

**Cuantificación de células productoras de IFN- γ en linfocitos T reactivos al gluten de sangre periférica.
Posible utilidad en pacientes con sospecha de patologías asociadas al consumo de gluten.**

Víctor Rodríguez García



Tutor

Dr. D. Eduardo Arranz Sanz

1. Introducción

1.1 Antecedentes

La enfermedad celiaca (*EC*) es una enteropatía con base inmunológica, producida por una intolerancia permanente al gluten de los cereales y desarrollada en individuos genéticamente predispuestos. Es la enfermedad inflamatoria intestinal más frecuente, afectando al 0,5-1% de la población mundial [1]. A día de hoy, la *EC* se certifica en un individuo en base a la detección serológica de transglutaminasa tisular (*TGt*), el genotipado del *HLA* del individuo, donde los alelos que conforman el heterodímero *DQ8* y especialmente *DQ2* son un factor de alto riesgo; pero el método diagnóstico por excelencia y clave para determinar el diagnóstico final es la biopsia intestinal de duodeno o yeyuno proximal. La determinación histopatológica de la biopsia en base a la *escala modificada de Marsh* es, actualmente, el punto más importante del diagnóstico. En estos últimos años han aparecido técnicas más vanguardistas en la revisión histopatológica de las biopsias, con técnicas como la citometría de flujo en búsqueda de cambios en las proporciones relativas de las poblaciones de linfocitos intraepiteliales (*LIE*), como es el aumento de estos *LIEs* y su caracterización molecular *CD3+*, *TCR- $\gamma\delta$* e *iNK-like*; o el análisis por qPCR del ARNm de las citocinas claves en el proceso inflamatorio y autoinmune de la *EC*, como son el *INF- γ* y la *IL-15*. Sin embargo, la biopsia intestinal, aunque sigue siendo una intervención de bajo riesgo, es muy invasiva, además de ser altamente molesta, especialmente si se realiza sin sedación, potencialmente peligrosa en personas hipertensas y/o hipoglúcidas; y mucho más, si hablamos de niños pequeños.

En el proceso inflamatorio de la *EC* reina una citocina como la dominante, esta es el **interferón gamma (*INF- γ*)**. En 1995 *Nilsen et al* [2] determinaron que los clones de linfocitos T *CD4+* reactivos frente al gluten observados en lesiones intestinales de personas celiacas eran mayoritariamente restrictivos para un *HLA DQ2+* ó *DQ8+*. Se determinó también que todos estos clones linfocitarios T específicos del gluten (*LTEGs*) secretaban *IFN- γ* , generalmente a altas concentraciones (>2.000 U/mL). Todos estos clones con restricción *HLA-DQ2+* o *HLA-DQ8+* secretan *IFN- γ* además de otras citocinas, ya sean de la vertiente *Th1*, como el *IL-2* y el propio *IFN- γ* ; o, en menor medida, citocinas del tipo *Th0*, como *IL-4*, *IL-5*, *IL-6*, *IL-10*, *TNF- α* Y *TGF- β* [2]. Además, estos linfocitos secretadores de *IFN- γ* pueden encontrarse tanto de forma intraepitelial, como en la *lamina propia* [3], y también, en sangre periférica [4-6]; lo que aumenta el área de acción del *IFN- γ* .

Ante las proteínas ricas del gluten, denominadas prolaminas, como son la gliadina del trigo, las hordeínas de la cebada o las secalinas del centeno, se produce en los celíacos una respuesta tanto de la inmunidad innata primero como adaptativa después que genera un daño tisular caracterizado por un aumento de los linfocitos en el epitelio (LIEs) y en la lamina propia, una atrofia de las vellosidades intestinales, apoptosis de enterocitos y una hiperplasia de las criptas con la consiguiente remodelación de la mucosa intestinal [9]; además de una gran variedad de síntomas extraintestinales, como anemias, osteoporosis, cefaleas, etc. El IFN- γ es la molécula que inicia un feed-back positivo de respuesta adaptativa en la mucosa intestinal, que es la que va a generar la mayor parte de los daños intra- y extraintestinales. Previamente a la intervención del IFN- γ , se produce un primer feed-back positivo de respuesta innata por parte de la citocina IL-15 (**Imagen 1**).

El proceso comienza con la respuesta inmune innata de las células epiteliales intestinales o *enterocitos* frente a los denominados *péptidos tóxicos del gluten*. Estos péptidos tóxicos provienen de una mala digestión de las moléculas del gluten en la luz del intestino de personas celíacas, concretamente, en las microvellosidades de los enterocitos [1,9]. Probablemente se producen también péptidos tóxicos por parte de la microbiota, aunque este hecho no ha sido aún demostrado, sin embargo, si se ha demostrado que existen bacterias específicas de celíacos que degradan la gliadina por medio de gliadinasas [24], y también se ha observado un incremento de bacterias Gram-negativas y una reducción de bifidobacterias, que retornan a niveles normales tras la dieta sin gluten [9]. Los enterocitos liberarán IL-15, molécula que desencadenará una activación de la sintasa inducible de óxido nítrico (*iNOS*) y del factor pro inflamatorio NF- κ B que debilitarán la pared epitelial del intestino destruyendo las uniones tight-junctions entre los enterocitos, al mismo tiempo, la IL-15 induce leves procesos de apoptosis en los enterocitos [1]. Estos efectos de la IL-15 permiten la entrada con mayor facilidad de moléculas de gluten a la lamina propia, donde serán reducidas a *péptidos deaminados inmunogénicos del gluten* por la transglutaminasa tisular (TGt), provocando la secreción de más IL-15.

Por otro lado, esos péptidos deaminados inmunogénicos del gluten van a ser captados por las células dendríticas, presentes en las *Placas de Peyer* y estimuladas también por la IL-15; y presentados en el contexto de moléculas HLA-DQ2+, HLA-DQ8+ u otro HLA que contenga, al menos, un alelo del heterodímero DQ2 o DQ8. Los **linfocitos T CD4+ que sean específicos de gluten (LTEGs)** reconocerán los péptidos deaminados, presentados por las células dendríticas, y se activarán, sufriendo la típica expansión clonal y, mayoritariamente, se diferenciarán a la vía de respuesta adaptativa Th1, en la que predomina el IFN- γ . Este IFN- γ va a aumentar la capacidad de captación de gluten por parte de las microvellosidades de los enterocitos [7] [8], lo que va a aumentar tanto la respuesta innata de los enterocitos, como la transcitosis, por la que aumentarían los niveles de gluten en la lamina propia, aumentando así la concentración de péptidos deaminados y los efectos inflamatorios innato y adaptativo. A su vez, el IFN- γ es responsable de la destrucción citotóxica de los enterocitos, efecto que se ve

aumentado con el TNF- α [2], hecho que también produce un aumento de los niveles de gluten en la lamina propia además de causar las típicas señales de la EC, como son la atrofia vellositaria y destrucción del epitelio, y la hiperplasia de las criptas.

