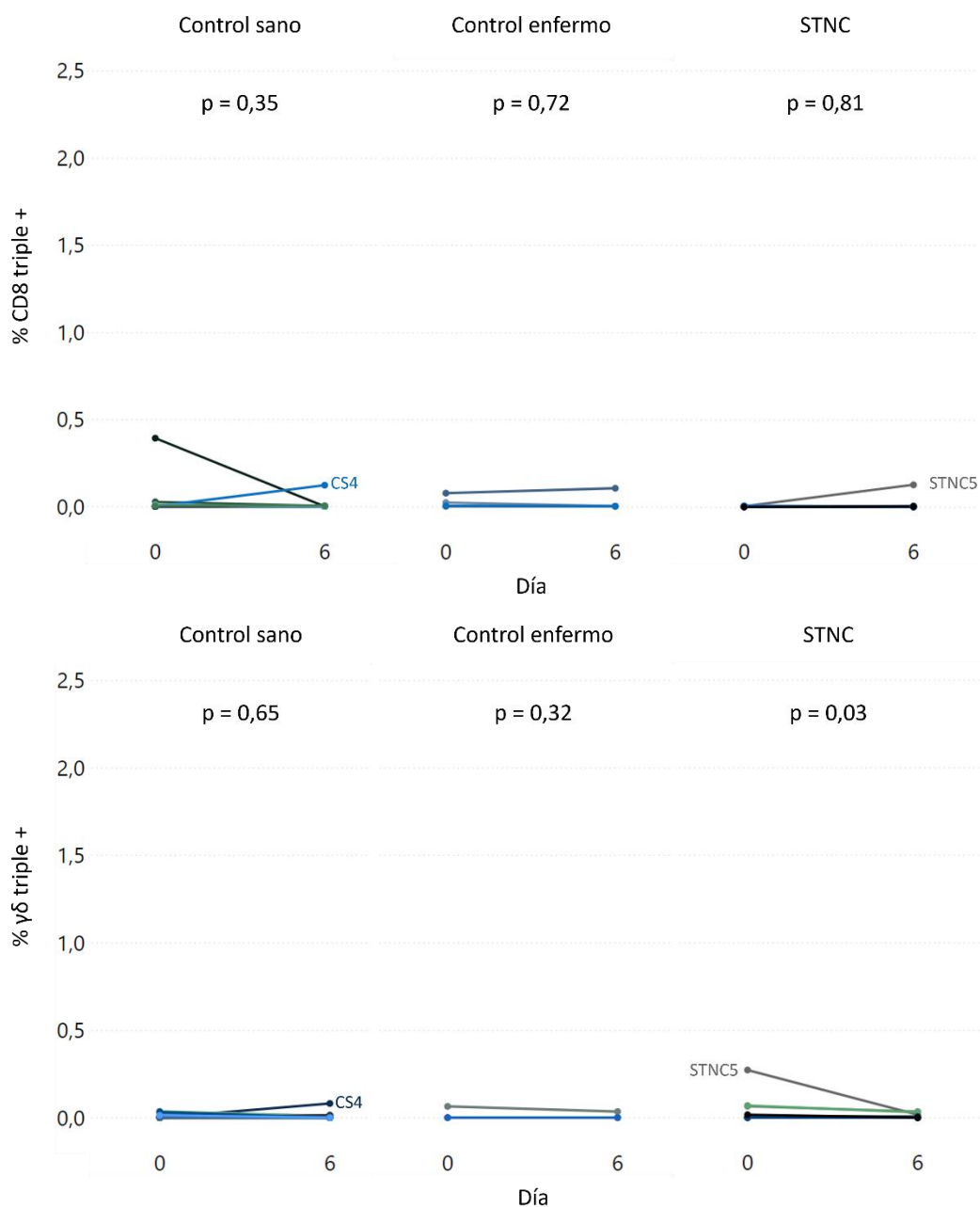
**Figura 19.** Diferencia de expresión de la población de interés  $CD8^+CD103^+\beta7^{hi}CD38^+$  (rojo) respecto a la población total  $CD8^+$  (gris) en función del grado de la lesión intestinal al diagnóstico. (Adaptado de (60)).

Es destacable el caso de un voluntario con EC seropositiva diagnosticada en el que no se observó respuesta. Correspondía a un paciente que presentaba atrofia vellositaria y serología positiva al diagnóstico pero que había mantenido una DSG estricta durante 25 años. Tras realizar la prueba de provocación, volvió a su habitual DSG y tras 2 años realizó por segunda vez la provocación corta, esta vez produciéndose la aparición de las poblaciones de interés a día 6, aunque si bien, en una magnitud menor de la esperada en un individuo con dichas características diagnósticas, obteniendo un valor de “% CD8 triples + d6” de 0,064, que se encuentra en el rango que correspondería más a la reacción observada en pacientes con una lesión Marsh 1. Los datos obtenidos de este participante fueron excluidos de los análisis estadísticos por considerar una limitación haber permanecido un período muy largo (> 20 años) en una DSG estricta.

A raíz de esta observación, se quiso valorar también si existía una correlación entre el tiempo que el paciente permanece en DSG previamente a la realización de la prueba y la magnitud de la respuesta observada. Para ello, se realizó una correlación de Pearson entre la variable “% CD8 triples + d6” y el tiempo de DSG calculado en años incluyendo los participantes voluntarios con EC seropositiva y atrofia al diagnóstico (N = 16). No se obtuvo significación estadística ( $p = 0,76$ ).

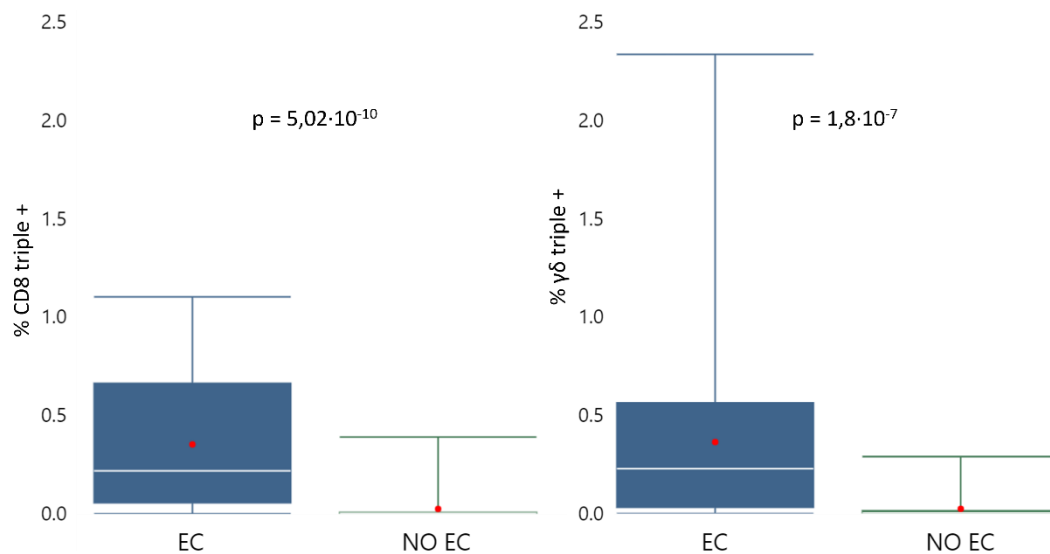
## 1.2. Participantes sin EC

Atendiendo al grupo de voluntarios para el estudio sin EC (N = 39), compuesto por controles sanos (N = 21), controles enfermos (N = 4) y STNC (N = 14), se pudo observar que, generalmente, las muestras analizadas a día 6 tras la provocación con gluten carecían de las poblaciones de interés  $CD8^+CD103^+\beta7^{hi}CD38^+$  y  $\gamma\delta^+CD103^+\beta7^{hi}CD38^+$ , o las presentaban en muy pequeña proporción, similar a la observada a día 0. Tras descartar la normalidad de la muestra, se utilizaron pruebas no paramétricas para los análisis estadísticos. El contraste de Wilcoxon para muestras pareadas concluyó que las diferencias entre ambas medidas no eran significativas, salvo en la población  $\gamma\delta^+CD103^+\beta7^{hi}CD38^+$  para los participantes con STNC, en cuyo contraste se obtuvo una  $p = 0,028$ . Sin embargo, en la Figura 20 se puede observar que estas diferencias se deben a una disminución de la población y no a una aparición de la misma a día 6 de la provocación producida por la ingesta del gluten.



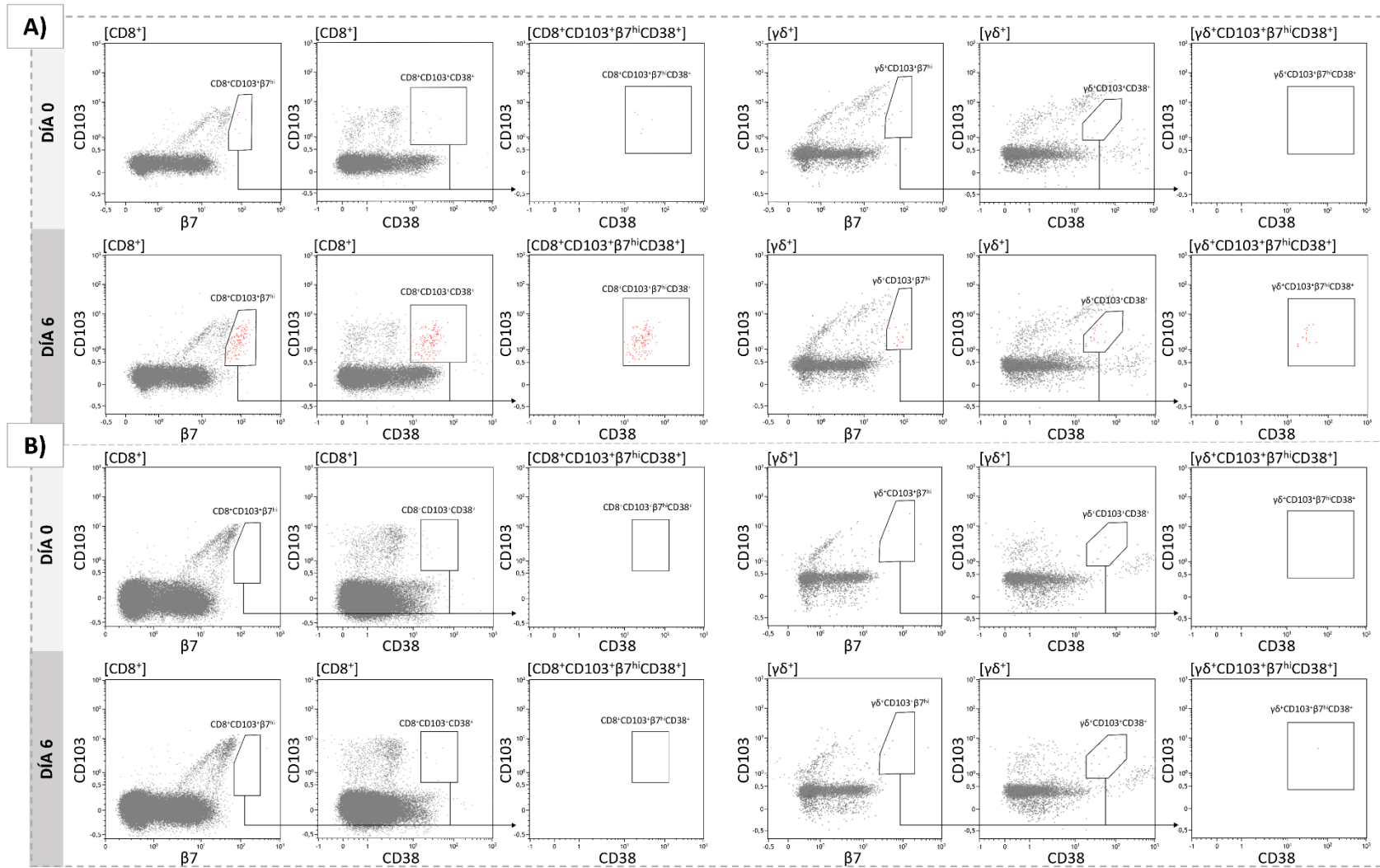
**Figura 20.** Proporción de las poblaciones de interés  $CD8^+CD103^+\beta7^{hi}CD38^+$  y  $\gamma\delta^+CD103^+\beta7^{hi}CD38^+$  con respecto a las poblaciones generales  $CD8^+$  (“% CD8 triples + d6”) o  $\gamma\delta^+$  (“%  $\gamma\delta$  triples + d6”) de manera basal y al sexto día tras el inicio de la provocación corta con gluten en voluntarios sin enfermedad celíaca. Indicados los dos casos que obtuvieron un falso positivo (ver sección 2.1.2).

El test U de Mann-Whitney mostró diferencias significativas en el “% CD8 triples + d6” y “%  $\gamma\delta$  triples + d6” entre los voluntarios con EC seropositiva (N = 23) y los participantes sin EC (agrupando controles sanos, controles enfermos y STNC) (N = 39). En la Figura 21 se muestran los gráficos box-plot que representan los datos contrastados en este análisis.



**Figura 21.** Proporción de las poblaciones de interés “% CD8 triples + d6” y “%  $\gamma\delta$  triple + d6” en pacientes con EC seropositiva frente a voluntarios sin la enfermedad (NO EC).

En la Figura 22 se muestran los distintos patrones de expresión de las poblaciones de interés  $CD8^+CD103^+\beta7^{hi}CD38^+$  y  $\gamma\delta^+CD103^+\beta7^{hi}CD38^+$  representativos de los pacientes con EC frente a los participantes sin la enfermedad obtenidos a días 0 y 6 de la provocación corta con gluten.



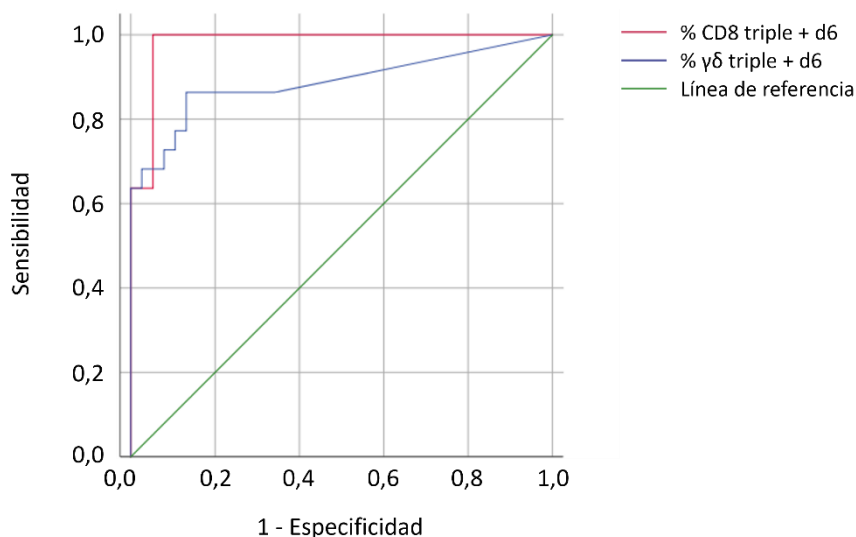
**Figura 22.** Comparativa de los distintos patrones de expresión de las poblaciones de interés CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>β7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> y γδ<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>β7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> (rojo) a días 0 y 6 de la provocación corta con gluten en función del diagnóstico. A: EC; B: Control sano. (Adaptado de (85))

## 2. VALIDEZ DE LA PRUEBA DIAGNÓSTICA

### 2.1. Validez interna: sensibilidad y especificidad

#### 2.1.1. Curvas ROC: Selección de variable y punto de corte

Se realizaron distintas curvas ROC para valorar la exactitud del test diagnóstico en función de la variable utilizada. Esto permitió escoger la variable por la que se valorará el test y establecer el valor a partir del cual se tomará la prueba como positiva. En la Figura 23 se muestran las curvas ROC obtenidas para las variables de estudio “% CD8 triple + d6” y “%  $\gamma\delta$  triple + d6”. Para estos análisis se seleccionaron participantes voluntarios con diagnóstico conocido previamente a su inclusión en el estudio. Se codificaron como casos que presentan la enfermedad, incluyendo los participantes con EC seropositiva con atrofia o con lesión histológica Marsh 1; y como casos que no presentan la enfermedad, incluyendo los voluntarios para el estudio sanos, controles enfermos e individuos con STNC. En la Tabla 9 se muestran los valores del área bajo la curva (AUC) obtenidos para cada variable. Se puede observar que la variable “% CD8 triple + d6” presenta un AUC de 0,98, lo que indica que la probabilidad de clasificar correctamente a dos individuos, uno que presenta la enfermedad y otro que no la presenta es del 98%; mientras que la variable “% $\gamma\delta$  triple + d6” presenta un valor de 0,89, lo que implicaría una disminución en la capacidad de discriminación del 9% con respecto a la variable basada en la población de CD8. Ambas variables son “informativas”, ya que los intervalos de confianza no incluyen el valor 0,5. Esto se visualiza también en que ambas curvas se encuentran por encima de la línea de referencia, la cual representa un test diagnóstico sin capacidad de discriminar un individuo enfermo de uno sano.