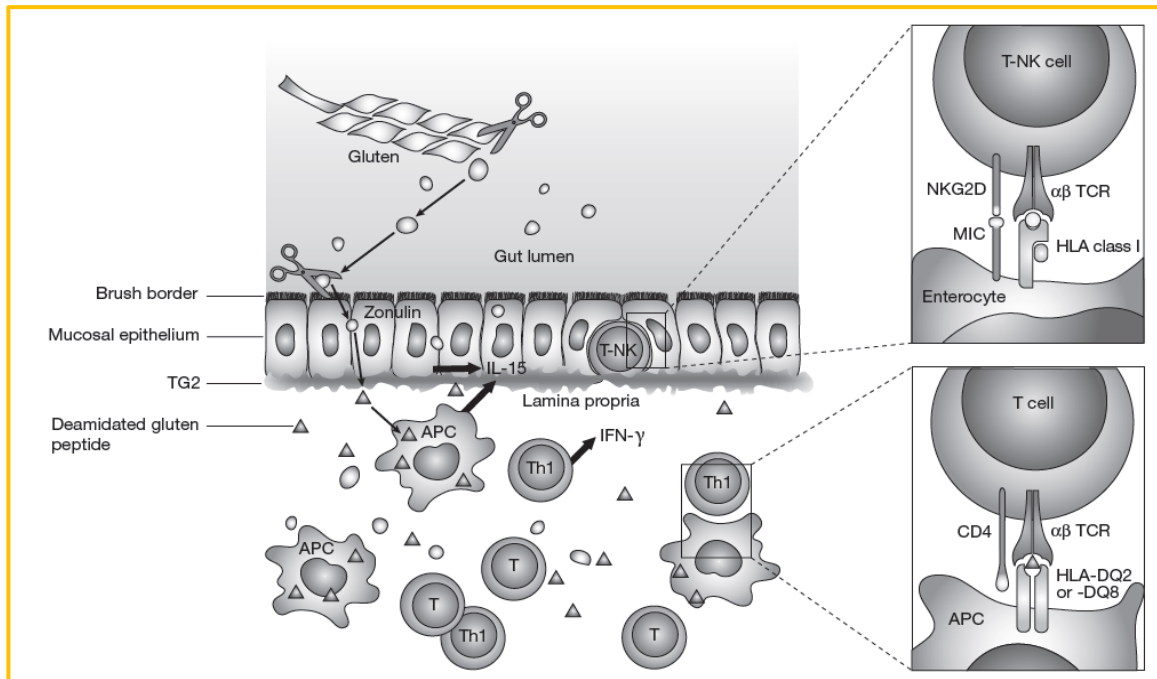


Imagen 1: Reacción inmunológica innata y adaptativa frente a los péptidos del gluten. Una mala digestión del gluten de los cereales en la luz intestinal de las personas celiacas genera péptidos de un tamaño superior al normal. Estos péptidos se denominan *tóxicos*, ya que son capaces de generar un daño tisular y una respuesta inmune innata por sí mismos. Estos péptidos tóxicos activan la inmunidad innata de los enterocitos que responden liberando IL-15 y activando células de respuesta innata como las Natural Killer, a las que presentan estos péptidos por el sistema HLA clase-I. La liberación de citocinas innatas degradará parcialmente las uniones tight-junctions del epitelio permitiendo el paso del gluten a la lamina propia donde la TGt generará *péptidos deaminados inmunogénicos* que serán reconocidos por las Células Dendríticas, las cuales presentarán estos péptidos a los Linfocitos T Específicos del Gluten (*LTEGs*) a través del sistema MHC clase-II. Al activarse estos *LTEGs* producirán una marcada respuesta Th1 dominada por IFN- γ . La aparición del IFN- γ inicia un feed-back positivo por el que los niveles de péptidos tanto tóxicos como inmunológicos comienzan a aumentar en la lamina propia, provocando así, un aumento de la respuesta innata y adaptativa que producirá un aumento de los Linfocitos Intraepiteliales (LIEs) y terminará con la destrucción de las vellosidades intestinales y una hiperplasia de las criptas. (Imagen sacada de LM. Sollid & C. Khosla. *Furute therapeutic options for celiac disease. 2005. Nature*).

Se ha descubierto que en el duodeno de personas celiacas, el receptor para la IL-15 está aumentado incluso en dieta sin gluten y con el epitelio intestinal recuperado, lo que supone que en los celiacos la respuesta por IL-15 y sus consecuencias se producen más fácilmente que en personas sanas, además, el hecho de que se mantenga aun en dieta sin gluten parece indicar que el aumento del IL-15R es inherente a los celiacos y, por tanto, puede tener mucho que ver a la hora de que fracasen los mecanismos de tolerancia oral frente al gluten y se desarrolle la enfermedad [9].

Tanto los LTEGs, como el IFN- γ que generan, son detectables en sangre periférica [4-6]. Se ha demostrado que estos LTEGs provienen del intestino ya que expresan en su membrana plasmática las moléculas de adhesión celular $\beta 7$ -integrina y la $\alpha 4$ -integrina que indican un origen intestinal [12].

En los últimos años, varios grupos de investigación han tratado de certificar estos niveles de IFN- γ en sangre periférica y también de encontrar una diferencia significativa entre estos niveles de IFN- γ en personas sanas y celiacas. Comenzaron analizando las biopsias por inmunohistoquímica [13], y continuaron analizando el ARNm del IFN- γ [14]. Finalmente, descubrieron que el IFN- γ podía ser medido en la sangre cuando se estimulaba la EC a través de un **ensayo de sobrecarga de gluten** o **gluten challenge**. Comenzaron a realizar estudios comparativos entre el IFN- γ de la sangre periférica y de las biopsias. Para medir la activación de los LTEGs a través del IFN- γ en la sangre periférica se han utilizado varias técnicas como el ELISA de IFN- γ o el ELISA de la proteína inducible por IFN- γ (*IP-10* o *CXCL10*), marcadores múltiples como el fluorocromo (*Luminex*) o electroluminiscencia (*MSD*), también el **Enzyme Linked Immuno-Spot (ELISpot)** de IFN- γ [15] o el uso de tetrámeros de *MHC* específicos de HLA-DQ2+ generados por *Raki et al en 2007* [12]. De todos ellos, el más utilizado con diferencia ha sido el ELISpot, una técnica cuya mayor virtud es aportar al mismo tiempo **información cualitativa, al discriminar el IFN- γ del resto de citoquinas; e información cuantitativa, representando con cada punto en el pocillo una única célula relativa secretora de IFN- γ** [15], lo que permite comparar con total fiabilidad distintos grupos de estudio sometidos a los mismos estímulos. Recientemente, en 2013, *Brottveit et al* [11] demostraron finalmente que tanto las técnicas del tetrámero *MHC* de HLA-DQ2+ como **el ELISpot de IFN- γ son más sensibles que la propia histología de la mucosa intestinal (biopsia)** y que la detección del ARNm de las citocinas por RT-PCR para medir una respuesta temprana de la EC después de un gluten challenge. La técnica del ELISpot tiene una sensibilidad del 85%, por lo que algunos casos realmente positivos los detecta como negativos (falsos negativos). Por el contrario, su punto fuerte es su especificidad, que virtualmente es el 100%, por lo que no detecta falsos positivos, es decir, que no detecta personas sanas como enfermas.

Aunando una prueba de sobrecarga oral con gluten *in vivo* y el ELISpot conseguimos un método simple y seguro que permite analizar y cuantificar los LTEGs en sangre periférica [5]. Es cierto que los enfermos celíacos que se someten voluntariamente al gluten challenge pueden sufrir algunos efectos clínicos de la EC, pero se ha demostrado que esta prueba es un método seguro y fiable y que en pocas ocasiones genera síntomas de carácter moderado, ya que el gluten challenge se lleva a cabo durante 3-14 días.