**Figura 23.** Curva ROC para las variables de estudio “%CD8 triple+ d6” (rojo) y “% $\gamma\delta$  triple+ d6” (azul). En verde, línea de referencia que representa un test diagnóstico con un AUC = 0,5.

**Tabla 9.** Estadísticos obtenidos para las curvas ROC para las variables de estudio “%CD8 triple+ d6” y “% $\gamma\delta$  triple+ d6”.

Variables de contraste	Área (AUC)	Error típico	Sig. Asintótica	Intervalo de confianza asintótico al 95%	
				Límite inferior	Límite superior
% CD8 triple+ d6	0,981	0,015	$6,98 \cdot 10^{-10}$	0,952	1,000
% $\gamma\delta$ triple+ d6	0,887	0,053	$6,96 \cdot 10^{-7}$	0,784	0,990

El método de De Long mostró diferencias al borde de la significación en el AUC de ambas variables con un valor de  $p = 0,055$ .

En las Tablas 10 y 11 se muestran las coordenadas de las curvas para ambas variables. En ellas se indican los posibles valores de punto de corte para la prueba, además de los valores de sensibilidad y especificidad asociados a cada uno de ellos. Con ello se puede establecer el punto de corte a partir del cual la prueba será considerada positiva en función de las características de las que se quiera dotar al test diagnóstico. Considerando que se busca obtener una prueba con una alta especificidad, se opta por el valor 0,009 como punto de corte más apropiado para la variable “%CD8 triples + d6”, al cual le corresponde una sensibilidad del 100% y una especificidad del 94’7%. Aumentar la especificidad al 97,4% escogiendo como punto de corte 0,124 supondría disminuir la sensibilidad al 63,6%, un valor demasiado bajo para una prueba diagnóstica. En la Tabla 11 se puede observar que obtener una especificidad similar utilizando la variable “% $\gamma\delta$  triple+ d6”, implicaría disminuir la sensibilidad al 68,2%; un punto de corte más adecuado para esta variable sería

0,0133, con una sensibilidad del 86% y una especificidad del 86,8%. Escoger un punto de corte en base a esta variable conllevaría perder sensibilidad y especificidad con respecto a “%CD8 triple+ d6”. Esto sumado a una peor capacidad de discriminación, implica pensar en la variable “%CD8 triple+ d6” como la más apropiada para la valoración de esta prueba y por ello será la utilizada en adelante para su evaluación.

Se debe tener en cuenta que los valores para las variables obtenidos de la realización de las curvas corresponden a las medias de dos valores de contraste observados y ordenados consecutivamente, esto implica que cuantos más casos se incluyan en la realización de la curva, más preciso será el punto de corte escogido. En este caso, 0,009 correspondería a la media entre 0,0052 (dato aportado por STNC13) y 0,0131 (dato de EC30, un voluntario para el estudio con EC seropositiva y lesión tipo Marsh 1). Todos los valores comprendidos entre estos dos, se encontrarían por el momento en la denominada “zona gris”, en la cual no se podría afirmar si un resultado es positivo o negativo, ya que durante la realización de este estudio no se dispuso de individuos con esos valores. Es por esto que disponer de un tamaño de muestra mayor, ayudaría a reducir esta “zona gris”, pudiendo clasificar con mayor certeza respuestas de menor magnitud.

**Tabla 10.** Coordenadas de la curva para la variable “%CD8 triple+ d6”.

Positivo si es $\geq$	Sensibilidad	1 - Especificidad
<b>0,0091</b>	<b>1</b>	<b>0,053</b>
0,0161	0,955	0,053
0,0202	0,909	0,053
0,0328	0,864	0,053
0,0488	0,818	0,053
0,0750	0,773	0,053
0,0981	0,727	0,053
0,1096	0,682	0,053
0,1206	0,636	0,053
0,1242	0,636	0,026
<b>0,1490</b>	<b>0,636</b>	<b>0</b>

Indicados en negrita, se muestran los valores correspondientes al 100% de sensibilidad o especificidad, respectivamente. Se muestran únicamente las coordenadas comprendidas entre dichos valores. En rojo, el valor escogido como punto de corte conforme a la sensibilidad y especificidad deseadas.

**Tabla 11.** Coordenadas de la curva para la variable “% $\gamma\delta$  triple+ d6”.

Positivo si es $\geq$	Sensibilidad	1 - Especificidad
0,0004	0,864	0,342
0,0023	0,864	0,316
0,0048	0,864	0,289
0,0064	0,864	0,263
0,0084	0,864	0,237
0,0105	0,864	0,211
0,0113	0,864	0,184
0,0124	0,864	0,158
0,0133	0,864	0,132
0,0135	0,818	0,132
0,0136	0,773	0,132
0,0146	0,773	0,105
0,0162	0,727	0,105
0,0187	0,727	0,079
0,0257	0,682	0,079
0,0326	0,682	0,053
0,0506	0,682	0,026
0,0737	0,636	0,026
<b>0,0829</b>	<b>0,636</b>	<b>0</b>

Indicados en negrita, se muestran los valores correspondientes al 100% de sensibilidad o especificidad, respectivamente. Se muestran únicamente las coordenadas comprendidas entre dichos valores.

### 2.1.2. Clasificación de casos.

Una vez establecido el punto de corte, se aplicó a los datos obtenidos de las pruebas de provocación de todos los participantes en el estudio que obtuvieron un diagnóstico concluyente al final del mismo. En función de la superación o no del punto de corte y teniendo en cuenta los criterios mencionados para la consideración de un resultado positivo (aumento de la población de interés a día 6 con respecto al día 0  $\geq$  2), se valoró la prueba como resultado “Positivo” o “Negativo”. En la Tabla 12 se muestra la clasificación de los casos, de acuerdo a los criterios establecidos, como positivos o negativos. En función de la correspondencia o no de estos resultados con los diagnósticos finales obtenidos para cada participante, se cuantificaron los casos obteniendo: 30 verdaderos positivos (VP), 54 verdaderos negativos (VN), 3 falsos positivos (FP) y 1 falso Negativo (FN).

**Tabla 12.** Clasificación de casos positivos y negativos para la prueba de provocación corta en función del diagnóstico final.

Grupo	% CD8 triple + ≥ 0,009	% CD8 triple + d6/d0 ≥ 2 veces	Positivos	Negativos
<b>EC (seropositivos) (N = 31)</b>	<b>30</b>	<b>30</b>	<b>VP: 30 (96,8%)</b>	<b>FN: 1 (3,2%)</b>
Voluntarios EC (N = 23)	22	22	22 (95,7%)	1 (4,3%)
Casos Complejos (EC) (N = 7)	7	7	7 (100%)	0
DSGA (EC) (N = 1)	1	1	1 (100%)	0
<b>NO EC (N = 56)</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>FP: 3 (5,4%)</b>	<b>VN: 54 (96,4%)</b>
Controles sanos (N = 21)	1	1	1 (4,8%)	20 (95,2%)
Controles Enfermos (N = 4)	1	0	0	4 (100%)
STNC (N = 14)	1	1	1 (7,1%)	13 (92,9%)
Casos Complejos (NO EC) (N = 8)	1	1	1 (12,5%)	7 (87,5%)
DSGA (NO EC) (N = 9)	2	0	0	9 (100%)

VP: verdaderos positivos; FN: falsos negativos; FP: falsos positivos; VN: verdaderos negativos; EC: enfermedad celíaca; DSGA: dieta sin gluten autoadministrada; STNC: sensibilidad al trigo no celíaca.

### 2.1.3. Cálculo de la Sensibilidad y Especificidad

Utilizando estos datos, se analizó la validez interna del test diagnóstico calculando los valores de sensibilidad y especificidad. Se obtuvo un valor de sensibilidad del 96,8%, lo que implica que ese elevado porcentaje de los pacientes con EC que se sometieran a la prueba presentarían un resultado positivo. En cuanto a la especificidad se obtuvo un valor del 94,7% implicando que en ese porcentaje de los individuos sanos en que se realizara la prueba, se descartaría la enfermedad.

## 2.2. Validez externa: valores predictivos (VPP y VPN) y razones de verosimilitud (RVP y RVN)

Considerando la población del estudio que obtuvo un diagnóstico concluyente al finalizar el mismo, se obtuvo un Valor Predictivo Positivo (VPP) de 90,9% y un Valor Predictivo Negativo (VPN) de 98,2%, implicando, por tanto, que un porcentaje muy elevado de pacientes con una prueba positiva presentan EC y de pacientes con una prueba negativa carecen de ella.

Del mismo modo, se obtuvo un valor para la Razón de Verosimilitud Positiva (RVP) de 18,4 y para la Razón de Verosimilitud Negativa (RVN) de 0,03. Siendo estos  $>10$  y  $<0,1$ , respectivamente, se dedujo que la prueba determinaba un cambio relevante en la probabilidad pretest con alta certeza, lo cual es un indicativo de que presenta una alta utilidad diagnóstica.

## 2.3. VARIACIÓN INTEROPERADOR

### 2.3.1. Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI)

En la Tabla 13 se muestran los valores de CCI para los datos obtenidos por dos operadores para las distintas variables de estudio: el número total de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, el número de células de la población de interés CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>β7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> y su proporción sobre la de CD8<sup>+</sup> totales a día 0 (“N CD8 total d0”, “N CD8 triples+ d0” y “% CD8 triples+ d0”), y a día 6 (“N CD8 total d6”, “N CD8 triples+ d6” y “% CD8 triples+ d6”) y lo mismo para la población de linfocitos γδ<sup>+</sup> (“N γδ total d0”, “N γδ triples+ d0”, “%γδ triples+ d0”, “N γδ total d6”, “N γδ triples+ d6” y “%γδ triples+ d6”). En todas ellas se observan cifras superiores a 0,9, lo que implica un acuerdo elevado entre las mediciones, exceptuando la variable “%γδ triples + d0” que presenta un 0,7 de CCI. Esto, unido a los valores inferiores en el resto de las variables relativas a la población γδ, corrobora la correcta elección de la población CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>β7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> como variable de estudio.

**Tabla 13.** Valores de CCI para las distintas poblaciones celulares evaluadas por dos operadores.

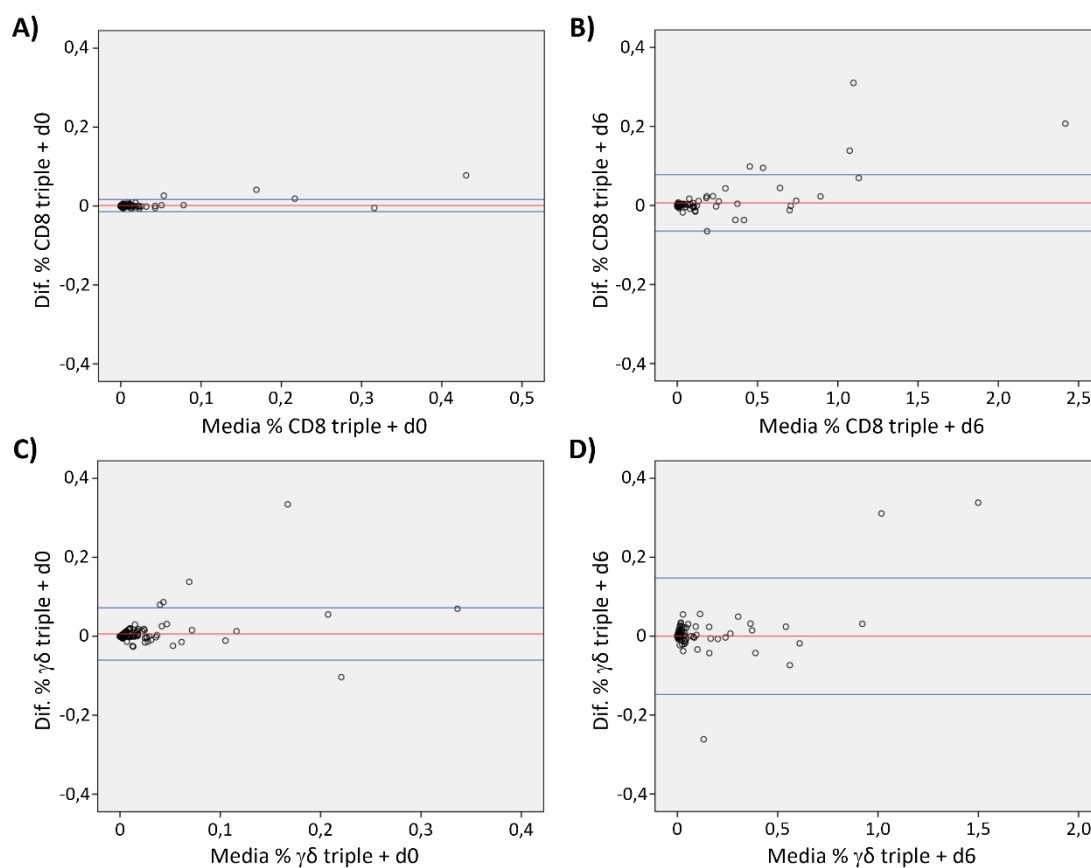
Variable	CCI
N CD8 total d0	0,998
N CD8 triples+ d0	0,997
% CD8 triples+ d0	0,991
N CD8 total d6	0,976
N CD8 triples+ d6	0,996
% CD8 triples+ d6	0,992
N γδ total d0	0,993
N γδ triples+ d0	0,939
% γδ triples+ d0	0,700
N γδ total d6	0,970
N γδ triples+ d6	0,947
% γδ triples+ d6	0,955

### 2.3.2. Gráficos de Bland-Altman

En la Figura 24 se muestran los gráficos de Bland-Altman construidos para las cuatro variables que representan la proporción de la población de interés CD103<sup>+</sup>β7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> sobre la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y γδ<sup>+</sup> totales. Se pudo evaluar la magnitud del desacuerdo entre operadores observando la situación de los

casos en relación a la media y los límites de tolerancia. La mayoría de los casos se mantuvieron dentro de los mismos, sin embargo, es destacable que conforme aumentaba el tamaño de la población de interés, es decir, a porcentajes mayores, aumentaba también la variabilidad entre operadores. Esto puede ser debido a que la selección de las poblaciones celulares en el *software* de análisis es un procedimiento manual, cuanto mayor número de células presente una población, más se solapará con otras poblaciones cercanas y más difícil será para el evaluador establecer un corte claro entre ambas. Cuando la población de interés se encuentra muy aumentada, situar el corte ligeramente desplazado a un lado u otro, implica seleccionar o dejar de seleccionar un mayor número de células. Se debe tener en cuenta que esta diferencia no ocurre únicamente entre operadores diferentes, sino que ocurriría también si un mismo operador realizara el mismo análisis dos veces, pero no implica cambios con respecto al resultado final de la prueba, claramente positiva para ambos operadores.

Estos gráficos permitieron evaluar también visualmente cuál de los dos operadores proporcionó un dato mayor que el otro en cada uno de los casos analizados, lo que permitió detectar si existía algún sesgo sistemático por parte de uno de los dos evaluadores.



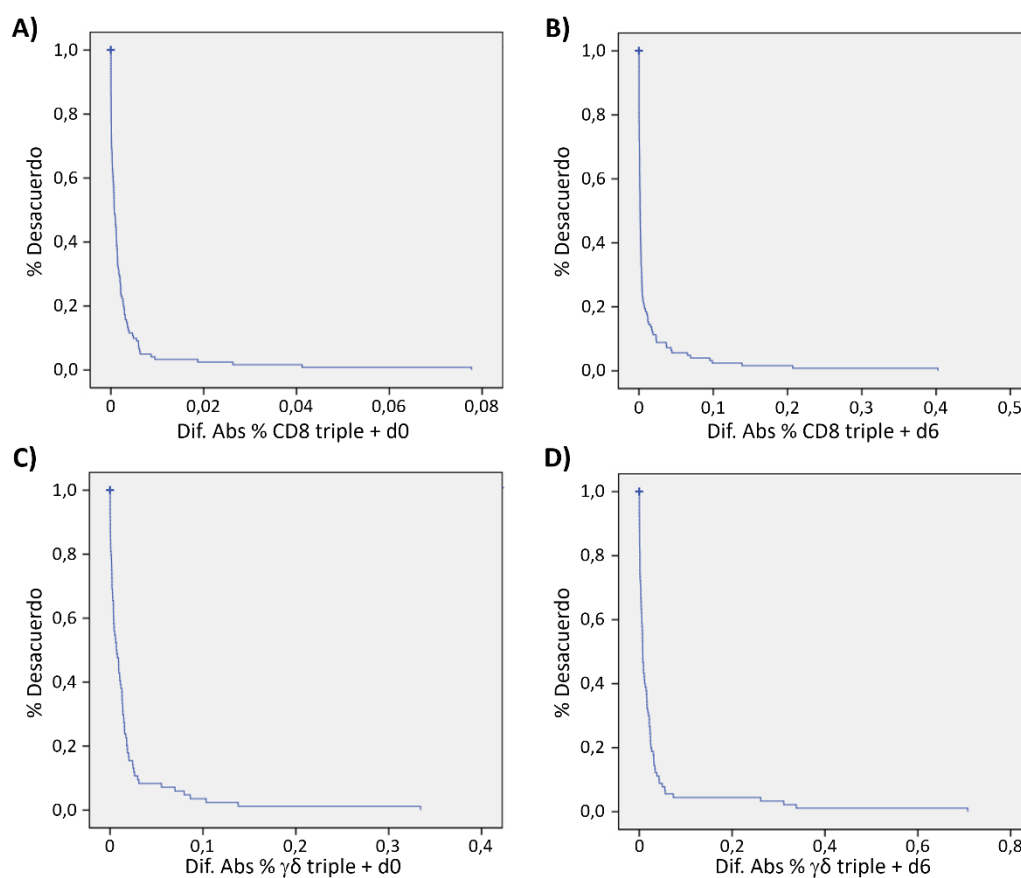
	Media	Desv. Típica	Límite superior	Límite inferior
A)	0,0013	0,0078	0,0167	-0,0142
B)	0,0071	0,0412	0,0896	-0,0754
C)	0,0059	0,0332	0,0722	-0,0605
D)	-0,0001	0,0737	0,1473	-0,1475

**Figura 24.** Gráficos de Bland-Altman para las variables: A) "% CD8 triples+ d0", B) "% CD8 triples+ d6", C) "% $\gamma\delta$  triples+ d0" y D) "% $\gamma\delta$  triples+ d6". En rojo, las medias de las diferencias de los datos aportados por ambos operadores; en azul, 2 veces las desviaciones típicas por encima y por debajo de las mismas. Sus valores correspondientes se muestran en la tabla adjunta.