La duración del gluten challenge varía según el grupo de investigación, en 1999 *Hansson et al* [16] publicaron los resultados de un gluten challenge de 12 semanas, donde analizaron la sangre periférica de 38 niños celíacos, y observaron, que a partir de las 2 semanas, los niveles de IFN- γ detectados por la técnica del ELISpot no eran significativamente distintos a los de las siguientes semanas, por lo que con 14 días un gluten challenge genera todo el potencial de respuesta de una persona celíaca. Esta conclusión tiene una inmutable lógica, ya que la EC se caracteriza por generar una respuesta inmune adaptativa por medio del IFN- γ como citocina principal. Las respuestas adaptativas tardan unas 2 semanas en producirse por completo, lo cual encaja perfectamente con los 14 días de gluten challenge.

Algunos grupos de investigación quisieron acortar aún más el tiempo del gluten challenge para conseguir unos resultados más rápidos, con menos problemas para el paciente e intentando mantener un nivel significativo de detección de IFN- γ por medio del ELISpot antes y después del gluten challenge. Se han publicado varios artículos en los que se realiza un gluten challenge de tan solo 3 días [11,12, 17-20], aunque el análisis de la sangre periférica se realizaba a los 6 días, tiempo en el que se inicia la respuesta adaptativa secundaria, es decir, la respuesta adaptativa que se genera más rápidamente debido a que existen linfocitos T de memoria que ya han sido previamente activados frente a péptidos del gluten.

Para conseguir realizar un gluten challenge en un paciente de forma significativa, ya sea por primera vez o de forma repetida, esa persona debe pasar como mínimo 3 meses en dieta sin gluten [17], que es el tiempo mínimo para que desaparezcan la mayor parte de los linfocitos de memoria. Por lo tanto, aunque el gluten challenge de 3 días ha demostrado dar resultados significativos en personas celíacas, es preferible realizar un gluten challenge de 14 días para evitar posibles respuestas por debajo del umbral de detección de personas celíacas que lleven mucho tiempo en dieta sin gluten y cuyos LTEGs de memoria sean tan escasos que la respuesta de IFN- γ ante un gluten challenge de 3 días sea considerada un falso negativo.

Ante la ingesta de gluten, aparecen además de la EC, otras patologías, algunas más reconocidas que otras, como la *dermatitis herpetiforme*, la *ataxia por gluten*, la *alergia al gluten* y, muy de moda en los últimos 4 años, la ***sensibilidad al gluten no celíaca (SGNC)***. La SGNC, aunque es real y está demostrada su existencia, parece estar al mismo tiempo, altamente sobrevalorada, ya que menos de 1/3 de las personas que

afirman sufrir esta patología realmente la padecen [10]. El resto, probablemente son presa de la sugestión subconsciente que se ejerce hoy en día sobre la EC y el gluten, y los falsos beneficios que produce una dieta sin gluten.

Paradójicamente, la SGNC se diagnostica por descarte de la EC y la alergia al gluten, al no presentar ni la atrofia vellositaria ni la hiperplasia de las criptas, y solo un leve aumento de los LIEs [11], lo que supondría como máximo un nivel 1 en la *escala modificada de Marsh* [21]. Se conoce muy poco acerca de esta nueva enfermedad donde no logran identificarse mecanismos alérgicos o de autoinmunidad, ni alteraciones de la permeabilidad intestinal, ni cambios morfológicos en la mucosa duodenal [22]. “*The London Consensus*” defiende una falta de *anticuerpos anti-TGt* y de cualquier *comorbilidad autoinmune* (coexistencia de 2 enfermedades autoinmunes) en la SGNC [21], no así en la EC, donde es común que los celíacos presenten comorbilidad junto con otra enfermedad autoinmune, como por ejemplo, la enfermedad de Crohn o la intolerancia a la lactosa [23].

Por otro lado, se puede afirmar casi con total seguridad que la SGNC no está mediada por respuestas adaptativas, solo por una respuesta inmune innata. El trabajo de *A. Sapone et al en 2013* descubrió el aumento del Toll-Like Receptor 2 en la mucosa del intestino delgado en personas con SGNC frente a celíacos. Tampoco está totalmente claro si la SGNC está causada exclusivamente por el gluten como en los celíacos [21], de hecho, *PR Gibson* aseguro en 2013 [25] que el componente activo sensible de la SGNC no es el gluten ni el trigo sino los oligo, di y monosacáridos y los polioles (*FODMAPs*); es decir, glúcidos no proteínas; aunque los investigadores parece que no están seguros del todo de que no se hayan producido contaminaciones o malas interpretaciones debido a que se tienen que basar en cuestionarios y medidas subjetivas no objetivas.

Clínicamente la EC y la SGNC son prácticamente indistinguibles [21]. Se antoja, por tanto, a día de hoy, encontrar un método de diagnóstico rápido y sencillo que permita diferenciar personas sanas, enfermos celíacos y personas con SGNC entre todos aquellos que afirman sentir un malestar ante la dieta con gluten. Los autores *Ashat y Kochhar* proponen en 2014 [21] como método diagnóstico de la SGNC una dieta sin gluten y si se produce una mejoría, posteriormente hacer una prueba de sobrecarga oral, doble ciego, controlada por placebos (double-blind placebo-controlled food challenge o *DBPCFC*) para comprobar la reaparición de los síntomas. Con el *DBPCFC* se puede distinguir la SGNC de la alergia al gluten ya que esta se produce en pocos minutos-horas y los síntomas de la SGNC aparecen a más largo plazo (horas-días). Salta a la vista, que se conoce tan poco sobre el mecanismo de acción de la SGNC que el diagnóstico clínico se lleva a cabo prácticamente en su totalidad a base de síntomas subjetivos, lo que provoca la aparición de numerosos casos falsos, que realmente precisan de una interpretación de síntomas objetivos para ser diagnosticados como verdaderos SGNC. Hasta entonces, la realización de un *DBPCFC* debería realizarse dos veces como mínimo para evitar riesgos de falsos positivos. Hasta la fecha, en lo

referente al IFN- γ , solo existe el estudio de *Brottveit et al 2013* [11] en donde analizan, entre otros factores, los niveles de ARNm del IFN- γ por medio de la RT-PCR a través de biopsias intestinales de personas celiacas, sanas y personas con SGNC. Las diferencias que encontraron indican que estas personas con SGNC tenían niveles de IFN- γ más elevados que las personas sanas, pero no tanto como los celiacos; pero, **hasta este trabajo, nunca se ha realizado el análisis de los niveles de IFN- γ a través de un método no invasivo a personas con sospecha de EC y SGNC.**

1.2 Hipótesis

Dicho esto, es posible que la biopsia no sea concluyente a la hora de realizar el diagnóstico como en los casos de sospecha de EC y SGNC. Analizando los niveles de IFN- γ secretados a nivel de célula única en la sangre periférica por el método del ELISpot, obtendríamos información previa a la aparición de los síntomas intestinales y con un método muchísimo menos invasivo. Es prioritario el análisis de IFN- γ ya que de esta forma se analiza la consecuencia directa de la activación de una respuesta adaptativa frente al gluten. En el caso de personas con sospecha de EC, se podrían comparar sus niveles de LTEGs frente a personas celiacas en dieta sin gluten y personas sanas en dieta con gluten, obteniendo así un nuevo dato objetivo para apoyar el diagnóstico final. Paralelamente, no existen referencias sobre los niveles de IFN- γ en sangre periférica de personas con SGNC, por lo que el primer paso sería estandarizar la técnica del ELISpot en estas personas y comprobar si se detectan o no células secretoras de IFN- γ en sangre periférica. Para obtener unos resultados más fiables, a estas personas se las sometería a una prueba de sobrecarga con gluten (gluten challenge) de 14 días, comprobándose, al mismo tiempo, si hubiera alguna relación significativa antes y después de la prueba y, además, si serviría como apoyo objetivo al diagnóstico clínico final.

1.3 Objetivos

- I. Estandarizar la técnica de cuantificación de células productoras de IFN- γ en sangre periférica por el método de ELISpot en personas con sospecha de SGNC sometidas a un gluten challenge de 14 días.
- II. Determinar si existen diferencias significativas antes y después de la prueba de sobrecarga con gluten en personas con sospecha de SGNC.
- III. Determinar si este ensayo es válido como apoyo diagnóstico en personas con sospecha de EC en dieta con gluten comparándolas con pacientes diagnosticados de EC en dieta sin gluten y con personas sanas en dieta con gluten.
- IV. Determinar si existen diferencias significativas entre las personas con sospecha de SGNC antes y después de la prueba de sobrecarga, con las personas con sospecha de EC, con pacientes celiacos y las personas sanas.

2. Materiales y métodos

2.1. Pacientes y voluntarios

Se ha dispuesto durante la realización de este trabajo de 17 voluntarios, 7 hombres y 10 mujeres, de edades comprendidas entre los 20 y 62 años, algunos de los cuales tenían datos sobre marcadores genéticos de riesgo (DQ2+ / DQ8+) y genética (**Tabla 1**).

ID	EDAD	SEXO	GENETICA	DIETA	GLUTEN CHALLENGE	ELISpots REALIZADOS
SEC1	54	Mujer	Sin datos	Normal	No	2
SEC2	Sin datos	Hombre	DQ2+	Normal	No	1
SEC3	Sin datos	Mujer	DQ2+	Normal	No	1
SEC44	20	Mujer	Sin datos	Normal	No	1
CS4	46	Hombre	DQ2+	Normal	No	2
CS5	28	Mujer	Negativa	Normal	No	1
CS6	57	Hombre	Negativa	Normal	No	1
CS10	45	Hombre	DQ2+	Sin Gluten	No	1
EC7	35	Mujer	Sin datos	Sin Gluten	No	2
EC8	50	Mujer	DQ2+ y DQ8+	Sin Gluten	No	2
EC9	36	Mujer	DQ2+	Sin Gluten	No	1
SGNC11	62	Mujer	Sin datos	Sin Gluten	Sí, 14 días	3
SGNC12	42	Hombre	DQ2+ y DQ8+	Sin Gluten	Sí, pero solo 4 días	2
SGNC13	24	Hombre	Sin datos	Sin Gluten	Sí, 14 días	3
SGNC14	48	Hombre	DQ2+	Sin Gluten	Sí, 14 días	3
SGNC15	Sin datos	Mujer	DQ2+ y DQ8+	Sin Gluten	Sí, 14 días	3
SGNC16	47	Mujer	DQ2+	Sin Gluten	Sí, 14 días	3

Tabla 1: Datos y referencias más importantes de los voluntarios.

La nomenclatura utilizada para los 4 grupos (**ID**) es la siguiente: **SEC** (1-3 y 44) son personas con *Sospecha de Enfermedad Celiaca*, los cuales son pacientes al diagnóstico y, por lo tanto, mantienen una dieta con gluten; **CS** (4-6 y 10) son los *Controles Sanos*, personas sin ningún tipo de síntoma frente al gluten; **EC** (7-9) son *Enfermos Celiacos* diagnosticados, que siguen una dieta sin gluten como mínimo desde hace 1 año y sirven como control de la enfermedad; y **SGNC** (11-16) son pacientes con sospecha de *Sensibilidad al Gluten No Celiaca*, es decir, con síntomas atribuidos al gluten pero que no cumplen con los criterios diagnósticos de la EC y que siguen una dieta sin gluten ($t=0$, *ver punto 2.3 prueba de sobrecarga oral con gluten*) sin daños en la mucosa intestinal (Valor en la escala modificada de Marsh 0 o 1 [1,9]) y a los que voluntariamente se les somete a una prueba de sobrecarga oral de gluten durante 14 días.

Desde el voluntario SEC1 hasta el EC9 se realiza únicamente 1 ELISpot, con algunas excepciones. El SEC1 posee 2 ELISpots ya que la técnica se estandarizó con ella al ser la primera voluntaria (*ver 2.5. estandarización técnica del ELISpot*), al mismo tiempo, poseen 2 ELISpots CS4, EC7 y EC8 debido a un fallo en el almacenamiento de la sangre en tubos sin heparina (*ver 2.4 tratamientos de las muestras de sangre*). Los voluntarios con SGNC (SGNC11-16) poseen 3 ELISpots en 3 tiempos diferentes. En el caso del voluntario SGNC12, no se completó esta prueba debido a que acusó fuertes síntomas, aunque sí accedió a completar el estudio en el tiempo 14 (*ver punto 2.3 prueba de sobrecarga oral con gluten*).

2.2. Permisos y confidencialidad

Este estudio se ha realizado con la aprobación de los comités éticos del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV).

Los voluntarios no sometidos al gluten challenge (SEC1-EC9) han sido cedidos por el Servicio de Digestivo del HCUV y por el Servicio de Digestivo del Hospital Universitario Río Hortega (HURH), o reclutados de forma individual por otras vías. Para dicho reclutamiento y posterior extracción y análisis de su sangre se solicitó un permiso a la Gerencia de Atención Primaria de Valladolid Este (**Anexo 1**).

En lo referente al gluten challenge, los pacientes eran reclutados por el Dr. Luis Fernández Salazar desde el Servicio de Digestivo del HCUV, también eran debidamente informados de los posibles riesgos y síntomas que pudieran sufrir, además de sus derechos como voluntarios en un estudio clínico en España (**Anexo 2**), como el derecho a abandonar el estudio por cualquier motivo sin perjuicio legal o económico para el voluntario (*ver punto J) del Anexo 2*), como sucediera con el voluntario SGNC12. Por otro lado, la idea original para realizar el gluten challenge era administrar por vía oral a los voluntarios (SGNC11-16) una cantidad determinada y conocida de gluten a partir de una capsula. Sin embargo, la utilización de dicha capsula fue reconocida por la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) como un medicamento, paralizando y bloqueando su uso sin unos determinados permisos y pruebas, inviables con el tiempo disponible para este trabajo.

En todos los casos, los voluntarios son informados del objetivo del estudio y del tratamiento confidencial que se dará a sus datos y sus resultados, además, firman un consentimiento que verifique que han comprendido el objetivo y los riesgos del estudio tal como ordena el artículo 70 punto 2 de la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

2.3. Prueba de sobrecarga oral con gluten

Esta prueba consiste en la toma de 4 rebanadas de pan multicereal de marca blanca con aproximadamente 4g de gluten/rebanada, lo que hace un total de 16g de gluten al día. Tal y como se explica en el punto 2.2 Permisos y confidencialidad, la idea original de administrar el gluten por vía oral mediante unas capsulas fue rechazada por la AEMPS.

La ingesta de gluten se prolonga durante 14 días en los que se realizan 3 extracciones de sangre. La sangre se obtiene y analiza por medio del ELISpot el mismo día del inicio del gluten challenge (*tiempo 0*) mientras los voluntarios están aún en dieta sin gluten, por lo que, lógicamente, la extracción se realiza antes de que ingieran el gluten. Se obtienen muestras de sangre también en los días 7 (*tiempo 7*) y 14 (*tiempo 14*). A efectos teórico-prácticos, en el día 14 se puede asumir que el voluntario está en dieta con gluten.

A los 6 voluntarios (SGNC11-16) además de extracción de sangre, se les realizó una biopsia del intestino proximal en los tiempos 0 y 14 para ser analizada por citometría de flujo (datos no incluidos).