### 2.3.3. Gráficos de Acuerdo - Supervivencia

En la Figura 25 se muestran las gráficas de acuerdo - supervivencia correspondientes a las cuatro variables que representan la proporción de las poblaciones de interés  $CD103^+\beta7^{hi}CD38^+CD8^+$  y  $\gamma\delta^+$  sobre la población de linfocitos T  $CD8^+$  y  $\gamma\delta^+$  totales, respectivamente. Valorando el ajuste de las curvas a los ejes, en todas ellas se puede observar que la mayoría de los casos analizados se agrupan en la zona más baja del eje de abscisas, esto implica que la mayoría de los casos presentan diferencias de pequeña magnitud. La concordancia entre operadores es muy elevada para las cuatro variables analizadas, si bien se puede observar que en las dos curvas

referentes a la población  $\gamma\delta^+$ , se presenta un mayor número de casos con diferencias más elevadas entre operadores de los que se obtienen con las variables correspondientes a la población  $CD8^+$ .

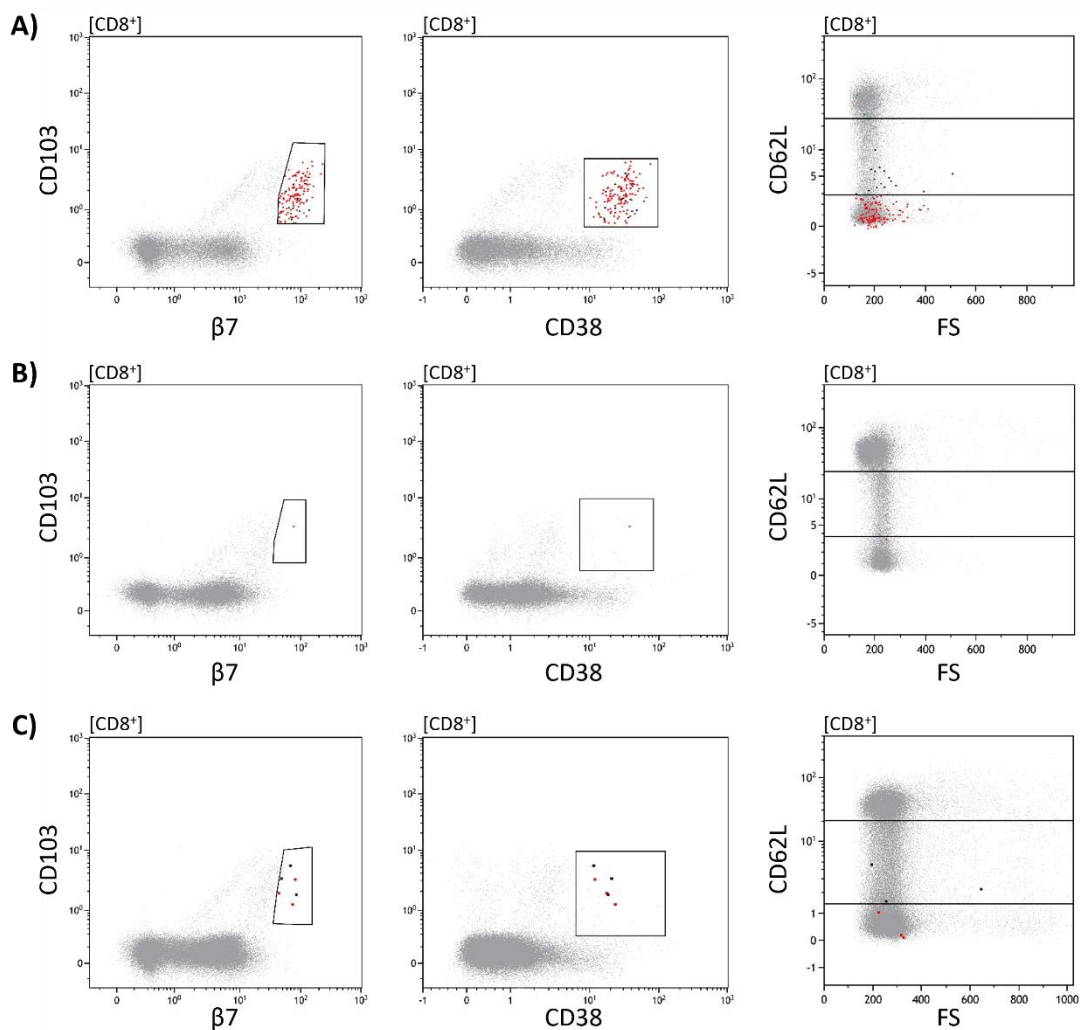


**Figura 25.** Gráficos de Acuerdo-Supervivencia para las variables: A) "% CD8 triples+ d0", B) "% CD8 triples+ d6", C) "% $\gamma\delta$  triples+ d0" y D) "% $\gamma\delta$  triples+ d6".

### 3. ESTUDIO CD62L

Se analizó la expresión de CD62L en la subpoblación celular de interés  $CD8^+CD103^+\beta7^{hi}CD38^+$  en muestras de 37 participantes en el estudio pertenecientes a distintos grupos diagnósticos. En la Figura 26 se presentan tres ejemplos de análisis de expresión de CD62L a día 6 tras la provocación con gluten de tres días, en muestras de un individuo con EC previamente diagnosticada, un control sano y un control enfermo. Se puede observar que, en todos los casos, las células seleccionadas como población de interés siguiendo la estrategia de *gating* habitual basada en los marcadores CD103,  $\beta7$  y CD38, presentan en su mayoría baja o nula expresión de CD62L, lo que correspondería con su fenotipo efector. Esto se produjo independientemente del diagnóstico final del participante analizado. En algunos casos, se pudo encontrar alguna célula  $CD62L^+$  pero no se observó

relación entre su presencia y el tipo de muestra analizada, pudiendo ser encontradas en muestras tomadas tanto a día 0 como 6 y en los distintos subgrupos diagnósticos.



**Figura 26.** Patrones de expresión de CD62L en la población de interés “% CD8 triple + d6” en A) EC; B) control sano y C) control enfermo.

En la Tabla 14 se muestran las medias de las proporciones de la población CD62L<sup>-</sup> sobre la población de interés CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>β7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> (“triples+”) y las medias de las proporciones de la misma sobre la población general CD8 considerando la selección planteada originalmente y añadiendo el marcador CD62L. Se resumen los datos obtenidos a día 0 y a día 6 en función del diagnóstico final en los participantes que lo obtuvieron (EC: N = 7; NO EC: N = 15). Se puede observar que la expresión de CD62L en la subpoblación de interés es similar en ambos grupos diagnósticos a día 0, observándose un aumento de la proporción de células CD62L<sup>-</sup> a día 6 que parece ser más acusado en los participantes con diagnóstico final de EC. Sin embargo, tras descartar el supuesto de normalidad, se realizó el contraste de Wilcoxon para muestras pareadas y se concluyó que las diferencias entre ambas medidas no eran

significativas. Atendiendo a los valores de la proporción de la población de interés respecto a los linfocitos T CD8 totales, se puede observar que se produce una disminución generalizada al considerar únicamente la población CD62L<sup>-</sup>, aunque siendo esta de muy poca magnitud y no significativa, encontrando valores de  $p > 0,05$  excepto para los casos sin EC a día 0 de la provocación.

**Tabla 14.** Resumen de los datos de expresión de CD62L en la población “CD8 triple +” y en la población general de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, a días 0 y 6 de la provocación con gluten en individuos con EC y en individuos en los que se descartó la enfermedad. Proporciones de la población de interés considerando o no el marcador CD62L para estos mismos subgrupos.

	Día 0		Día 6	
	EC	NO EC	EC	NO EC
Media de %CD62L <sup>-</sup> en “CD8 triple +”	76,19	75,97	98,24	83,04
Media de %triples+ sobre CD8 <sup>+</sup>	0,012179	0,007611	0,520833	0,012076
Media de %triples+CD62L <sup>-</sup> sobre CD8 <sup>+</sup>	0,011209	0,006328	0,511145	0,011028

Ninguna de las muestras analizadas modificó su resultado final en la prueba al considerar únicamente la población CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>β7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup>CD62L<sup>-</sup> en comparación con la selección planteada inicialmente.

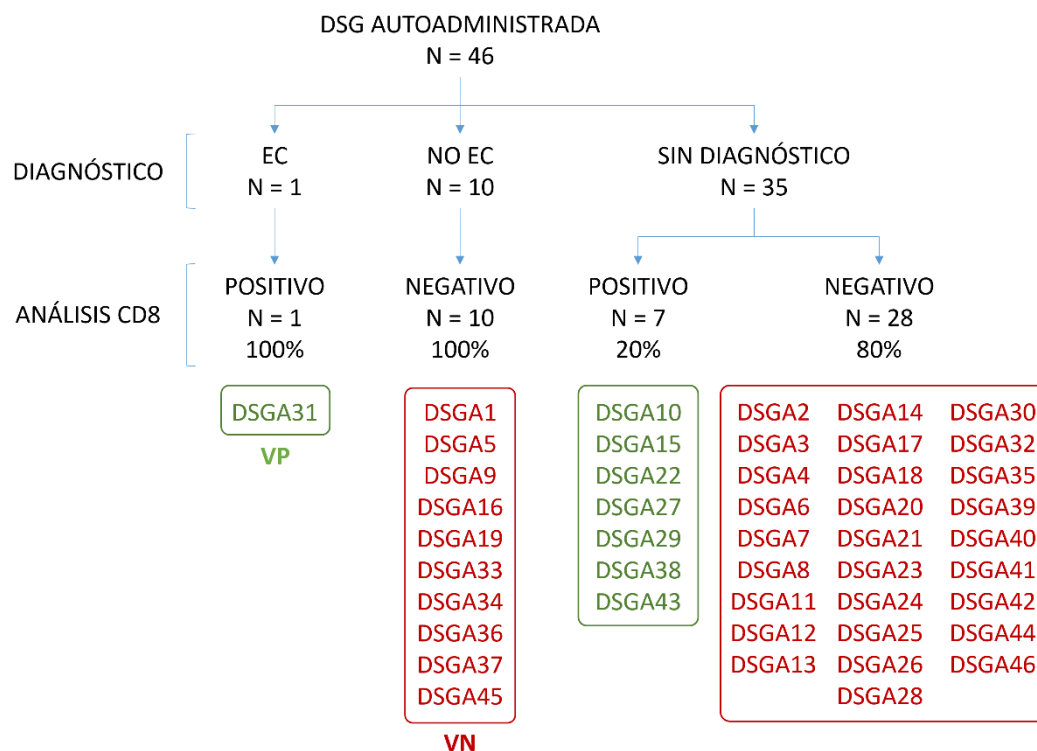
#### 4. APLICACIÓN DE LA PRUEBA PROPUESTA A PACIENTES DE PRÁCTICA CLÍNICA

Tras la optimización de la estrategia de *gating* para el análisis y el establecimiento del punto de corte deseado, se procedió a valorar el resultado de la prueba de provocación corta para los casos de práctica clínica incluidos en el estudio. Algunos casos continuaron, tras la conclusión del estudio, a una provocación larga de 8 semanas, con lo que pudieron obtener un diagnóstico definitivo, que fue comparado con el resultado de la prueba de estudio con el fin de valorar su utilidad en práctica clínica.

##### 4.1. DSG autoadministrada

De aquellos participantes que se englobaron en el grupo de DSG Autoadministrada (N = 46), se confirmó el diagnóstico de EC en un paciente con serología positiva que presentó un linfograma intraepitelial en DSG compatible. Este diagnóstico se correspondió con un resultado positivo en la prueba de provocación corta. En cuanto a los 10 pacientes en los que se descartó la enfermedad, todos ellos obtuvieron un resultado negativo. De los 35 pacientes restantes, que permanecieron sin diagnóstico concluyente, un 20% obtuvieron un resultado positivo en la prueba de provocación. En la

Figura 27 se muestra un esquema resumen de la distribución de los casos pertenecientes a este grupo en función del diagnóstico final (en caso de haber sido obtenido) y del resultado obtenido en la prueba. Las características detalladas de cada paciente están incluidas en la Tabla 3.

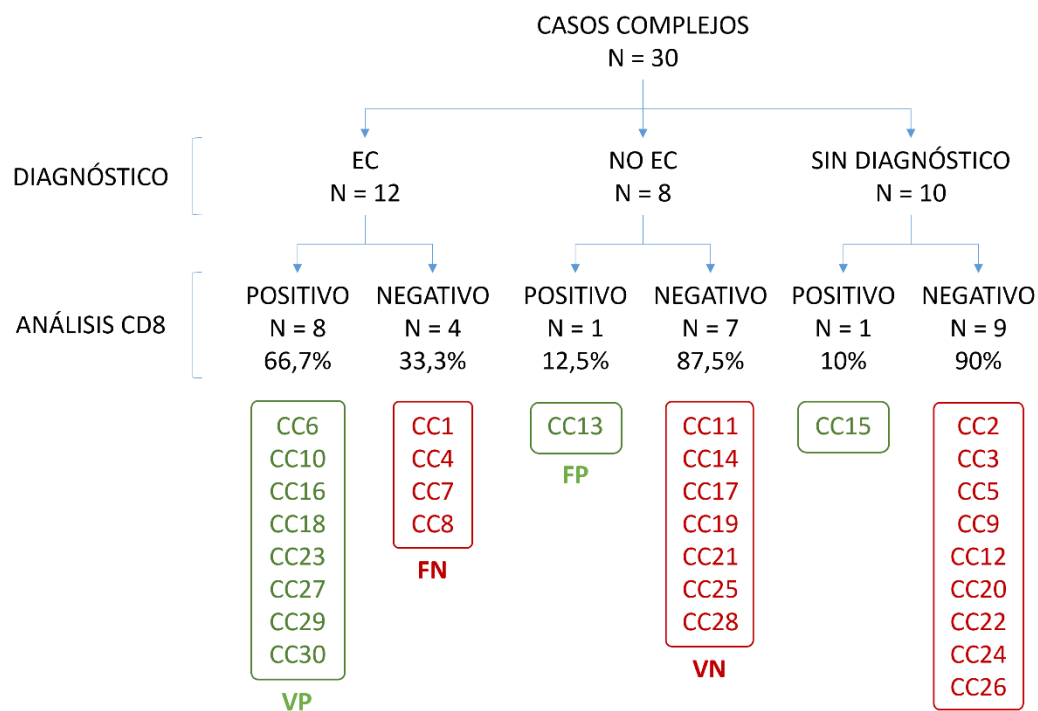


**Figura 27.** Esquema resumen de la distribución de los casos incluidos en el grupo de DSG autoadministrada en función del diagnóstico definitivo tras la finalización del estudio y del resultado obtenido en el análisis de “CD8 triple+” tras provocación corta. EC: enfermedad celíaca; DSGA: dieta sin gluten autoadministrada; VP: verdaderos positivos; VN: verdaderos negativos.

#### 4.2. Casos complejos

De los 30 pacientes incluidos en el grupo de Casos Complejos, se confirmó el diagnóstico de EC en 12 casos, concordando con un resultado positivo en la prueba de provocación corta excepto en 4 casos (33,3%) correspondientes a pacientes con serología negativa o dudosa cuyo diagnóstico fue confirmado tras la realización del linfograma intraepitelial en DSG. Se obtuvo un 87,5% de acuerdo entre el resultado de la prueba y el diagnóstico final para los 8 individuos en los que se descartó la enfermedad, presentándose un falso positivo correspondiente a un paciente seronegativo que presentaba lesión histológica tipo Marsh 1 que normalizó tras someterse a una provocación larga de 8 semanas y que presentó un linfograma intraepitelial no compatible con la enfermedad (CC13). Por otro lado, 10 casos permanecieron sin diagnóstico concluyente, de los cuales, uno obtuvo un resultado positivo para la prueba; se trata de un paciente que presentaba atrofia, pero serología negativa y linfograma

intraepitelial en DSG no compatible que no aceptó continuar a provocación larga. En la Figura 28 se muestra un esquema resumen de la distribución de los casos pertenecientes a este grupo en función del diagnóstico final en caso de haber sido obtenido tras la finalización del estudio y del resultado obtenido en la prueba. Las características detalladas de cada paciente se incluyen en la Tabla 4.