2.4. Recogida y procesamiento de muestras de sangre. Obtención de Células Mononucleadas de Sangre Periférica.

La sangre extraída por personal facultativo en los hospitales HCUV o HURH se trasladaba por nuestra cuenta a los Laboratorios de Inmunología de las Mucosas en la 4º Planta de la Facultad de Medicina. La sangre debía extraerse en tubos de heparina para evitar que la sangre se coagulase. En 3 ocasiones, la sangre de los voluntarios (CS4, EC7 y EC8) fue almacenada en tubos con EDTA y se coaguló antes de poder ser utilizada. Los 3 voluntarios accedieron de buen grado a repetir la extracción.

El primer paso después de trasladar la sangre al Laboratorio era centrifugarla a 1.200 rpm durante 10 minutos para extraer el suero que sería usado posteriormente para medir la proteína inducible por IFN- γ (IP-10 o CXCL10) a través de un ELISA (datos no mostrados). Después de la centrifugación, se trabaja con la muestra de sangre en campana de flujo laminar. Tras extraer el suero, el volumen sanguíneo restante era mezclado a proporciones iguales en un tubo de 50mL con Medio Completo sin FCS a 37C° (MC= RPMI 1640 de BioWhittaker (sin L-Glutamina) + 10% FCS + 1% Penicilina/Streptomycin + 1%L-glutamina + 0,1% Gentamicina). Paralelamente, en otro tubo de 50mL se añadía el mismo volumen obtenido de Ficoll (Biocoll Separating Solution de BIOCHROM AG). A continuación, la muestra de sangre+MC se añadía muy lentamente sobre el ficoll, y con extrema suavidad y cuidado para no mezclarlos entre sí, ya que el secreto radica en no mezclar las dos soluciones.

Seguidamente, se centrifuga el tubo con el ficoll y la sangre+MC a 2.000 rpm durante 30 minutos a 20C° y sin freno. Tras este paso se puede observar una capa semigrumosa de color blanquecino que serán las Células Mononucleadas de Sangre Periférica (PBMCs) que habrá que obtener. Justo por debajo de la capa de PBMCs se encuentra el ficoll, que es tóxico para las células, por lo que la obtención de estas PBMCs debe hacerse con mucho cuidado intentado absorber el menor volumen de ficoll posible.

Finalmente, el volumen de PBMCs obtenido se lavaba con MC ahora sí con FCS, centrifugándose a 1.600 rpm, 20C°, 10min y sin freno. Las células precipitaban y se podía retirar el sobrenadante. Se repetía el proceso pero a 1.500 rpm, 5 minutos, 20C° y con freno y se volvía a desechar el sobrenadante. El pellet de PBMCs obtenido se resuspendía ahora en un volumen pequeño, como 2mL, para aumentar la concentración por mililitro de las PBMCs. Como último paso, para asegurarnos de que las células estaban vivas, y calcular su concentración por mililitro, se tomaba una muestra, se teñía con Trypan Blue y se observaba en la cámara de Neubauer en un microscopio de luz polarizada “Nikon Eclipse TS100”. (Continuación en 2.6 Protocolo de ELISpot)

2.5. Estandarización técnica del ELISpot

El Enzyme Linked Immuno-Spot, o simplemente ELISpot (“ELISpotPRO for Human IFN-g, 3420-2AST-2 de MABTECH, Sweden”) es una técnica basada en un ELISA-Sándwich, por lo que está compuesto por los típicos platos de 96 pocillos, ordenados en 12 tiras de 8 pocillos cada una. Cada uno de estos pocillos se caracteriza por tener una membrana el fondo del pocillo. Esta membrana posee en su superficie anticuerpos anti-IFN- γ que reconocen específicamente y se unen irreversiblemente al IFN- γ que secretan los PBMCs, siendo capaz de reconocer esta secreción a nivel individual (*single-cell level*)

Con la primera muestra de sangre (SEC1) se realizó un doble ELISpot, para observar los resultados a las 24 y 48h. Se observó una mayor y más clara respuesta a las 48h por lo que se optó por este tiempo de incubación. Se decidió hacer un duplicado de los ensayos en la propia tira de 8 pocillos (4 y 4), así, se propuso una concentración de 50.000 PBMCs en los 4 primeros pocillos y 25.000 en los 4 pocillos siguientes. Tras este ELISpot, se determinó que la concentración de células era demasiado baja, por lo que se aumentó a 200.000 y 100.000 PBMCs por pocillo, siendo las concentraciones definitivas para el ensayo del ELISpot.

Por otro lado, dentro de cada duplicado se incubaron 2 pocillos sin estímulo alguno (control negativo) y se estimularon 2 pocillos con el anticuerpo proporcionado por la casa comercial para ser utilizado como control positivo (*monoclonal-Ab CD3-2*) ya que reconoce de forma específica los linfocitos T y estimula su secreción de IFN- γ (**Imagen 2**). Posteriormente a este primer ELISpot, se decidió hacer solo un pocillo

negativo y un pocillo positivo, restando 2 pocillos en los que se incluyó también el péptido deaminado 33-mer para que sirviera de estímulo para los LTEGs.

En resumen, se determinó usar una concentración de 200.000 PBMCs en los 4 primeros pocillos de cada tira y 100.000 PBMCs en los otros 4. Dentro de estos 4 pocillos, el 1° sería el control negativo, sin estímulo alguno; el 2° el control positivo, con el anticuerpo mAb CD3-2 a una concentración de 1:1000; y el 3° y 4° el estímulo con el péptido 33-mer a una concentración de 100µg/mL.

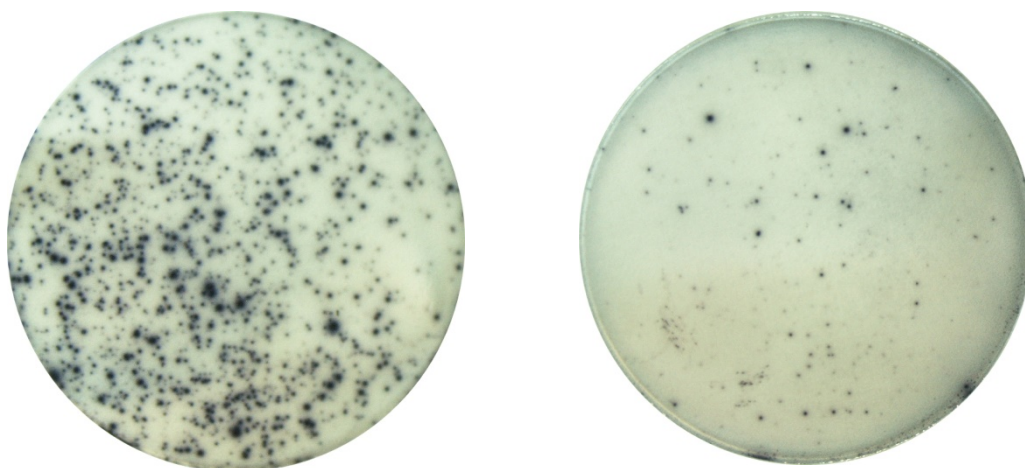


Imagen 2: Pocillos revelados de ELISpot. Puede observarse la superficie ampliada de la membrana de los pocillos del ELISpot. En la derecha se muestra un pocillo estimulado con el mAb CD3-2 que estimula la secreción de IFN- γ en los linfocitos T, lo cual contrasta notablemente con un pocillo no estimulado con dicho anticuerpo.

2.6. Protocolo del ELISpot

La técnica del ELISpot se realiza en dos días. El primer día comienza tras la obtención de los PBMCs con la técnica del ficoll. Se mantiene el trabajo en campana de flujo laminar durante este día, en el 2° día no son necesarias medidas de esterilidad.

En primer lugar hay que preparar los pocillos, por lo que la tira o tiras escogidas se lavaban 4 veces con 200µL de PBS estéril. Después se acondicionaban las membranas de los pocillos incubando como mínimo 30 minutos con 200µL de MC con FCS cada pocillo. Este proceso se puede hacer con la *multicanal*.

Una vez listos los pocillos se retiraba el MC y se añadía la suspensión celular de PBMCs en MC con FCS a la concentración que buscábamos (200.000 y 100.000 células). Se añadía también a cada pocillo el estímulo (mAb CD3-2 o 33-mer), excepto en el control negativo que no llevaba estímulo. Cuando el cultivo estaba listo, los pocillos se incubaban en un incubador a 37C° con 90% de humedad y 5% de CO₂ durante 48h, cubriendo la superficie de los pocillos para evitar la evaporación del medio y el fallo del ensayo.

Tras las 48h, se eliminaba el medio junto con las células. Para retirar todas las células, se lavaban los pocillos 5 veces con 200 μ L de PBS a temperatura ambiente. Ahora sobre la membrana se encuentran los anticuerpos anti-IFN- γ y asociados a ella y el IFN- γ que hayan secretado las células. Se añadía a los pocillos el anticuerpo secundario (7-B6-ALP) que reconocía el IFN- γ asociado a los anticuerpos de la membrana, y que estaba conjugado con una estreptavidina fosfatasa alcalina, que tras la adición del sustrato unos pasos más adelante, generaría una señal permanente. Se añadían 100 μ L del 7-B6-ALP diluido a 1:200 en PBS-0,5%FCS y se dejaba incubar dos horas a temperatura ambiente y en oscuridad.

Una vez pasadas las 2 horas de incubación del anticuerpo secundario, se lavaba 5 veces con 200 μ L de PBS por pocillo. Es importante realizar bien este último lavado para no dejar rastro de anticuerpo que pudiese generar suciedad o falsos puntos. Después de los lavados, se añadían 100 μ L del sustrato (BCIP/NBT-plus) a cada pocillo. Esta solución reaccionaba con la estreptavidina fosfatasa alcalina del 7-B6-ALP generándose unos puntos permanentes sobre la membrana que indican la secreción de IFN- γ a nivel de una única célula. El tiempo de revelado variaba, pero era muy común que los 2 pocillos con el estímulo positivo mAb CD3-2 desarrollasen muy rápidamente los puntos (*Spots*), por lo que había que tener mucho cuidado con ellos y parar la reacción a tiempo, antes de que se quemase la señal. Para detener la reacción se retiraba el sustrato y se añadía agua.

Por último, para poder guardar las tiras del ELISpot ya revelado, se retiraba el agua de los pocillos y se dejaban secar completamente, en especial la parte inferior de los pocillos, y se almacenaba en oscuridad a temperatura ambiente.

2.7. Obtención de resultados

Para poder obtener un registro informático de los resultados y para poder hacer el recuento de puntos (*Spots*) con total fiabilidad, se realizaron fotos de todos los pocillos en el esteromicroscopio “Nikon SMZ1000” situado en el laboratorio C5 del IBGM perteneciente a los doctores Lola Ganfornina y Diego Sánchez. El número de puntos se contó con el programa ImageJ.

2.8. Tratamiento de datos y estadística

El total de puntos de los 17 voluntarios se estandariza por una regla de 3 a número de células secretoras de IFN- γ /10⁶ células PBMCs. A continuación se realiza la media aritmética entre los mismos estímulos del pocillo, de tal manera que obtenemos un solo valor por cada estímulo y persona.

Debido al número bajo de individuos dentro de cada grupo, no es posible realizar una estadística más allá de una meramente descriptiva, que permita eso sí, la visualización de los niveles de células secretoras de IFN- γ de forma clara y esquemática, con el fin de encontrar diferencias significativas para definir unos grupos y otros, como se indica en los objetivos.

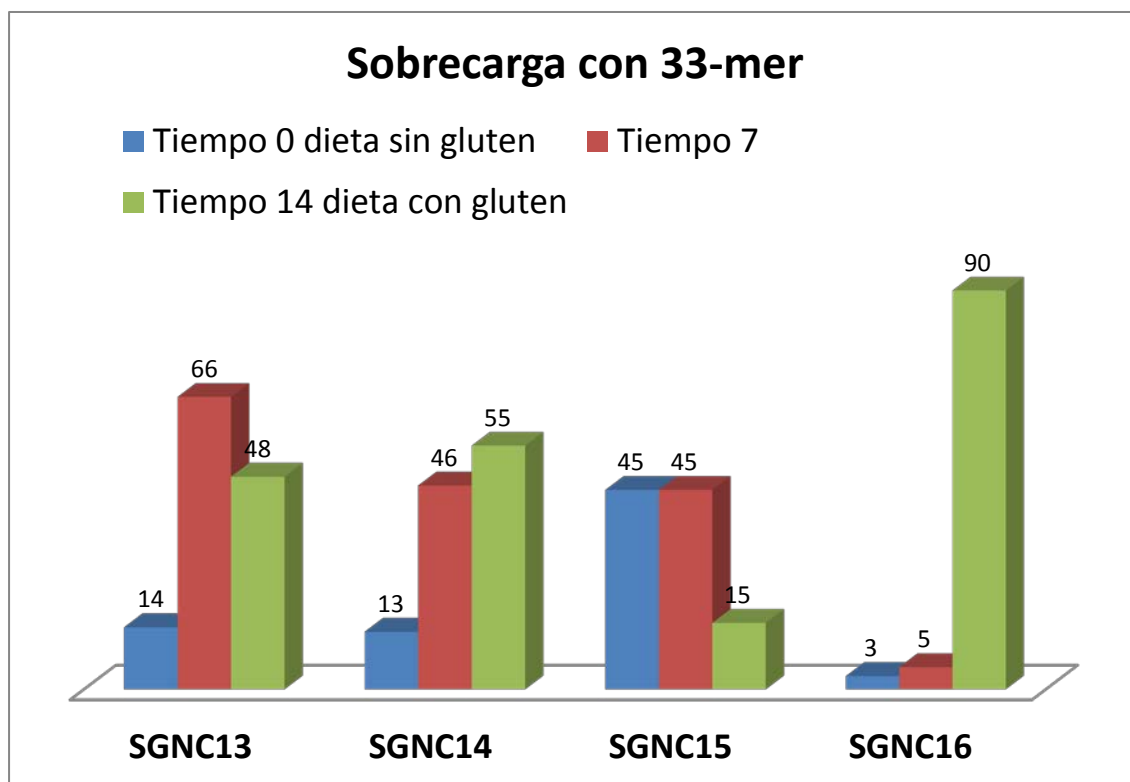
3. Resultados

3.1 Estandarización del ELISpot en personas con SGNC

La técnica del ELISpot de IFN- γ no ha sido utilizada nunca para medir las células secretoras de IFN- γ en personas con sospecha de SGNC, o al menos, no se tiene constancia de ello a día de hoy. Por tanto, como se indica en el apartado de 1.3, el primer objetivo de este trabajo consiste en aplicar la técnica del ELISpot de IFN- γ en pacientes con sospecha de SGNC y estandarizar la metodología para conseguir unos resultados más óptimos si es posible. Para ayudar en el proceso de análisis, estos pacientes con sospecha de SGNC participan durante 14 días en una prueba de sobrecarga oral con gluten.