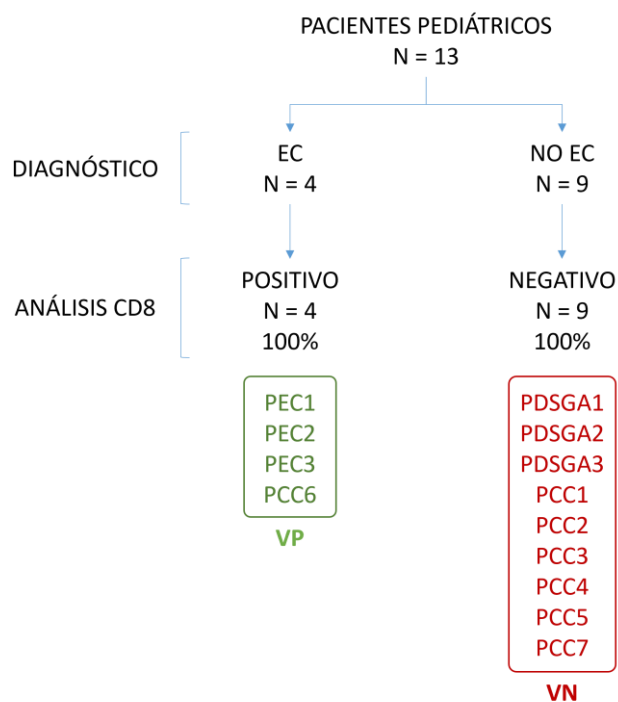


**Figura 28.** Esquema resumen de la distribución de los casos incluidos en el grupo de Casos complejos en función del diagnóstico definitivo tras la finalización del estudio y del resultado obtenido en el análisis de "CD8 triple+" tras provocación corta. EC: enfermedad celíaca; CC: casos complejos; VP: verdaderos positivos; VN: verdaderos negativos.

## 5. APLICACIÓN DE LA PRUEBA PROPUESTA EN PARTICIPANTES EN EDAD PEDIÁTRICA

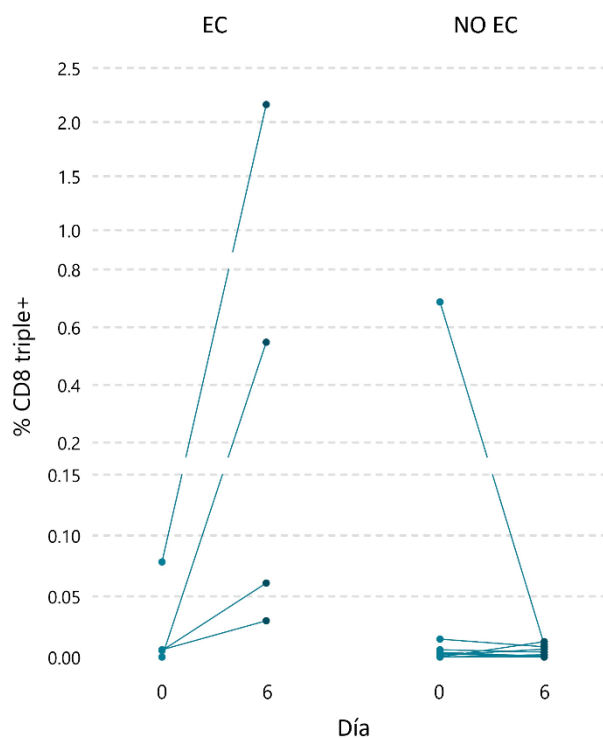
Se evaluó la respuesta a la provocación corta con gluten de 3 días en 13 pacientes con debut pediátrico. En el análisis, se evidenció que los 4 casos diagnosticados con EC obtuvieron un resultado positivo, mientras que los 9 individuos en los que se descartó la enfermedad (NO EC), obtuvieron un resultado negativo concordante con su diagnóstico.

Comparando los resultados obtenidos en la prueba de provocación con el diagnóstico final de cada participante se clasificaron los casos en verdaderos positivos, verdaderos negativos, falsos positivos y falsos negativos, como se muestra en la Figura 29, obteniendo unos valores del 100% de sensibilidad y de especificidad para esta población de estudio, si bien se debe destacar el bajo tamaño de muestra.



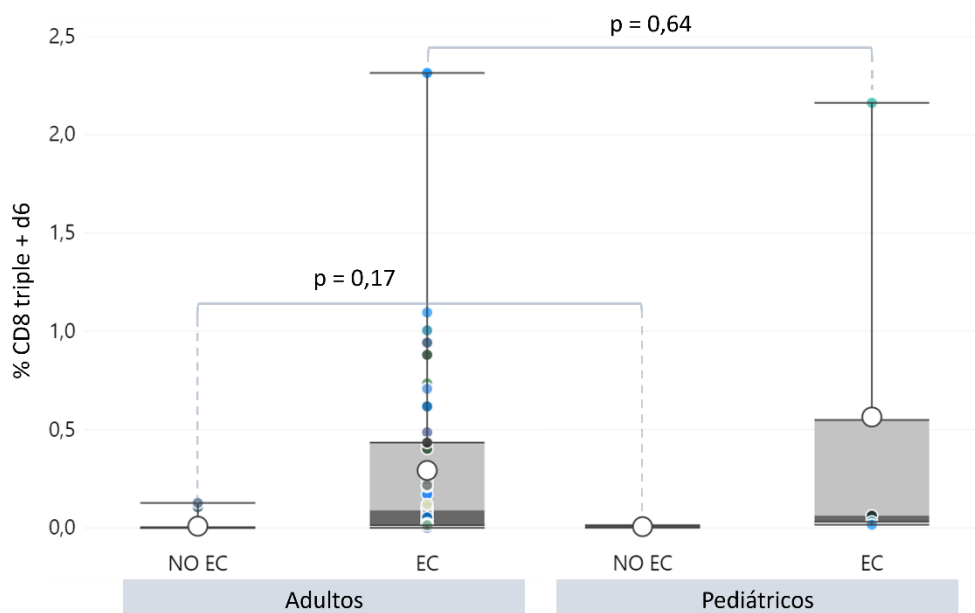
**Figura 29.** Esquema resumen de la distribución de los casos pediátricos en función del diagnóstico definitivo y resultado obtenido en la prueba de provocación. VP: verdaderos positivos; VN: verdaderos negativos.

Debido al reducido tamaño muestral, no se pudieron evaluar estadísticamente las diferencias observadas a días 0 y 6, sin embargo, se pudo corroborar que los valores obtenidos eran similares a los observados en adultos (Figura 30).



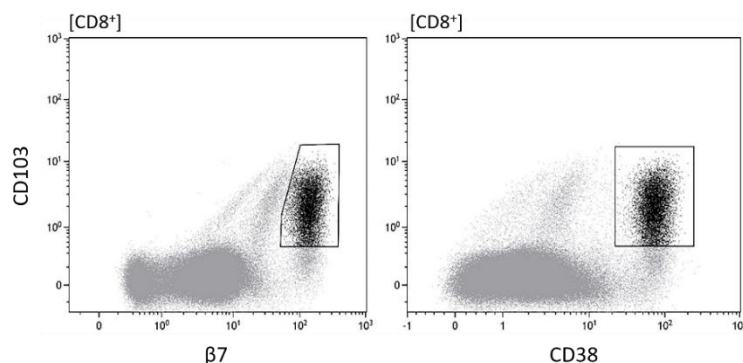
**Figura 30.** "% CD8 triple +" a días 0 y 6 de la provocación corta con gluten en pacientes en edad pediátrica con EC confirmada frente a participantes sin la enfermedad.

Se comparó la magnitud de la respuesta mostrada por los pacientes en edad pediátrica con la obtenida en los casos en edad adulta realizando gráficos *Box-plot* y utilizando el contraste para muestras independientes U de Mann-Whitney (Figura 31). Las diferencias no resultaron significativas, si bien es cierto, que se trata de un análisis preliminar con un tamaño muestral muy limitado.



**Figura 31.** Comparación de la respuesta obtenida en la prueba de provocación corta con gluten de tres días entre pacientes adultos y en edad pediátrica en función del diagnóstico obtenido. EC: Enfermedad Celíaca.

En el transcurso del estudio, uno de los niños presentó gastroenteritis durante los días de realización de la prueba de provocación. Su análisis mostró un “% CD8 triple + d6” del 5,51% (Figura 32), un dato mucho más elevado de lo esperado en base al resto de los pacientes analizados en el estudio, por lo que se planteó la posibilidad de que esta condición provocara también la aparición en sangre periférica de esta población de linfocitos T activados con direccionamiento a intestino que se sumarían a la producida por la ingesta de gluten. Ante la posibilidad de que una gastroenteritis supusiera un caso de falso positivo en la prueba, se analizaron 3 muestras de pacientes con una gastroenteritis, pero sin EC. En dos de ellas se pudo detectar la población de interés  $CD8^+CD103^+\beta7^{hi}CD38^+$  en una proporción del 0,21% y 0,15% sobre la población de linfocitos T  $CD8^+$  total, ambas por encima del punto de corte establecido para la prueba (0,009), por lo que se llegó a la conclusión de que padecer gastroenteritis durante el transcurso de la prueba es un motivo para invalidarla.



**Figura 32.** Imágenes del análisis por citometría de flujo de los linfocitos CD8<sup>+</sup> del paciente con EC y gastroenteritis en el momento de la extracción de la muestra a día 6 de la provocación corta con gluten.

## 6. COMPARACIÓN CON OTRAS PRUEBAS DIAGNÓSTICAS

### 6.1. ELISpot

Se realizaron ensayos ELISpot en pacientes con HLA-DQ2.5. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 15, donde se muestran el número de SFC detectadas en las muestras extraídas a días 0 y 6 de la provocación con gluten, la diferencia entre los mismos y los resultados obtenidos tras el análisis de la subpoblación CD8 de estudio mediante citometría de flujo tras la prueba de provocación correspondiente a cada uno de los participantes incluidos en este análisis.

**Tabla 15.** Resultados de los ensayos ELISpot (d0, d6 y diferencia) y análisis de subpoblación CD8<sup>+</sup> por citometría de flujo tras la prueba de provocación. En rojo se indican los resultados negativos y en verde los positivos.

Id	Grupo	d0	d6	Diferencia	Resultado ELISpot	Resultado CD8 <sup>+</sup>
CS18	Control Sano	111,7	23,3	-88,4	Negativo	Negativo
CS10	Control Sano	98,3	13,3	-85	Negativo	Negativo
CS19	Control Sano	158,3	83,3	-75	Negativo	Negativo
CS16	Control Sano	187,5	130	-57,5	Negativo	Negativo
CS21	Control Sano	63,30	15,00	-48,30	Negativo	Negativo
CS15	Control Sano	91,7	56,7	-35	Negativo	Negativo
CS11	Control Sano	181,7	187,5	5,8	Negativo	Negativo
CC16	EC M0+	73,3	38,3	-35	Negativo	Positivo
EC22	EC M1-	77,50	25,00	-52,50	Negativo	Negativo
EC30	EC M1+	58,33	15,00	-43,33	Negativo	Positivo
EC19	EC M1+	168,30	185,00	16,70	Negativo	Positivo
EC11	EC M3+	170,00	1,67	-168,33	Negativo	Positivo
EC14	EC M3+	128,3	135,8	7,5	Negativo	Positivo
EC26	EC M3+	67,5	133,3	65,8	Positivo	Positivo
EC32	EC M3+	123,3	250	126,7	Positivo	Positivo
EC21	EC M3+	40,00	190,00	150,00	Positivo	Positivo
EC13	EC M3+	57,5	450	392,5	Positivo	Positivo
CC17	NO EC	194,2	158,3	-35,9	Negativo	Negativo

DSGA34	NO EC	86,7	143,3	56,6	Positivo	Negativo
STNC5	STNC	134,20	18,30	-115,90	Negativo	Positivo
STNC8	STNC	76,7	15	-61,7	Negativo	Negativo
STNC6	STNC	43,33	20,00	-23,33	Negativo	Negativo
STNC3	STNC	26,7	66,7	40	Negativo	Negativo

EC: enfermedad celíaca; M0: Marsh 0; M1: Marsh 1; M3: Marsh 3; +: serología positiva; -: serología negativa; STNC: sensibilidad al trigo no celíaca

En la Tabla 16 se resumen los resultados obtenidos en los ensayos ELISpot agrupados en función del diagnóstico. De los voluntarios con EC diagnosticada (N = 10), 4 de los 6 que presentaban atrofia y anticuerpos positivos al diagnóstico (66,7%) obtuvieron un resultado positivo; de los 3 casos restantes con EC seropositiva, que comprendían participantes con lesión tipo Marsh 1 (N = 2) o sin daño histológico (N = 1), ninguno obtuvo un resultado positivo. Se analizó un caso de EC diagnosticada con lesión tipo Marsh 1 y serología negativa, que mostró un resultado negativo. Todos los individuos pertenecientes a los grupos de Controles Sanos (N = 7) y STNC (N = 4) resultaron negativos en el ensayo ELISpot, mientras que de los 2 participantes correspondientes a casos de práctica clínica y para los que se terminó descartando la enfermedad, uno mostró un resultado positivo.

**Tabla 16.** Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos ELISpot desglosados por grupo diagnóstico.

Grupo	Positivos	Negativos
Controles Sanos (N = 7)	0	7 (100%)
EC (N = 10)	M0+ (N = 1)	0
	M1+ (N = 2)	0
	M1- (N = 1)	0
	M3+ (N = 6)	4 (66,7%)
NO EC (N = 2)	1 (50%)	1 (50%)
STNC (N = 4)	0	4 (100%)

EC: enfermedad celíaca; M0: Marsh 0; M1: Marsh 1; M3: Marsh 3; +: serología positiva; -: serología negativa; STNC: sensibilidad al trigo no celíaca

Para realizar la comparación entre el ELISpot y la prueba evaluada en este trabajo (citometría de la subpoblación CD8+ tras provocación corta) en lo relativo a los cálculos de sensibilidad y especificidad se tuvieron en cuenta únicamente los pacientes con EC seropositiva. Se clasificaron los casos en función del resultado del ensayo y el diagnóstico final del paciente analizado. Ambas pruebas presentaron un falso positivo, sin embargo, la prueba de provocación detectó 4 casos más que resultaron negativos en el ensayo ELISpot, para el cual se obtuvieron valores de sensibilidad y especificidad del 44,4% y del 92,3%, respectivamente, frente un 100% de sensibilidad y un 92,3% de especificidad reflejado para el análisis de CD8+. Estos datos se recogen en la Tabla 17.

**Tabla 17.** Clasificación de casos para el cálculo de los valores de sensibilidad y especificidad del ensayo ELISpot y la prueba de provocación corta.

	ELISpot	Citometría CD8 <sup>+</sup>
VP	4	9
VN	12	12
FP	1	1
FN	5	0
<b>Sensibilidad</b>	44,4	100
<b>Especificidad</b>	92,3	92,3

VP: verdaderos positivos; VN: verdaderos negativos;  
FP: falsos positivos; FN: falsos negativos.

## 6.2. Linfograma intraepitelial en DSG

En la Tabla 18 se recogen los datos obtenidos para aquellos participantes a los que se les realizó la determinación del linfograma intraepitelial en DSG (N = 36). Se pudo observar que en un 69,7% de los casos que presentaron un resultado concluyente en ambas pruebas se obtuvo un acuerdo entre las mismas. Para aquellos casos en los que el diagnóstico era conocido, se comprobó cuál de las dos pruebas hubiera contribuido a la correcta clasificación del paciente, indicándolo en la última columna. Se encontraron 3 casos (CE6, DSGA27 y DSGA8) que presentaron valores de % $\gamma\delta^+$  muy próximos al 10% (límite del punto de corte) junto con %CD3<sup>-</sup> elevados y se excluyeron de las comparaciones realizadas. A pesar de que se conoce que la población CD3<sup>-</sup> se reestablece al retirar el gluten de la dieta, es discutible qué valores se podrían volver a alcanzar, por ello se decidió no incluirlos.

**Tabla 18.** Comparación de resultados del linfograma intraepitelial en DSG y el análisis de la subpoblación CD8<sup>+</sup> por citometría para todos los participantes incluidos. Resaltado en rosa se indican los casos detectados por el linfograma intraepitelial y no por la prueba de provocación, en azul, los casos en la situación inversa y en amarillo, los casos en los que se presenta un desacuerdo entre las pruebas, pero el diagnóstico se desconoce.

Caso	Dx final	Linfograma DSG		Prueba CD8	Linfograma vs. CD8
		% $\gamma\delta^+$	%CD3 <sup>-</sup>		
CC1	EC	33,7	5,8	Negativa	Diagnóstico por linfograma
CC10	EC	3,5	15,5	Positiva	Diagnóstico por CD8
CC18	EC	8,5	6,5	Positiva	Diagnóstico por CD8
CC23	EC	6	7,4	Positiva	Diagnóstico por CD8
CC29	EC	18,9	11,3	Positiva	Acuerdo
CC4	EC	15,9	3,8	Negativa	Diagnóstico por linfograma
CC6	EC	10,8	7,2	Positiva	Acuerdo
CC7	EC	45,3	0,3	Negativa	Diagnóstico por linfograma
DSGA31	EC	25	0,7	Positiva	Acuerdo
EC12	EC	37,6	12,9	Positiva	Acuerdo
EC5	EC	17,8	1,2	Positiva	Acuerdo
CC8	EC	13,5	0,6	Negativa	Diagnóstico por linfograma
CE6	NO EC	10,6	43,5	Negativa	-

STNC1	STNC	6	12	Negativa	Acuerdo
CC12	Sin Dx	2,5	25	Negativa	Acuerdo
CC15	Sin Dx	4,1	3,5	Positiva	Desacuerdo
CC2	Sin Dx	2,7	12,6	Negativa	Acuerdo
CC20	Sin Dx	5,4	1,8	Negativa	Acuerdo
CC3	Sin Dx	1,3	23,5	Negativa	Acuerdo
CC5	Sin Dx	4,1	4,2	Negativa	Acuerdo
CC9	Sin Dx	4,7	22,2	Negativa	Acuerdo
DSGA14	Sin Dx	3,6	1,6	Negativa	Acuerdo
DSGA17	Sin Dx	5,3	5,2	Negativa	Acuerdo
DSGA2	Sin Dx	3	12	Negativa	Acuerdo
DSGA20	Sin Dx	6,1	51,6	Negativa	Acuerdo
DSGA27	Sin Dx	11,9	23,5	Positiva	-
DSGA28	Sin Dx	1,2	16,8	Negativa	Acuerdo
DSGA3	Sin Dx	2,8	38,3	Negativa	Acuerdo
DSGA4	Sin Dx	16	13,5	Negativa	Desacuerdo
DSGA40	Sin Dx	5,4	32,2	Negativa	Acuerdo
DSGA42	Sin Dx	2,1	32	Negativa	Acuerdo
DSGA43	Sin Dx	4,3	19,4	Positiva	Desacuerdo
DSGA5	Sin Dx	1,3	2,8	Negativa	Acuerdo
DSGA6	Sin Dx	2,6	7,4	Negativa	Acuerdo
DSGA7	Sin Dx	3	25	Negativa	Acuerdo
DSGA8	Sin Dx	10,5	35,9	Negativa	-

Dx: diagnóstico; DSG: dieta sin gluten; EC: enfermedad celíaca

Para poder contrastar de manera general el comportamiento de ambas pruebas, se realizó una comparativa agrupando los casos atendiendo al diagnóstico alcanzado tras la finalización del estudio (Tabla 19). Los pacientes con EC se muestran desglosados en función del grado de la lesión intestinal y la serología presentadas.

**Tabla 19.** Comparativa de resultados del linfograma intraepitelial en DSG frente al análisis de CD8 tras la prueba de provocación corta.

Dx Final	Linfograma Intraepitelial DSG		Prueba CD8	
	Compatible	No Compatible	Positiva	Negativa
EC (N = 12)	10 (83,3%)	2 (16,7%)	8 (66,7%)	4 (33,3%)
M0+ (N = 1)	1 (100%)		1 (100%)	
M1+ (N = 2)	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	
M1- (N = 2)	2 (100%)			2 (100%)
M2- (N = 1)	1 (100%)			1 (100%)
M3+ (N = 2)	1 (50%)	1 (50%)	2 (100%)	
M3- (N = 2)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)	1 (50%)
Sin Bx (N = 1)	1 (100%)		1 (100%)	
NO EC (N = 1)		1 (100%)		1 (100%)
STNC (N = 1)		1 (100%)		1 (100%)
Sin Dx (N = 20)	1 (5%)	19 (95%)	2 (10%)	18 (90%)

DSG: dieta sin gluten; EC: enfermedad celíaca; Dx: diagnóstico; M0: Marsh 0; M1: Marsh 1; M2: Marsh 2; M3: Marsh 3; STNC: sensibilidad al trigo no celíaca; +: serología positiva; -: serología negativa

Se pudo observar que de los 5 pacientes incluidos con EC seronegativa, los 3 casos con lesión histológica tipo Marsh 1 o 2 fueron detectados por el linfograma intraepitelial en DSG pero no por la prueba de provocación, mientras que de los 2 que presentaban atrofia, 1 resultó positivo sólo en la prueba de provocación y el otro sólo en el linfograma intraepitelial. Del mismo modo, se contabilizaron los casos de “Acuerdo” o “Desacuerdo” entre ambas pruebas atendiendo al diagnóstico final y las características histológicas y serológicas de los pacientes con EC (Tabla 20). En relación a los 5 pacientes seropositivos, se presentó un acuerdo entre ambas pruebas en un 60% de los casos y los 2 casos en los que hubo desacuerdo fueron detectados por la prueba de provocación. En cuanto a los participantes que no presentaban EC o que padecían STNC, se obtuvo un consenso entre ambas pruebas en los 2 casos estudiados. Atendiendo a los participantes que no obtuvieron un diagnóstico concluyente, se produjo un acuerdo entre las pruebas en el 85%, mientras que 2 casos (CC15 y DSGA43) presentaron un resultado positivo sólo en el análisis de CD8 y 1 (DSGA4) y obtuvo únicamente un linfograma intraepitelial compatible con la enfermedad.

**Tabla 20.** Resumen de casos en acuerdo o desacuerdo para los resultados del linfograma intraepitelial en DSG y en análisis de CD8<sup>+</sup> tras provocación corta con gluten.

Dx final	Acuerdo	Desacuerdo	
		Diagnóstico por Linfograma	Diagnóstico por prueba CD8
EC (N = 12)	5 (41,67%)	4 (33,33%)	3 (25%)
M0+ (N = 1)	1 (100%)		
M1+ (N = 2)	1 (50%)		1 (50%)
M1- (N = 2)		2 (100%)	
M2- (N = 1)		1 (100%)	
M3+ (N = 2)	1 (50%)		1 (50%)
M3- (N = 2)		1 (50%)	1 (50%)
Sin Bx (N = 1)	1 (100%)		
NO EC (N = 1)	1 (100%)		
STNC (N = 1)	1 (100%)		
Sin Dx (N = 20)	17 (85%)	3 (15%)	

EC: enfermedad celíaca; M0: Marsh 0; M1: Marsh 1; M2: Marsh 2; M3: Marsh 3; Sin Dx: sin diagnóstico concluyente; STNC: sensibilidad al trigo no celíaca; +: serología positiva; -: serología negativa.



# DISCUSIÓN

Este trabajo tiene como objetivo la descripción y puesta a punto de una prueba que permita establecer el diagnóstico de enfermedad celíaca (EC) en individuos que han comenzado una dieta sin gluten (DSG). Se plantean los aspectos metodológicos requeridos para su realización, se analiza su funcionamiento en distintos grupos de pacientes, se evalúa su eficacia diagnóstica calculando los valores de sensibilidad y especificidad, así como la reproducibilidad entre operadores y se pone a prueba su utilidad en la práctica clínica mediante su aplicación en casos de complejo diagnóstico y de DSG autoadministrada. En base a ello, propondremos finalmente un nuevo algoritmo que la incorpore a los procedimientos diagnósticos vigentes, ampliando así los individuos a los que pueden ser aplicados.

La EC se caracteriza por la presencia de atrofia, anticuerpos específicos, genética HLA-DQ2/8 y sintomatología clínica asociada al consumo de gluten. Sin embargo, la realidad en la práctica clínica es que se pueden encontrar pacientes que presentan lesiones duodenales leves o bajos títulos de anticuerpos, casos de atrofas persistentes o seronegativas, sospechas de falsos positivos en la serología, pacientes con alta sospecha de EC pero genética no compatible o de bajo riesgo. Esto unido a la gran heterogeneidad de síntomas, dificulta el diagnóstico de esta enfermedad (86). Hay que recordar además que el patrón clásico de la EC no es el más común en adultos (87). El linfograma intraepitelial es una prueba que supone un fuerte apoyo al diagnóstico (59,88–90), pero solo está aceptada en el Protocolo de diagnóstico precoz de nuestro país y todavía no está disponible en muchos centros.

La EC no reconocida puede acarrear consecuencias importantes para la salud del paciente, por lo que es fundamental la detección precoz. Del mismo modo, es imprescindible un correcto diagnóstico, ya que el mantenimiento de una DSG de por vida conlleva un impacto económico, psicológico y social, alterando la calidad de vida del individuo, sin olvidar que se puede dejar de diagnosticar otra patología existente. Actualmente el proceso diagnóstico se ve agravado porque requiere que el paciente se encuentre manteniendo una DCG. Esto supone una limitación importante porque son muchos los pacientes que acuden a consulta tras haber retirado el gluten de la dieta sin disponer de un diagnóstico concluyente. El diagnóstico en DSG supone un reto para los profesionales, que durante los últimos 10 años han visto incrementado el número de casos en esta situación en sus consultas. Por tanto, es primordial el establecimiento de un nuevo método diagnóstico que permita la correcta clasificación de estos pacientes, lo cual ha sido el objetivo principal de este trabajo.

En la actualidad, el diagnóstico de la EC en DSG exige la reintroducción del gluten en la dieta, pero tanto la duración de la provocación como la cantidad de gluten administrada durante la misma siguen siendo motivo de controversia. Además, se ha puesto de manifiesto que el cambio serológico e histológico tras provocaciones largas presenta una gran variabilidad interindividual (76,91). Por el contrario, se evidenció que las respuestas tempranas basadas en cambios inmunológicos que tienen lugar durante provocaciones cortas producen unas respuestas mucho más homogéneas (66,71), lo que supone una clara ventaja de cara a la estandarización de una prueba. Nuestro trabajo plantea una provocación con gluten estandarizada, con una cantidad fijada en 10 g de gluten diarios y una duración de 3 días. Este reducido tiempo de exposición disminuye el riesgo para el paciente, ya que es insuficiente para el desarrollo de atrofia (76,91), y se ha visto que en general es bien tolerado por los pacientes, a diferencia de la provocación larga, a la que muchos de ellos temen enfrentarse y rechazan.

El nuevo método diagnóstico propuesto se basa en la detección de linfocitos con direccionamiento al intestino (CD103 y  $\beta 7$ ) y el marcador de activación CD38 en sangre periférica. Inicialmente y conforme a la literatura (71) se planteó el estudio de las poblaciones de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>. Sin embargo, la frecuencia en sangre periférica de la población  $\gamma\delta$  es muy baja, por lo que, en muchas ocasiones, la subpoblación celular de interés se detecta en cifras demasiado bajas como para poder ser considerada una población celular de manera fiable y no como eventos aleatorios que se pueden observar en muestras basales o de controles sanos (92). Por el contrario, pequeños cambios en el número de células no tienen tanto impacto sobre poblaciones abundantes como CD8, conduciendo a resultados consistentes. Esto, unido a que el estudio de la población  $\gamma\delta$  no aumentaba la sensibilidad ni la especificidad de la prueba basada en CD8, hizo que finalmente se descartase el empleo de  $\gamma\delta$  con fines diagnósticos.

La prueba de estudio basada en la movilización de linfocitos CD8<sup>+</sup> mostró una sensibilidad muy elevada para la detección de EC seropositiva, del 97%, manteniendo también una alta especificidad, del 95%, valores que indican que el test presenta una alta capacidad tanto para detectar la enfermedad cuando el paciente la presenta, como para descartarla cuando está ausente, siendo comparables a los descritos para las pruebas utilizadas actualmente en el diagnóstico de la EC. Esto sitúa al análisis de CD8<sup>+</sup> tras provocación corta como un test efectivo a un nivel similar que los métodos actuales. En referencia a su validez externa, se obtuvo un VPP = 90,9 y un VPN = 98,2. En cuanto a las razones de verosimilitud, fueron RVP = 18,4 y RVN = 0,03, lo que indica una utilidad clínica

altamente relevante (93). Se debe tener en cuenta que tanto los VP como las RV se encuentran influenciados por la prevalencia de la enfermedad. La muestra empleada para hacer estos cálculos contaba con un 36% de casos con EC, porcentaje diferente al presentado por ejemplo en el grupo de casos complejos obtenidos de una consulta monográfica (65%) o en el de DSG autoadministrada (12,5%), grupo este último en el que se incluyen muchos individuos que se retiraron el gluten de la dieta sin motivos diagnósticos concluyentes o incluso por moda, y en el que la prueba podría mostrar peor comportamiento dada la menor frecuencia de la enfermedad. Es por esto que se debe tener en mente que los valores obtenidos en este estudio pueden no ser extrapolables a otras poblaciones de estudio, y que deben ser calculados en base a la población considerada de cada hospital, consulta o centro de análisis. En este sentido, hay que considerar también que la muestra de pacientes utilizados en nuestro estudio no es representativa de la realidad de la enfermedad, se trata de un conjunto en el que los casos de diagnóstico dudoso se encuentran sobrerrepresentados. Sin embargo, es el grupo de pacientes a los que será aplicada en la práctica clínica.

Dentro de los casos con EC seropositiva, es de destacar que la prueba propuesta en esta tesis muestra una alta precisión diagnóstica tanto para casos con lesión tipo Marsh 3 como Marsh 1, lo que podría permitir distinguir estos casos de falsos positivos de la serología asociados a lesiones inespecíficas o causadas por otras patologías. Se observó que la magnitud de la respuesta era mayor en pacientes con atrofia que en pacientes con lesión histológica de bajo grado (Marsh 1). Se ha descrito que existe una relación entre el grado del daño histológico y el título de anticuerpos ATG2 (94–96), hallazgos que en Europa condujeron a establecer el diagnóstico sin biopsia en población infantil (1,42). En 2018 Sarna et al, mediante el uso de tetrámeros HLA-DQ-gliadina, describieron una correlación entre el grado de la lesión histológica y la respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> tras una provocación con gluten de 6 días (97). Los datos obtenidos en este estudio sugieren que ocurre algo similar con la respuesta de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en sangre periférica tras una provocación de 3 días. Al tratarse de células de memoria efectora con direccionamiento a intestino, que supuestamente producirán directa o indirectamente daño al epitelio, tiene sentido que la proporción que se detecte esté relacionada con el nivel de lesión que presentó el paciente al diagnóstico. Esta observación nos podría hacer valorar la posibilidad de establecer dos puntos de corte, uno sugerente de atrofia inicial y otro de lesión histológica de bajo grado.

En cuanto a su efectividad en casos de atrofia seronegativa, sólo se pudieron evaluar 3 pacientes con EC con estas características, de los cuales 2 ofrecieron un resultado positivo.

No obstante, la falta de respuesta en el tercer caso (CC7) puede ser debida a que la paciente permaneció únicamente 1 mes en DSG previamente a la realización de la prueba y si la adherencia a la dieta no fue estricta, es posible que este tiempo haya sido insuficiente. Además, se estudió una atrofia no celíaca, ofreciendo el paciente una prueba negativa. Se evaluaron 4 casos adicionales con atrofia que continúan sin diagnóstico, de los que solo 1 caso (CC15) resultó positivo para la prueba CD8, caracterizado por presentar HLA-DQ2.2 y linfograma no compatible en DSG, que rechazó continuar a provocación larga por recaída clínica. Es evidente que es necesario ampliar el tamaño muestral para poder obtener conclusiones sobre el funcionamiento de la prueba en este grupo, que de ser adecuado supondría un gran apoyo al diagnóstico de estos pacientes, que actualmente suponen un verdadero reto.

Por último, se examinó el comportamiento de la prueba en casos con EC con lesión histológica tipo Marsh 1 y serología negativa al debut. Se trata de un grupo muy controvertido en la literatura, cuyo diagnóstico en los pacientes incluidos en este trabajo se basó en la presencia del linfograma intraepitelial celíaco. Se reclutaron 7 pacientes con EC con estas características, resultando todos negativos en el análisis de CD8<sup>+</sup>. Por el contrario, se obtuvieron 2 falsos positivos entre los 9 casos Marsh 1 seronegativos sin EC estudiados, correspondientes a un caso complejo (CC13) y un caso de STNC (STNC5), ambos presentando HLA-DQ2.2 con linfograma no compatible en DCG. Entre los 4 individuos analizados que no obtuvieron un diagnóstico final, no se detectó ningún caso con respuesta CD8<sup>+</sup> positiva. De estos resultados se puede deducir que el test diagnóstico propuesto en esta tesis no es apropiado para el diagnóstico de pacientes seronegativos con lesión histológica de bajo grado al debut. Sin disponer de datos previos de serología, el clínico debe tener en cuenta que esta prueba es bastante sugerente de EC cuando se obtiene un resultado positivo, sin embargo, un resultado negativo no permite descartar la enfermedad con seguridad, pudiendo tratarse de un caso de EC seronegativa.