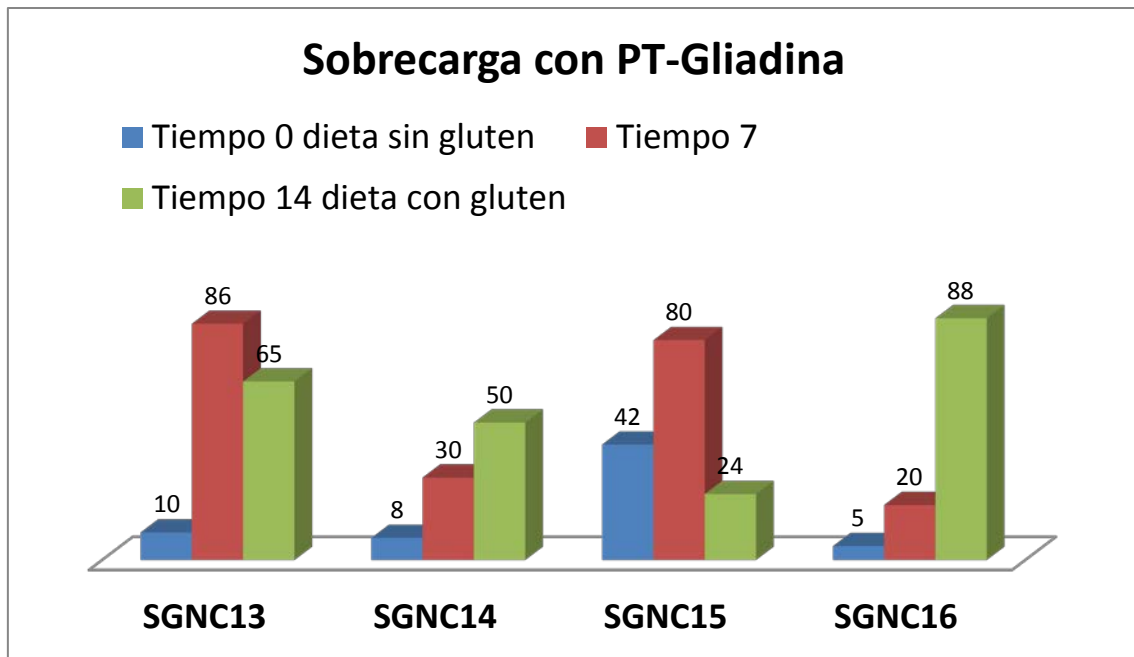
La estandarización de la técnica se llevó a cabo con los pacientes SGNC11 y 12. Su primer (tiempo 0) y segundo (tiempo 7) ELISpot se realizaron solamente a concentraciones de 200.000 y 100.000 células sin ningún estímulo, asumiendo que la sobrecarga supondría un estímulo por sí mismo. Para intentar aprovechar al máximo el ensayo del ELISpot, se estableció desde el tiempo 14 y para los siguientes pacientes una concentración única de 200.000 células para todos los pocillos, manteniendo solo 3 sin estímulo adicional y añadiendo a los PBMCs extraídos de la sangre periférica una estimulación con el péptido 33-mer y la *PT-gliadina* (gliadina hidrolizada por pepsina y tripsina) en dos pocillos cada uno. Se mantuvo un único pocillo con el control positivo (mAb CD3-2), ya que, a fin de cuentas, el control positivo solo nos indica que hemos realizado bien el ensayo. Además, el uso de estímulos permite comparar con mayor eficiencia el grupo de sospechosos de SGNC con el resto de grupos (SEC, EC Y CS), lo cual es la base del *objetivo IV*. Lamentablemente, la *PT-gliadina* no llegó a utilizarse en el resto de grupos.

3.2 Resultados del ELISpot en personas con SGNC



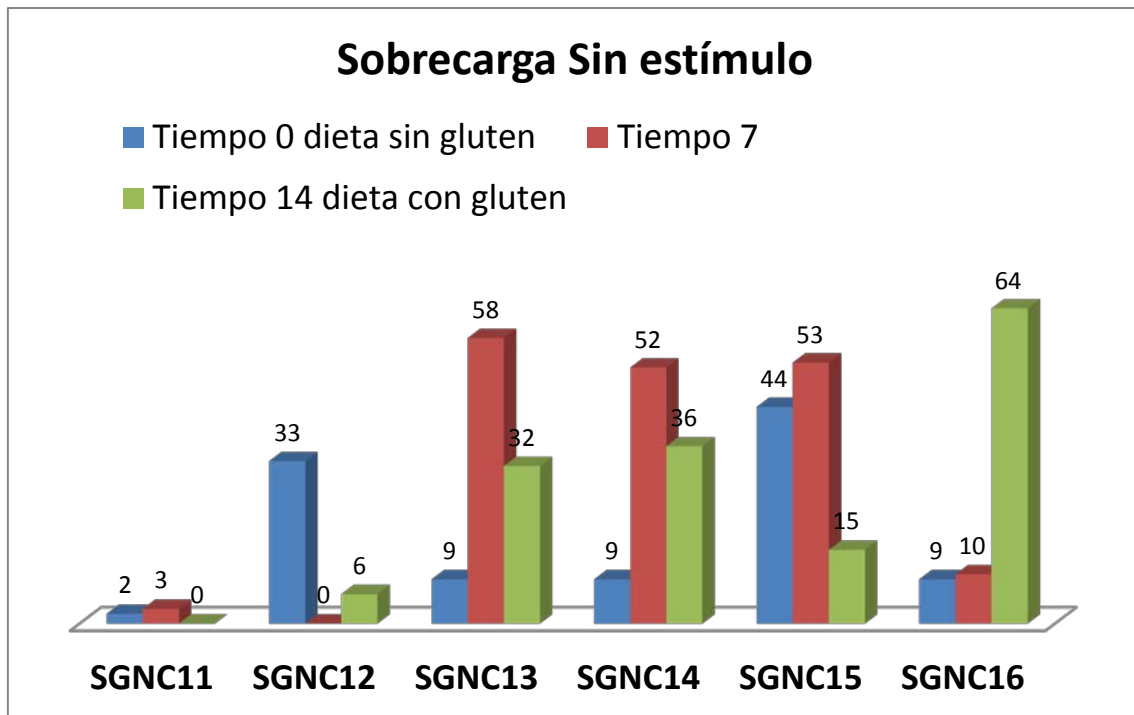
Gráfica 1: Sobrecarga con 33-mer. Número medio de células secretoras de IFN- γ por millón de PBMCs cultivados con 33-mer en pacientes con sospecha de SGNC en los 3 tiempos de análisis de la sobrecarga oral de gluten. Los pacientes SGNC11 y 12 no poseen datos a tiempo 0 ni 7, sí ha tiempo 14, cada uno con un total de 4 células secretoras de IFN- γ por millón, un valor muy bajo, no expuesto en esta gráfica, pero que concuerda con la tendencia a la baja que se observa en la gráfica 3 más adelante.

Se aprecia la variación que hay entre el tiempo 0 (azul) y el tiempo 14 (verde). Salta a la vista como en los pacientes SGNC13, SGNC14 y SGNC16 los valores a tiempo 0 son bastante bajos y sufren un gran crecimiento en el tiempo 14, justo lo opuesto que en el paciente SGNC15, que a los tiempos 0 y 7 tenía una concentración de células muy elevada y en el tiempo 14 esa concentración se desplomaba. En relación a los datos del tiempo 7, puede verse como todos tienen unos niveles altos a excepción del SGNC16.