La elección del punto de corte para una prueba diagnóstica siempre requiere un compromiso entre la sensibilidad y la especificidad. En ocasiones, se prioriza la sensibilidad, como en casos de enfermedades altamente infecciosas o con complicaciones graves en las que conviene reducir el número de falsos negativos; por otro lado, se suele primar la especificidad por ejemplo en casos en los que el procedimiento a seguir tras la obtención del positivo resulta costoso o arriesgado para el paciente, buscando minimizar el número de falsos positivos (98). En el caso de la EC, el único tratamiento existente actualmente es el establecimiento de una DSG de por vida, con las implicaciones económicas y sociales que

esto supone para el paciente, se debe correr el menor riesgo posible de diagnosticar erróneamente a un individuo sano. Teniendo esto en cuenta, se decidió determinar un punto de corte para la prueba con el mayor valor de especificidad posible, sin sacrificar por ello demasiada sensibilidad, ya que no detectar a un paciente con EC podría acarrear consecuencias importantes para su salud.

Tras el análisis del comportamiento de la prueba en voluntarios con EC diagnosticada y voluntarios sin la enfermedad y la realización de la curva ROC, se establecieron dos criterios para la determinación de un resultado positivo:

1. El aumento de al menos el doble en la proporción de la población de interés  $CD8^+CD103^+B7^{hi}CD38^+$  con respecto a la población general  $CD8^+$  a día 6 en relación al día 0 (estado basal). Esto correspondería a una movilización de la población de interés provocada por la ingesta de gluten.
2. La superación de un valor mínimo de esa proporción de la población de interés respecto a la población general a día 6. En base a los datos, el punto de corte se fijó en 0,009%, es decir, en la presencia de 9 linfocitos  $CD103^+B7^{hi}CD38^+ CD8^+$  por cada 100.000 linfocitos  $CD8^+$  en sangre periférica.

La prueba fue capaz de detectar 30 de los 31 casos de EC seropositiva analizados en este estudio, correspondiendo el único falso negativo obtenido (EC25) a una paciente que presentaba títulos de anticuerpos ATG2 muy bajos, en la zona gris del kit. Del mismo modo, descartó eficazmente la EC en 51 de los 54 casos incluidos que no presentaban la enfermedad, constando los 3 falsos positivos de un control sano (CS4) voluntario para el estudio con HLA-DQ2.5 y serología negativa que presentó biopsia normal; un paciente con diagnóstico de STNC (STNC5), muy sensible al gluten por sintomatología, con HLA-DQ2.2, serología negativa, que había debutado con lesión histológica tipo Marsh1 y en el que se descartó la enfermedad por presentar un linfograma intraepitelial no compatible en DCG; y un caso complejo (CC13) con HLA-DQ2.2, serología negativa, lesión histológica tipo Marsh 1 y linfograma intraepitelial no compatible en DCG que normalizó la mucosa y mantuvo serología negativa tras una provocación larga, lo que descartó definitivamente el diagnóstico de EC.

Se quiso comprobar la aplicación de este nuevo método diagnóstico a la práctica clínica, por lo que durante el período de reclutamiento se propuso participar en el estudio a todos los pacientes procedentes de las consultas monográficas de EC del Hospital Clínico San Carlos y Hospital Fundación Jiménez Díaz que se pudieran beneficiar del resultado de esta prueba. Los pacientes se clasificaron en dos grupos en función de la problemática que

ocasionaba su falta de diagnóstico en el momento de la inclusión en el estudio: casos que se encontraban manteniendo una DSG autoadministrada sin disponer de un diagnóstico de EC previo y casos de complejo diagnóstico en las que los resultados de las pruebas eran contradictorios o no concluyentes. El diagnóstico de este tipo de pacientes exige actualmente llevar a cabo una reintroducción del gluten durante al menos 6 - 8 semanas para poder realizar las pruebas de serología y biopsia, que precisan de la exposición al mismo para su óptimo rendimiento. Sin embargo, es fundamental destacar que de los 46 casos incluidos en el grupo de DSG autoadministrada, sólo 10 (22%) aceptaron realizarla mientras que, de los 30 individuos clasificados como casos complejos, 12 (40%) lo hicieron. Esto refleja claramente la reticencia de los pacientes a seguir este procedimiento por temor a la recaída clínica y al desarrollo de atrofia. Siguiendo el algoritmo diagnóstico habitual, sólo 11 de los 46 casos en DSG autoadministrada y 20 de los 30 casos complejos incluidos en este estudio consiguieron ser diagnosticados tras la finalización del mismo, quedando un 60% de los casos que acuden a consulta sin diagnóstico (Figura 8). Estas cifras revelan la clara necesidad de incorporar una nueva metodología como la propuesta en este trabajo que permita solventar esta problemática.

El diagnóstico sugerido por el análisis de CD8<sup>+</sup> propuesto mostró un 100% de concordancia con el obtenido tras la provocación larga (con serología y biopsia) de los casos de DSG autoadministrada, tanto en los 9 en los que se descartó la enfermedad como en el único en que se confirmó. De los 35 individuos que quedaron sin diagnóstico concluyente tras la finalización del estudio, la prueba detectó 7 presuntos casos de EC, los cuales obtendrían un diagnóstico firme en caso de aceptarse la prueba basada en CD8.

El grupo de pacientes propuestos como de complejo diagnóstico engloba una amplia variedad de situaciones entre las que se incluyen pacientes bajo sospecha por sintomatología pero que presentan discrepancias entre la histología y la serología, ya sean lesiones histológicas de bajo grado o atrofas seronegativas; casos de atrofas persistentes; sospechas de falsos positivos de la serología; o pacientes con alta sospecha de EC, pero con genética no compatible o de bajo riesgo. Todos ellos suponen un verdadero reto diagnóstico para el especialista. De los 20 casos que finalizaron el estudio obteniendo un diagnóstico concluyente mediante el procedimiento habitual, 15 obtuvieron un resultado de nuestra prueba acorde al mismo, mientras que en 5 casos se encontró un desacuerdo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que 2 de ellos (CC1 y CC8) presentaban serología negativa y lesión histológica de bajo grado, por lo que ahora sabemos que no debemos esperar su detección mediante la realización esta prueba. En cuanto a CC4 y CC7, presentaban serología EMA

negativa o sin realizar, carecían de linfograma intraepitelial en DCG, no aceptaron someterse a provocación larga y confirmaron su diagnóstico únicamente mediante la realización del linfograma en DSG, al cual se han asociado valores de sensibilidad y especificidad del 87% y 96,7% respectivamente para pacientes con atrofia seronegativa (89). Sin embargo, como se ha podido observar en la comparación entre el análisis de CD8<sup>+</sup> y el linfograma intraepitelial en DSG, existen casos en los que ambas pruebas discrepan, por lo que podría tratarse tanto de falsos positivos por parte del linfograma como de falsos negativos por parte del análisis de CD8<sup>+</sup>, del mismo modo que se observó una discrepancia en un paciente con EC confirmada (EC27), que obtuvo un linfograma en DCG no compatible posiblemente debido a su avanzada edad (83 años) (99). En referencia a los casos en los que se descartó el diagnóstico de EC, los resultados de la prueba se correspondieron salvo en uno de ellos (CC13), el cual mostró normalización de la mucosa duodenal y linfograma intraepitelial no compatible con la enfermedad tras someterse a provocación de 8 semanas, el diagnóstico en este caso fue claro por lo que parece tratarse de un falso positivo de la prueba.

En la literatura se han propuesto otros métodos para el diagnóstico de individuos en DSG, como son el ELISpot de IFN- $\gamma$  y los tetrámeros HLA-DQ2-gliadina. Además de las desventajas metodológicas que suponen estas técnicas para su implementación en la práctica clínica, por su elevado coste y requerimientos técnicos previamente comentados, estas pruebas están basadas en la interacción del HLA-DQ con péptidos de gliadina. El ensayo ELISpot realiza una estimulación de las células del paciente en cultivo con péptidos de gliadina, los tetrámeros por su parte son creados mediante la unión de moléculas HLA-DQ con péptidos de gliadina. Ambas técnicas son por tanto dependientes de los péptidos de gluten que se utilicen, es decir, están restringidas al conocimiento actual de los epítomos inmunogénicos del gluten que, aunque es cada día más extenso, sigue sin poder abarcar toda la complejidad existente, estando todavía limitado principalmente a la genética HLA-DQ2.5. El análisis de CD8<sup>+</sup> se basa en la medición de una respuesta inmunológica no HLA-DQ dependiente producida en el paciente tras la administración de gluten sin precisar de la utilización de péptidos, por lo que no presenta dicha limitación, siendo apropiada, a diferencia de los métodos anteriormente nombrados, para su uso en individuos no HLA-DQ2.5/DQ8, que aunque poco frecuentes, representan alrededor del 3% de los pacientes totales con EC (100) y se encuentran en mayor proporción al considerar los casos de diagnóstico complejo. Presenta por tanto una clara ventaja al permitir la detección de la EC independientemente de la genética presentada por el individuo, identificando casos con genética de bajo riesgo o incluso genética no compatible: CC6 y CC10 (no compatible), PEC2

(HLA-DQ2.2) y PCC6 (HLA-DQ7.5). La detección de IL-2 en suero o plasma, a excepción de los últimos ensayos CRAs ultrasensibles basados en electroquimioluminiscencia, tampoco emplea péptidos de gliadina y no presenta la mencionada limitación, pero parece disminuir su sensibilidad en individuos no HLA-DQ2.5 (76).

Hay que considerar además que los ensayos ELISpot realizados en este estudio resultaron positivos sólo en 4/6 pacientes con atrofia y en ninguno de los que presentaban una lesión histológica de menor grado. En cambio, el análisis de CD8<sup>+</sup> fue capaz de detectar todos los casos seropositivos incluyendo aquellos con lesiones histológicas de bajo grado, demostrando ser una prueba con mayor sensibilidad y más apropiada para su implementación en práctica clínica teniendo en cuenta la existencia de este tipo de formas más moderadas de la enfermedad, su frecuencia en las consultas monográficas de EC y la creciente necesidad de detección de estos casos que está siendo observada en los últimos años. Ninguna de las dos pruebas detectó el único caso seronegativo analizado.

Es interesante resaltar que se podría considerar que tanto la determinación de la IL-2 en plasma como el análisis de CD8<sup>+</sup> presentan una limitación frente al ELISpot y la utilización de tetrámeros HLA-DQ-gliadina, y es que, a diferencia de estas, no detectan una respuesta específica. Sin embargo, se debe tener en cuenta que siempre se parte de una medición basal previa a la ingesta de gluten que se toma como referencia para cuantificar el incremento de esta población, asegurando que este es debido a la exposición al antígeno. Esto se consigue siempre y cuando la realización de la prueba no se superponga con el desarrollo de otra condición, tal y como se pudo observar en uno de los participantes que presentó gastroenteritis durante el transcurso de la prueba, mostrando la aparición de células CD8<sup>+</sup>CD103<sup>+</sup>β7<sup>hi</sup>CD38<sup>+</sup> en sangre periférica en una proporción mucho mayor a la habitual, lo que hizo suponer que se estaban observando dos respuestas en conjunto. Este hecho se corroboró analizando 3 pacientes no celíacos ni sometidos a provocación con gluten que presentaban una gastroenteritis. De la misma manera que se ha descrito la presencia de linfocitos T CD8<sup>+</sup> CD103<sup>+</sup> en biopsias de pacientes que presentan otras enteropatías no relacionadas con la EC (101), podría ser que este tipo de afecciones implicaran la aparición en sangre periférica de esta población de linfocitos activados con direccionamiento al intestino, conduciendo a la obtención de un falso positivo. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, al disponer de una muestra basal, esto sólo ocurriría en el caso de enfermedades que se produzcan en una ventana de tiempo tan reducida como es el período de realización de la prueba, lo que reduce este conflicto a infecciones como la gastroenteritis. Estos casos deberían por tanto ser motivo de invalidez de la prueba, que deberá ser repetida una vez

recuperado el paciente y tras volver a pasar el tiempo en DSG necesario para su correcta realización.

El linfograma intraepitelial se ha descrito como un método válido para el diagnóstico de EC en DSG (61,102). En este trabajo, se realizó una comparativa entre los resultados obtenidos mediante esta técnica y la prueba propuesta en esta tesis. La determinación del linfograma mostró alta capacidad para detectar los casos con EC seronegativa tal y como está descrito (89), mientras que el análisis de CD8<sup>+</sup> sólo detectó dos casos que presentaban atrofia. Por el contrario, en los casos seropositivos las pruebas presentaron un 66,7% de acuerdo, siendo los 2 casos en los que hubo discordancias detectados por el análisis de CD8<sup>+</sup>. En cuanto a la capacidad para descartar la enfermedad, ambas pruebas mostraron resultados concordantes. Para los participantes que no obtuvieron un diagnóstico final, ambas pruebas mostraron resultados acordes en un 85% de los casos, siendo sólo 3 los casos discordantes en los que 2 obtuvieron un resultado positivo para el análisis de CD8<sup>+</sup> y 1 para el linfograma intraepitelial. Se debe tener en cuenta que algunos de los casos analizados obtuvieron un diagnóstico final basado en el resultado del linfograma intraepitelial. A pesar del pequeño tamaño muestral de algunos grupos analizados, estos datos hacen pensar que se trata de pruebas que podrían funcionar de manera complementaria en el diagnóstico de la EC en DSG y su utilización de manera conjunta resultaría en una gran herramienta para dar respuesta a este reto diagnóstico que actualmente suponen estos pacientes. Por ejemplo, una respuesta CD8<sup>+</sup> negativa en pacientes con una serología previa negativa podría completarse con la determinación del linfograma intraepitelial, pero una respuesta CD8 positiva podría conducir a finalizar el estudio, evitando así realizar una biopsia duodenal.

Los datos aquí presentados derivan de la respuesta de los participantes a la ingesta de gluten en forma de rebanadas de pan blanco de molde. Actualmente hemos desarrollado trabajos en los que se ha sustituido por una cantidad estandarizada de 10 g de gluten en polvo, obteniendo resultados semejantes (103). Disponer de ambos abordajes permite tanto la posibilidad de estandarización de la prueba en la práctica clínica como su realización en centros en los que se disponga de recursos económicos limitados.

La toma de muestras consta de dos extracciones de sangre periférica, un procedimiento poco invasivo que los pacientes aceptan de mayor grado que la toma de biopsias duodenales, que suponen la entrada a quirófano y una sedación. Los otros métodos planteados para el diagnóstico de EC en DSG utilizan también sangre periférica como material de partida, sin embargo, es necesario tener en cuenta el volumen de sangre

requerido para el análisis. Leonard et al. destacan en su estudio realizado en 2021 que una de las desventajas de los ensayos ELISpot y tetrámeros de HLA-DQ-gliadina es que requieren en torno a 35 mL de muestra inicial, mientras que para el estudio de la población CD8<sup>+</sup> mediante citometría de masas se precisan 5 mL y para la detección de IL-2 en plasma tan poco como 500 µL (76). Para la realización de la prueba basada en la respuesta de linfocitos CD8<sup>+</sup> que aquí se plantea, se requieren únicamente 350 µL, siendo el método basado en sangre periférica propuesto hasta la fecha que menor volumen de muestra precisa. Además, de ser necesario, estas muestras pueden ser transportadas a temperatura ambiente para ser procesadas 24h después de la extracción, lo que permite el envío a centros de referencia en los que se lleven a cabo los análisis, facilitando la implementación de este método diagnóstico incluso en centros que no dispongan de un citómetro de flujo.

Otra de las ventajas de cara a facilitar su empleo en la práctica clínica es la disponibilidad y sencillez de la técnica de análisis utilizada. A diferencia de la citometría de masas utilizada por Leonard et al., la citometría de flujo se encuentra ampliamente establecida como herramienta diagnóstica en muchos hospitales y laboratorios, por lo que la implantación de esta prueba no precisaría la adquisición de equipamiento específico ni entrenamiento de personal especializado, no siendo así tampoco para el ELISpot de IFN-γ o los tetrámeros HLA-DQ-gliadina que presentan unos requerimientos técnicos, materiales y económicos a los que no todos los hospitales podrían acceder. Además, utilizan como material de partida PBMCs aisladas de los pacientes, que se congelan, cultivan y estimulan para ser posteriormente analizadas. Todo este procedimiento alarga el tiempo de obtención del resultado mientras que la prueba basada en CD8 toma como material de partida sangre periférica que se procesa y analiza en fresco, resultando un sistema sencillo y rápido que permite la obtención del resultado a las 2 horas de haberse realizado la segunda extracción de sangre. Los análisis de reproducibilidad de la prueba son evidencia de su sencillez de interpretación, mostrando un elevado acuerdo entre las mediciones realizadas por los dos operadores en todas las variables comparadas con altos valores de CCI y la elevada concordancia observada también mediante los gráficos de Acuerdo-Supervivencia y Bland-Altman.

Una limitación de la prueba es la evidenciada por el caso de un paciente con EC diagnosticada con atrofia y serología positiva, que no obtuvo respuesta tras la provocación. Al apreciar que se encontraba manteniendo una DSG estricta desde hacía 25 años, se decidió realizar una segunda provocación que resultó esta vez positiva para el análisis de CD8<sup>+</sup> pero obteniendo un porcentaje de la población de interés en el rango correspondiente a pacientes

con lesión histológica de bajo grado. Esto puede ser debido a que el elevado tiempo durante el cual el paciente se encontró sin someterse a la presencia del antígeno, la población de células de memoria disminuyó hasta alcanzar niveles por debajo del límite de detección o incluso desaparecer. Los linfocitos T de memoria tienen una esperanza de vida de 30 a 160 días a nivel individual, sin embargo, presentan una elevada tasa de replicación, lo que permite el mantenimiento de la población de memoria a largo plazo, encontrándose la media entre 8 y 15 años (104). Aunque existen casos en los que la población de memoria se mantiene de por vida, en el caso de la EC, su esperanza de vida no se conoce y valorando lo observado en este caso, podría ser que 25 años la excedieran. La adherencia estricta a la DSG podría influir en la disminución de esta población al impedir la generación de nuevas poblaciones de memoria que sí podrían estar formándose en individuos que cometan pequeñas transgresiones, como se pudo ver tras la segunda exposición al gluten de este paciente, en la que reapareció la población de interés de linfocitos T de memoria, que se habría vuelto a expandir. Teniendo esto en cuenta, conviene considerar que la obtención de un resultado negativo en pacientes en DSG estricta mantenida durante muchos años no se debe considerar válida y sería necesario plantear una segunda provocación para la correcta valoración de esta prueba. Esta limitación fue también apuntada tras el análisis realizado por Sarna et al., en el cual destacaron la ausencia de la población detectada por tetrámeros HLA-DQ-gluten tras una provocación corta con gluten en un paciente que se encontraba manteniendo una DSG durante aproximadamente 40 años (105). Relacionado con este aspecto, cabría esperar que existiera una correlación entre el tiempo en DSG y la magnitud de la respuesta, pero en este estudio no se ha encontrado, sin embargo, se debe tener en cuenta que, aunque los pacientes afirmen llevar una dieta estricta, resulta muy difícil controlar las transgresiones que se han podido realizar a lo largo de años, por lo que los tiempos registrados podían no ser del todo certeros. Para estudiar esta relación, sería por tanto necesario el planteamiento de un estudio diseñado específicamente para cubrir esta posibilidad.

Aunque la mayoría de los análisis se llevaron a cabo en adultos, se desarrolló un pequeño estudio piloto en pacientes en edad pediátrica. Se observó de nuevo la presencia de la población de interés al sexto día de la provocación con gluten exclusivamente en niños con EC. Las comparaciones realizadas con las respuestas obtenidas por los pacientes en edad adulta no resultaron significativamente diferentes, lo cual hace pensar que su comportamiento ante la provocación corta es similar y que la prueba es aplicable también a

la población infantil, aunque el tamaño muestral incluido en este estudio es muy reducido y es necesaria su ampliación con el objetivo de valorar su funcionamiento con certeza.

Este trabajo no sólo pone a punto un nuevo método para el diagnóstico de la EC, sino que evidencia la participación de la memoria inmunológica en el desarrollo de esta enfermedad. Es por ello que se planteó el estudio de CD62L en la población de interés con el fin de valorar su inclusión en el análisis de citometría de esta prueba. Se pudo observar que, en pacientes con EC, la gran mayoría de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> β7<sup>hi</sup> CD38<sup>+</sup> eran además CD62L<sup>-</sup>. Los datos de este estudio indican que no aportaría información de relevancia para la prueba diagnóstica en sí, aunque podría ser de utilidad a la hora de discriminar pacientes de diagnóstico complejo que presentaran reacciones moderadas a la provocación con gluten, con valores muy cercanos al punto de corte. Incluir el marcador CD62L en una segunda tinción podría asegurar que las células seleccionadas en el análisis fueran realmente efectoras y que no se realiza una sobreestimación de la población de interés.

Tanto la población CD8 movilizada tras una provocación corta como las subpoblaciones de LIEs se expanden y contraen en función de la ingesta de gluten, por lo que parecen estar relacionadas con la memoria inmunológica. De cara al futuro, sería interesante dilucidar qué origen y misión tienen realmente en la reacción ocasionada por el gluten en pacientes con EC y si diferencias en las condiciones de exposición o el tamaño de la población de células de memoria generada pueden desencadenar versiones de la enfermedad con sintomatología más o menos severa.

El estudio de la memoria inmunológica es un campo sumamente complejo, actualmente en expansión y que plantea por el momento numerosas incógnitas por resolver. Recientes investigaciones se centran en la identificación y análisis de la funcionalidad de distintos grupos de células de memoria T intestinal que parecen tener diversos roles en la mucosa del paciente con EC. El estudio del papel de estas poblaciones y el hallazgo de nuevos marcadores para su distinción podría permitir su utilización en un futuro como indicador pronóstico de fenotipo clínico y/o de evolución del estadio de la enteropatía celíaca.

Tras analizar los resultados obtenidos en este estudio y valorar las capacidades y utilidades de este nuevo método diagnóstico, se propone su incorporación en la práctica clínica mediante el planteamiento del siguiente algoritmo diagnóstico (Figura 33).

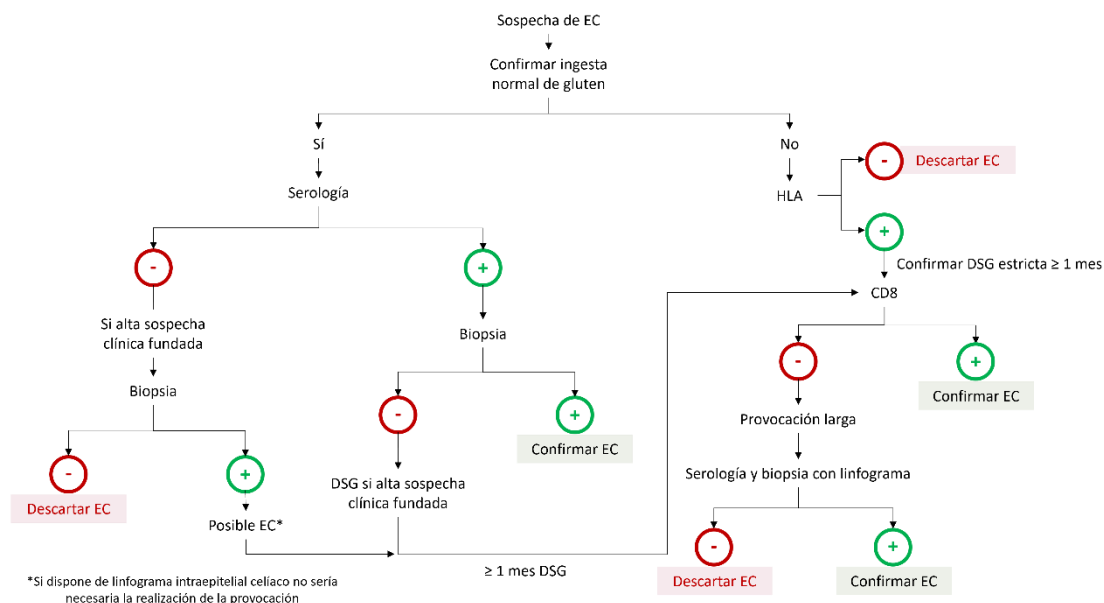


Figura 33. Algoritmo diagnóstico que incluye la realización del análisis de CD8<sup>+</sup> tras provocación corta con gluten. EC = enfermedad celíaca; DSG = dieta sin gluten.

En este algoritmo se propone la inclusión de esta prueba como paso previo a la realización de una provocación larga de 8 semanas, permitiendo así el diagnóstico de algunos de los pacientes que no aceptan someterse a la misma y evitando exponer al individuo a los riesgos que esta puede ocasionar como son la recaída clínica, el desarrollo de atrofia y la entrada a quirófano para la toma de biopsias. La implementación de esta prueba supondría el diagnóstico de gran cantidad de pacientes que, como muestran los datos obtenidos en este estudio, se pierden en este paso del algoritmo quedando finalmente sin un diagnóstico concluyente, en algunos tratándose de individuos sanos que terminan manteniendo un tratamiento autoadministrado de por vida con el perjuicio económico y para la calidad de vida del individuo que esta supone y en otros, siendo casos de EC no detectada y que continúan exponiéndose al gluten y a las graves consecuencias que esto conlleva para su salud.

The background features a light blue laurel wreath on the left side, partially enclosed by a large, thin, light blue circular arc that spans across the page. A horizontal grey band is positioned across the middle of the page, containing the text.

# CONCLUSIONES

1. La exposición a 10 g de gluten diarios durante tres días (provocación corta) induce la aparición o incremento en sangre periférica de una población de linfocitos T activados y con direccionamiento a intestino ( $CD8^+CD103^+\beta7^{hi}CD38^+$ ) en pacientes en dieta sin gluten que presentan enfermedad celíaca. La detección y análisis de esta población mediante citometría de flujo permite el diagnóstico de una manera sencilla, rápida y poco invasiva.
2. El método descrito muestra un valor de sensibilidad de 96,8% y de especificidad de 94,7% para el diagnóstico de enfermedad celíaca seropositiva. Además, presenta un VPP = 90,9 y un VPN = 98,2, reflejando su utilidad en la clínica.
3. Se trata de un método diagnóstico altamente reproducible, con un valor de CCI de 0,992.
4. La prueba propuesta muestra un comportamiento bastante similar al linfograma intraepitelial, exceptuando los casos de EC seronegativa, en los que el linfograma intraepitelial parece ofrecer mejores resultados y ambas pruebas pueden emplearse de manera complementaria.
5. La provocación corta con análisis en sangre periférica de los linfocitos CD8 con fenotipo de re-direccionamiento intestinal permite plantear un nuevo algoritmo diagnóstico que ofrece una alternativa a la realización de una provocación larga seguida por serología y biopsia, procedimiento rechazado por un elevado número de pacientes.

The background features a light blue laurel wreath on the left side, partially enclosed by a large, thin, light blue circular arc that curves around it. A horizontal grey bar is positioned across the middle of the page, containing the text.

# BIBLIOGRAFÍA

1. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó IR, Mearin ML, Phillips A, Shamir R, et al. European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. Vol. 54, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2012. p. 136–60.
2. Raiteri A, Granito A, Giamperoli A, Catenaro T, Negrini G, Tovoli F. Current guidelines for the management of celiac disease: A systematic review with comparative analysis. *World J Gastroenterol* [Internet]. 2022;28(1):154–75. Available from: <https://www.wjgnet.com/bpg/gerinfo/240>
3. Grupo de trabajo del Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. 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); 2018.
4. Lionetti E, Catassi C. New clues in celiac disease epidemiology, pathogenesis, clinical manifestations, and treatment. *Int Rev Immunol*. 2011 Aug;30(4):219–31.
5. Lohi S, Mustalahti K, Kaukinen K, Laurila K, Collin P, Rissanen H, et al. Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Nov;26(9):1217–25.
6. Al-Toma A, Volta U, Auricchio R, Castillejo G, Sanders DS, Cellier C, et al. European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. Vol. 7, *United European Gastroenterology Journal*. SAGE Publications Ltd; 2019. p. 583–613.
7. Mariné M, Farre C, Alsina M, Vilar P, Cortijo M, Salas A, et al. The prevalence of coeliac disease is significantly higher in children compared with adults. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011 Feb;33(4):477–86.
8. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, et al. Prevalence of Celiac Disease in At-Risk and Not-At-Risk Groups in the United States A Large Multicenter Study. *Arch Intern Med* [Internet]. 2003;163:286–92. Available from: <https://jamanetwork.com/>
9. Rubio-Tapia A, Kyle RA, Kaplan EL, Johnson DR, Page W, Erdtmann F, et al. Increased Prevalence and Mortality in Undiagnosed Celiac Disease. *Gastroenterology*. 2009;137(1):88–93.
10. Lebowitz B, Tennyson CA, Holub JL, Lieberman DA, Neugut AI, Green PHR. Gender and racial disparities in duodenal biopsy to evaluate for celiac disease. *Gastrointest Endosc*. 2012 Oct;76(4):779–85.
11. Katz KD, Rashtak S, Lahr BD, Melton LJ, Krause PK, Maggi K, et al. Screening for celiac disease in a North American population: Sequential serology and gastrointestinal symptoms. *American Journal of Gastroenterology*. 2011 Jul;106(7):1333–9.
12. King JA, Jeong J, Underwood FE, Quan J, Panaccione N, Windsor JW, et al. Incidence of Celiac Disease Is Increasing over Time: A Systematic Review and Meta-analysis. Vol. 115, *American Journal of Gastroenterology*. Wolters Kluwer Health; 2020. p. 507–25.
13. Polanco I. Enfermedad celíaca : presente y futuro. Ergon; 2013.

14. Lebwohl B, Rubio-Tapia A. Epidemiology, Presentation, and Diagnosis of Celiac Disease. Vol. 160, *Gastroenterology*. W.B. Saunders; 2021. p. 63–75.
15. Ludvigsson JF, Bai JC, Biagi F, Card TR, Ciacci C, Ciclitira PJ, et al. Diagnosis and management of adult coeliac disease: Guidelines from the British society of gastroenterology. *Gut*. 2014;63(8):1210–28.
16. Sollid LM, Lie BA. *Celiac Disease Genetics: Current Concepts and Practical Applications*. 2005;
17. Espino L, Núñez C. The HLA complex and coeliac disease. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc.; 2021. p. 47–83.
18. García-Santisteban I, Romero-Garmendia I, Cilleros-Portet A, Bilbao JR, Fernandez-Jimenez N. Celiac disease susceptibility: The genome and beyond. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Elsevier Inc.; 2021. p. 1–45.
19. Kumar V, Wijmenga C, Withoff S. From genome-wide association studies to disease mechanisms: Celiac disease as a model for autoimmune diseases. Vol. 34, *Seminars in Immunopathology*. 2012. p. 567–80.
20. Sollid LM, Qiao SW, Anderson RP, Gianfrani C, Koning F. Nomenclature and listing of celiac disease relevant gluten T-cell epitopes restricted by HLA-DQ molecules. *Immunogenetics*. 2012 Jun;64(6):455–60.
21. Shi T, Feng Y, Liu W, Liu H, Li T, Wang M, et al. Characteristics of gut microbiota and fecal metabolomes in patients with celiac disease in Northwest China. *Front Microbiol*. 2022 Nov 28;13.
22. Nistal E, Caminero A, Herrán AR, Arias L, Vivas S, Ruiz De Morales JM, et al. Differences of small intestinal bacteria populations in adults and children with/without celiac disease: Effect of age, gluten diet, and disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2012 Apr;18(4):649–56.
23. Caminero A, Galipeau HJ, McCarville JL, Johnston CW, Bernier SP, Russell AK, et al. Duodenal Bacteria From Patients With Celiac Disease and Healthy Subjects Distinctly Affect Gluten Breakdown and Immunogenicity. *Gastroenterology*. 2016 Oct 1;151(4):670–83.
24. Verdú E, Caminero A. How infection can incite sensitivity to food. *Science (1979)*. 2017 Apr 7;356(6333):29–30.
25. Cohen R, Mahlab-Guri K, Atali M, Elbirt D. Viruses and celiac disease: what do we know? *Clinical and Experimental Medicine*. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2023.
26. Bouziat R, Hinterleitner R, Brown JJ, Stencel-Baerenwald JE, Ikizler M, Mayassi T, et al. Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science (1979)* [Internet]. 2017;356:44–50. Available from: <http://science.sciencemag.org/>
27. Oikarinen M, Puustinen L, Lehtonen J, Hakola L, Simell S, Toppari J, et al. Enterovirus Infections Are Associated With the Development of Celiac Disease in a Birth Cohort Study. *Front Immunol*. 2021 Feb 2;11.

28. Villanueva SSM, Perdomo VG, García F. Función de la barrera intestinal. Implicancia en la enfermedad celíaca. Gut barrier function. Implication in celiac disease. Rev Fac Cs Méd UNR. 2020;1:9–22.
29. Catassi C, Verdu EF, Bai JC, Lionetti E. Coeliac disease. Vol. 399, The Lancet. Elsevier B.V.; 2022. p. 2413–26.
30. Sollid LM, Tye-Din JA, Qiao SW, Anderson RP, Gianfrani C, Koning F. Update 2020: nomenclature and listing of celiac disease–relevant gluten epitopes recognized by CD4+ T cells. Vol. 72, Immunogenetics. Springer; 2020. p. 85–8.
31. Sollid L, Molberg O, McAdam S, Lundin K. Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase-guilt by association? Gut. 1997;41:851–2.
32. Iversen R, Sollid LM. Autoimmunity provoked by foreign antigens: In celiac disease, exogenous gluten drives T cell-B cell interactions that cause autoimmunity. Vol. 368, Science. American Association for the Advancement of Science; 2020. p. 132–3.
33. du Pré MF, Blazeovski J, Dewan AE, Stamnaes J, Kanduri C, Sandve GK, et al. B cell tolerance and antibody production to the celiac disease autoantigen transglutaminase 2. Journal of Experimental Medicine. 2020 Feb 3;217(2).
34. Abadie V, Kim SM, Lejeune T, Palanski BA, Ernest JD, Tastet O, et al. IL-15, gluten and HLA-DQ8 drive tissue destruction in coeliac disease. Nature. 2020 Feb 27;578(7796):600–4.
35. García-Hoz C, Roy G. Citometría de flujo en el diagnóstico de la enfermedad celíaca: linfograma intestinal. Gastroenterol Hepatol [Internet]. 2016;39:25–6. Available from: [www.elsevier.es/gastroenterologia](http://www.elsevier.es/gastroenterologia)
36. Lefrançois L. Development, trafficking, and function of memory T-cell subsets. Immunol Rev. 2006;211:93–103.
37. Rich RR. Clinical immunology : principles and practice. Mosby/Elsevier; 2008. 275 p.
38. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T Lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature [Internet]. 1999;401:708–12. Available from: [www.nature.com](http://www.nature.com)
39. Yang S, Liu F, Wang QJ, Rosenberg SA, Morgan RA. The shedding of CD62L (L-selectin) regulates the acquisition of lytic activity in human tumor reactive T lymphocytes. PLoS One. 2011;6(7).
40. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Inmunología celular y molecular. Elsevier Saunders; 2010. 319 p.
41. Owen JA, Punt J, Stranford SA. Kuby Inmunología. McGraw-Hill Education; 2013. 474 p.
42. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabó I, Kurppa K, Mearin ML, Ribes-Koninckx C, et al. European Society Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Guidelines for Diagnosing Coeliac Disease 2020. Vol. 70, Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. Lippincott Williams and Wilkins; 2020. p. 141–56.

43. Rubio-Tapia A, Hill ID, Semrad C, Kelly CP, Lebowitz B. American College of Gastroenterology Guidelines Update: Diagnosis and Management of Celiac Disease. *American Journal of Gastroenterology*. 2023 Jan 1;118(1):59–76.
44. Bai J, Ciacci C, Corazza GR, Fried M, Olanco C, Rostami-Nejad M, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. Celiac disease. Chris Mulder. 2016.
45. Barak M, Rozenberg O, Fromm P, Grinberg M, Reginashvili D, Henig C, et al. Challenging our serological algorithm for celiac disease (CD) diagnosis by the ESPGHAN guidelines. Vol. 51, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*. 2013.
46. Lewis NR, Scott BB. Systematic review: The use of serology to exclude or diagnose coeliac disease (a comparison of the endomysial and tissue transglutaminase antibody tests). Vol. 24, *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2006. p. 47–54.
47. Tonutti E, Visentini D, Picierno A, Bizzaro N, Villalta D, Tozzoli R, et al. Diagnostic efficacy of the ELISA test for the detection of deamidated anti-gliadin peptide antibodies in the diagnosis and monitoring of celiac disease. *J Clin Lab Anal*. 2009;23(3):165–71.
48. Naiyer AJ, Hernandez L, Ciaccio EJ, Papadakis K, Manavalan JS, Bhagat G, et al. Comparison of Commercially Available Serologic Kits for the Detection of Celiac Disease [Internet]. 2009. Available from: <http://journals.lww.com/jcge>
49. Volta U, Granito A, Parisi C, Fabbri A, Fiorini E, Piscaglia M, et al. Deamidated Gliadin Peptide Antibodies as a Routine Test for Celiac Disease A Prospective Analysis [Internet]. 2010. Available from: [www.jcge.com](http://www.jcge.com)
50. Hoerter NA, Shannahan SE, Suarez J, Lewis SK, Green PHR, Leffler DA, et al. Diagnostic Yield of Isolated Deamidated Gliadin Peptide Antibody Elevation for Celiac Disease. *Dig Dis Sci*. 2017 May 1;62(5):1272–6.
51. Schieppatti A, Rej A, Maimaris S, Cross SS, Porta P, Aziz I, et al. Clinical classification and long-term outcomes of seronegative coeliac disease: a 20-year multicentre follow-up study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2021 Nov 1;54(10):1278–89.
52. Marsh MN. Gluten, Major and the Histocompatibility Smal1 Intestine Complex, A Molecular and Immunobiologic Approach to Spectrum of Gluten Sensitivity ('Celiac Sprue') the. Vol. 102, *GASTROENTEROLOGY*. 1992.
53. Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of coeliac disease. time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999;11(10):1185–94.
54. Jabri B, Sollid LM. Mechanisms of disease: Immunopathogenesis of celiac disease. Vol. 3, *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology*. 2006. p. 516–25.
55. Brown NK, Guandalini S, Semrad C, Kupfer SS. A clinician's guide to celiac disease HLA genetics. Vol. 114, *American Journal of Gastroenterology*. Wolters Kluwer Health; 2019. p. 1587–92.
56. Núñez C, Rubio M. Advances in Celiac Disease: Improving Paediatric and Adult Care: Value and Use of Genetic Test of Celiac Disease. *Advances in Celiac Disease: Improving Paediatric and Adult Care*. Springer International Publishing; 2022. 99–119 p.

57. Ferguson A, Murray D. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. Vol. 12, *Gut*. 1971.
58. Fernández-Bañares F, Carrasco A, Martín A, Esteve M. Systematic review and meta-analysis: Accuracy of both gamma delta+ intraepithelial lymphocytes and coeliac lymphogram evaluated by flow cytometry for coeliac disease diagnosis. Vol. 11, *Nutrients*. MDPI AG; 2019.
59. Camarero C, De Andrés A, García-Hoz C, Roldán B, Muriel A, León F, et al. Assessment of Duodenal Intraepithelial Lymphocyte Composition (Lymphogram) for Accurate and Prompt Diagnosis of Celiac Disease in Pediatric Patients. *Clin Transl Gastroenterol*. 2021 Nov 10;12(11):e00426.
60. Roy G, Fernández-Bañares F, Corzo M, Gómez-Aguililla S, García-Hoz C, Núñez C. Intestinal and blood lymphograms as new diagnostic tests for celiac disease. Vol. 13, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2023.
61. Camarero C, Eiras P, Asensio A, Leon F, Olivares F, Escobar H, et al. Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease: permanent changes in CD3<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup> and T cell receptor  $\alpha$  subsets studied by flow cytometry. 2000.
62. Lähdeaho ML, Mäki M, Laurila K, Huhtala H, Kaukinen K. Small-bowel mucosal changes and antibody responses after low- and moderate-dose gluten challenge in celiac disease. *BMC Gastroenterol*. 2011 Nov 24;11.
63. Leffler D, Schuppan D, Pallav K, Najarian R, Goldsmith JD, Hansen J, et al. Kinetics of the histological, serological and symptomatic responses to gluten challenge in adults with coeliac disease. *Gut*. 2013 Jul;62(7):996–1004.
64. Ciccocioppo R, Kruzliak P, Cangemi GC, Pohanka M, Betti E, Lauret E, et al. The spectrum of differences between childhood and adulthood celiac disease. Vol. 7, *Nutrients*. MDPI AG; 2015. p. 8733–51.
65. Anderson RP, Degano P, Godkin AJ, Jewell DP, Hill AVS. In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T cell epitope. *Nat Med*. 2000;6(3):337–42.
66. Anderson RP, Van Heel DA, Tye-Din JA, Barnardo M, Salio M, Jewell DP, et al. T cells in peripheral blood after gluten challenge in coeliac disease. *Gut*. 2005 Sep;54(9):1217–23.
67. Quarsten H, McAdam SN, Jensen T, Arentz-Hansen H, Molberg Ø, Lundin KEA, et al. Staining of Celiac Disease-Relevant T Cells by Peptide-DQ2 Multimers. *The Journal of Immunology*. 2001 Nov 1;167(9):4861–8.
68. Altman JD, H Moss PA, R Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, McMichael AJ, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* (1979). 1996;274:94–6.
69. Nepom GT, Buckner JH, Novak EJ, Reichstetter S, Reijonen H, Gebe J, et al. HLA Class II Tetramers Tools for Direct Analysis of Antigen-Specific CD4 T Cells. *Arthritis Rheum* [Internet]. 2002;46(1):5–12. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions>

70. Sarna VK, Lundin KEA, Mørkrid L, Qiao SW, Sollid LM, Christophersen A. HLA-DQ–Gluten Tetramer Blood Test Accurately Identifies Patients With and Without Celiac Disease in Absence of Gluten Consumption. *Gastroenterology*. 2018 Mar 1;154(4):886-896.e6.
71. Han A, Newell EW, Glanville J, Fernandez-Becker N, Khosla C, Chien YH, et al. Dietary gluten triggers concomitant activation of CD4+ and CD8+  $\alpha\beta$  T cells and  $\gamma\lambda$  T cells in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Aug 6;110(32):13073–8.
72. Kornberg A, Botella T, Moon CS, Rao S, Gelbs J, Cheng L, et al. Gluten induces rapid reprogramming of natural memory  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  intraepithelial T cells to induce cytotoxicity in celiac disease. *Sci Immunol*. 2023 Jul 1;8(85).
73. Shami-Shah A, Norman M, Walt DR. Ultrasensitive Protein Detection Technologies for Extracellular Vesicle Measurements. *Mol Cell Proteomics*. 2023 Jun 1;22(6):100557.
74. Goel G, Tye-Din JA, Qiao SW, Russell AK, Mayassi T, Ciszewski C, et al. Cytokine release and gastrointestinal symptoms after gluten challenge in celiac disease. Vol. 5, *Sci. Adv*. 2019.
75. Goel G, Daveson AJM, Hooi CE, Tye-Din JA, Wang S, Szymczak E, et al. Serum cytokines elevated during gluten-mediated cytokine release in coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. 2020 Jan 1;199(1):68–78.
76. Leonard MM, Silvester JA, Leffler D, Fasano A, Kelly CP, Lewis SK, et al. Evaluating Responses to Gluten Challenge: A Randomized, Double-Blind, 2-Dose Gluten Challenge Trial. *Gastroenterology*. 2021 Feb 1;160(3):720-733.e8.
77. Tye-Din JA, Daveson AJM, Ee HC, Goel G, MacDougall J, Acaster S, et al. Elevated serum interleukin-2 after gluten correlates with symptoms and is a potential diagnostic biomarker for coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2019 Oct 1;50(8):901–10.
78. Anderson RP, Goel G, Hardy MY, Russell AK, Wang S, Szymczak E, et al. Whole blood interleukin-2 release test to detect and characterize rare circulating gluten-specific T cell responses in coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. 2021 Jun 1;204(3):321–34.
79. Hardy MY, Goel G, Russell AK, Chen Yi Mei SLG, Brown GJE, Wang S, et al. A Sensitive Whole Blood Assay Detects Antigen-Stimulated Cytokine Release From CD4+ T Cells and Facilitates Immunomonitoring in a Phase 2 Clinical Trial of Nexvax2 in Coeliac Disease. *Front Immunol*. 2021 May 19;12.
80. Aebischer D, Bartusik D, Tabarkiewicz J. Laser flow cytometry as a tool for the advancement of clinical medicine. Vol. 85, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS; 2017. p. 434–43.
81. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Abrignani S, Addo R, Akdis M, et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (third edition). *Eur J Immunol*. 2021 Dec 1;51(12):2708–3145.
82. Creative Diagnostics. Flow Cytometry Guide [Internet]. [cited 2024 Jan 30]. Available from: <https://www.creative-diagnostics.com/flow-cytometry-guide.htm>

83. Gómez-Aguililla S, Núñez C, Rubio M, Corzo M. Chapter 11. Isolation and cryopreservation of peripheral blood mononuclear cells. In: *Methods in Cell Biology Celiac Disease*. 2023. p. 128–41.
84. Luiz RR, Costa AJL, Kale PL, Werneck GL. Assessment of agreement of a quantitative variable: A new graphical approach. *J Clin Epidemiol*. 2003 Oct 1;56(10):963–7.
85. Núñez C, Gómez-Aguililla S, Corzo M, Fernández-Bañares F, Bodas A, Farrais S, et al. Chapter 10. Assessment of activated gut-homing CD8+ T cells in blood by flow cytometry during a 3-day gluten challenge. In: *Methods in Cell Biology Celiac Disease*. 2023. p. 113–26.
86. West J, Logan FA, Hill PG, Lloyd A, Lewis S, Hubbard R, et al. Seroprevalence, correlates, and characteristics of undetected coeliac disease in England. *Gut* [Internet]. 2003;52:960–5. Available from: [www.gutjnl.com](http://www.gutjnl.com)
87. Catassi C, Kryszak D, Louis-Jacques O, Duerksen DR, Hill I, Crowe SE, et al. Detection of celiac disease in primary care: A multicenter case-finding study in North America. *American Journal of Gastroenterology*. 2007 Jul;102(7):1454–60.
88. Fernández-Bañares F, Carrasco A, García-Puig R, Rosinach M, González C, Alsina M, et al. Intestinal intraepithelial lymphocyte cytometric pattern is more accurate than subepithelial deposits of anti-tissue transglutaminase IgA for the diagnosis of celiac disease in lymphocytic enteritis. *PLoS One*. 2014 Jul 10;9(7).
89. Fernández-Bañares F, Crespo L, Núñez C, López-Palacios N, Tristán E, Vivas S, et al. Gamma delta+ intraepithelial lymphocytes and coeliac lymphogram in a diagnostic approach to coeliac disease in patients with seronegative villous atrophy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2020 Apr 1;51(7):699–705.
90. Ruiz-Ramírez P, Carreras G, Fajardo I, Tristán E, Carrasco A, Salvador I, et al. Intraepithelial lymphocyte cytometric pattern is a useful diagnostic tool for coeliac disease diagnosis irrespective of degree of mucosal damage and age—a validation cohort. *Nutrients*. 2021 May 1;13(5).
91. Bruins MJ. The clinical response to gluten challenge: A review of the literature. *Nutrients*. 2013 Nov 19;5(11):4614–41.
92. Roederer M. How many events is enough? Are you positive? Vol. 73, *Cytometry Part A*. 2008. p. 384–5.
93. Silva Fuente-Alba C, Molina Villagra M. Likelihood ratio (razón de verosimilitud): definición y aplicación en Radiología. *Revista Argentina de Radiología*. 2017 Jul 1;81(3):204–8.
94. Dahlbom I, Korponay-Szabó IR, Kovács JB, Szalai Z, Mäki M, Hansson T. Prediction of clinical and mucosal severity of coeliac disease and dermatitis herpetiformis by quantification of IgA/IgG serum antibodies to tissue transglutaminase. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Feb;50(2):140–6.
95. Hill PG, Holmes GKT. Coeliac disease: A biopsy is not always necessary for diagnosis. *Aliment Pharmacol Ther*. 2008 Apr;27(7):572–7.

96. Vivas S, Ruiz De Morales JG, Riestra S, Arias L, Fuentes D, Alvarez N, et al. Duodenal biopsy may be avoided when high transglutaminase antibody titers are present. *World J Gastroenterol*. 2009;15(38):4775–80.
97. Bodd M, Ráki M, Bergseng E, Jahnsen J, Lundin KEA, Sollid LM. Direct cloning and tetramer staining to measure the frequency of intestinal gluten-reactive T cells in celiac disease. *Eur J Immunol*. 2013 Oct;43(10):2605–12.
98. Habibzadeh F, Habibzadeh P, Yadollahie M. On determining the most appropriate test cut-off value: The case of tests with continuous results. *Biochem Med (Zagreb)*. 2016 Oct 1;26(3):297–307.
99. Fernández-Bañares F, Farrais S, Planella M, Melero J, López-Palacios N, Vivas S, et al. Coeliac disease in elderly patients: Value of coeliac lymphogram for diagnosis. *Nutrients*. 2021 Sep 1;13(9).
100. Fernández-Bañares F, Arau B, Dieli-Crimi R, Rosinach M, Nuñez C, Esteve M. Systematic Review and Meta-analysis Show 3% of Patients With Celiac Disease in Spain to be Negative for HLA-DQ2.5 and HLA-DQ8. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2017 Apr 1;15(4):594–6.
101. Hartl C, Finke J, Hasselblatt P, Kreisel W, Schmitt-Graeff A. Diagnostic and therapeutic challenge of unclassifiable enteropathies with increased intraepithelial CD103+ CD8+ T lymphocytes: a single center case series. *Scand J Gastroenterol*. 2021;56(8):889–98.
102. Nijeboer P, Van Gils T, Reijm M, Ooijevaar R, Lissenberg-Witte BI, Bontkes HJ, et al. Gamma-delta T lymphocytes in the diagnostic approach of coeliac disease. *J Clin Gastroenterol*. 2018 May 1;00(00).
103. Corzo M, Gómez-Aguililla S, Farrais S, Fernández-Bañares F, López-Palacios N, Senosiain C, et al. Estandarización de la determinación de linfocitos CD8+ activados en sangre periférica para el diagnóstico de individuos en dieta sin gluten en práctica clínica. *Gastroenterol Hepatol [Internet]*. 2022;45(Especial Congreso 3):30–1. Available from: [www.elsevier.es/gastroenterología](http://www.elsevier.es/gastroenterología)
104. Macallan DC, Borghans JAM, Asquith B. Human T cell memory: A dynamic view. Vol. 5, *Vaccines*. MDPI AG; 2017.
105. Sarna VK, Skodje GI, Reims HM, Risnes LF, Dahal-Koirala S, Sollid LM, et al. HLA-DQ:gluten tetramer test in blood gives better detection of coeliac patients than biopsy after 14-day gluten challenge. *Gut*. 2018 Sep 1;67(9):1606–13.