Gráfica 2: Sobrecarga con PT-gliadina. Número medio de células secretoras de IFN- γ por millón de PBMCs cultivados con PT-gliadina en pacientes con sospecha de SGNC en los 3 tiempos de análisis de la sobrecarga oral de gluten. Los pacientes SGNC11 y 12 no poseen datos a tiempo 0 ni 7, sí ha tiempo 14, con un total de 3 y 10 células secretoras de IFN- γ por millón respectivamente, un valor muy bajo, no expuesto en esta gráfica, pero que concuerda con la tendencia a la baja que se observa en la siguiente gráfica.

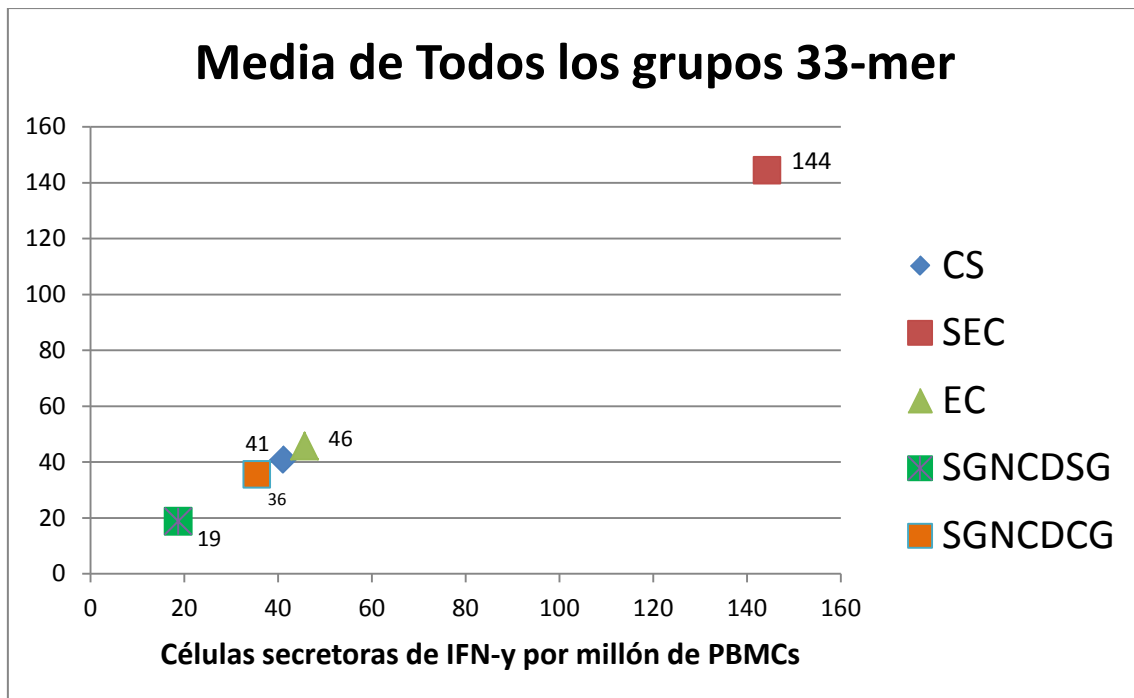
Al igual que en la gráfica 1, destaca como los valores a tiempo 0 de SGNC13, SGNC14 y SGNC16 son muy bajos y a tiempo 14 aparecen unos resultados muy elevados. Al mismo tiempo, el paciente SGNC15 tiene unos niveles de células secretoras de IFN- γ y marcadamente superiores a las de los demás, y, aunque experimenta una subida en el tiempo 7, acaba disminuyendo drásticamente en el tiempo 14 al igual que en la gráfica 1. También es interesante destacar como para el tiempo 7, los pacientes SGNC13 y SGNC15 tienen unos valores casi idénticos, al igual que SGNC14 y SGNC16.



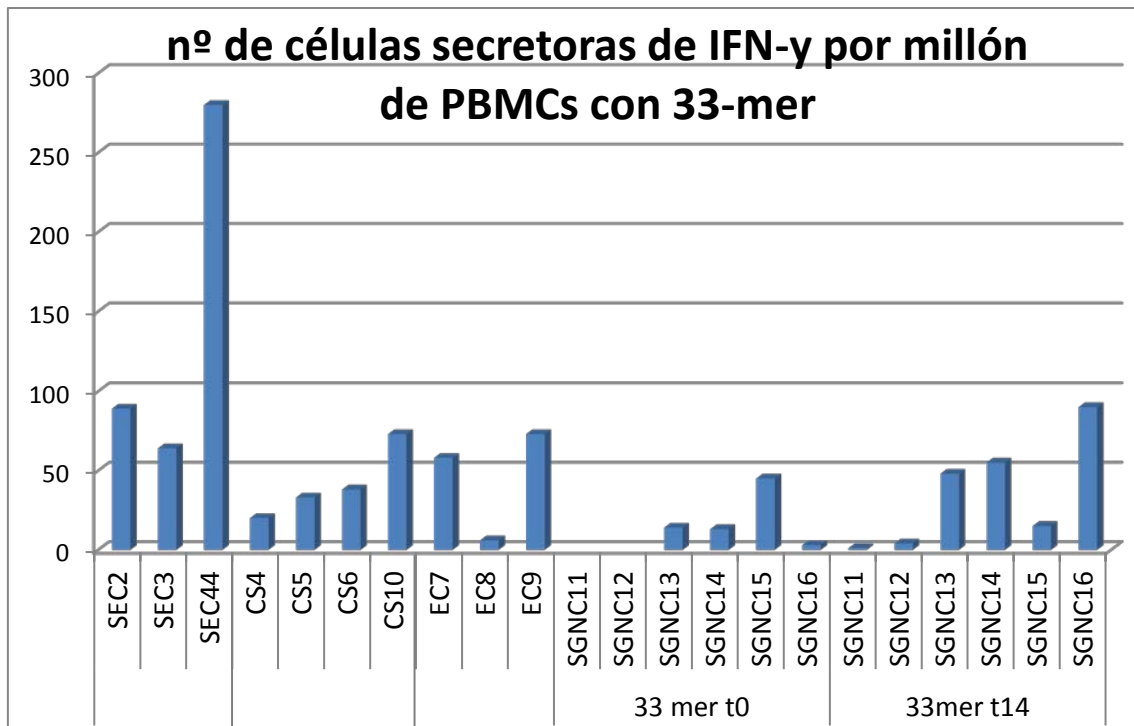
Gráfica 3: Sobrecarga sin estímulo. Número medio de células secretoras de IFN- γ por millón de PBMCs cultivados sin estímulo en los 6 pacientes con sospecha de SGNC en los 3 tiempos de análisis de la sobrecarga oral de gluten.

Se mantiene la tendencia de los SGNC13, SGNC14 y SGNC16 de aumentar sus niveles de respuesta desde el tiempo 0 al 14. También se observa como los niveles de SGNC12 al igual que SGNC15 son muy elevados al principio y luego disminuyen drásticamente. En lo referente al SGNC11, sus niveles apenas sufren variación. Los datos del tiempo 14 de SGNC11 y SGNC12 (no mostrados) ante los estímulos de 33-mer (gráfica 1) y PT-gliadina (gráfica 2) indican la misma tendencia, unos valores muy bajos al final de la sobrecarga oral con gluten. Como ocurría en la gráfica 1, los SGNC13, SGNC14 y SGNC15 tienen unos niveles de células secretoras de IFN- γ al tiempo 7 muy elevadas, en este caso, mucho más que SGNC11, SGNC12 y SGNC16.

3.3 Valores medios e individuales de todos los grupos

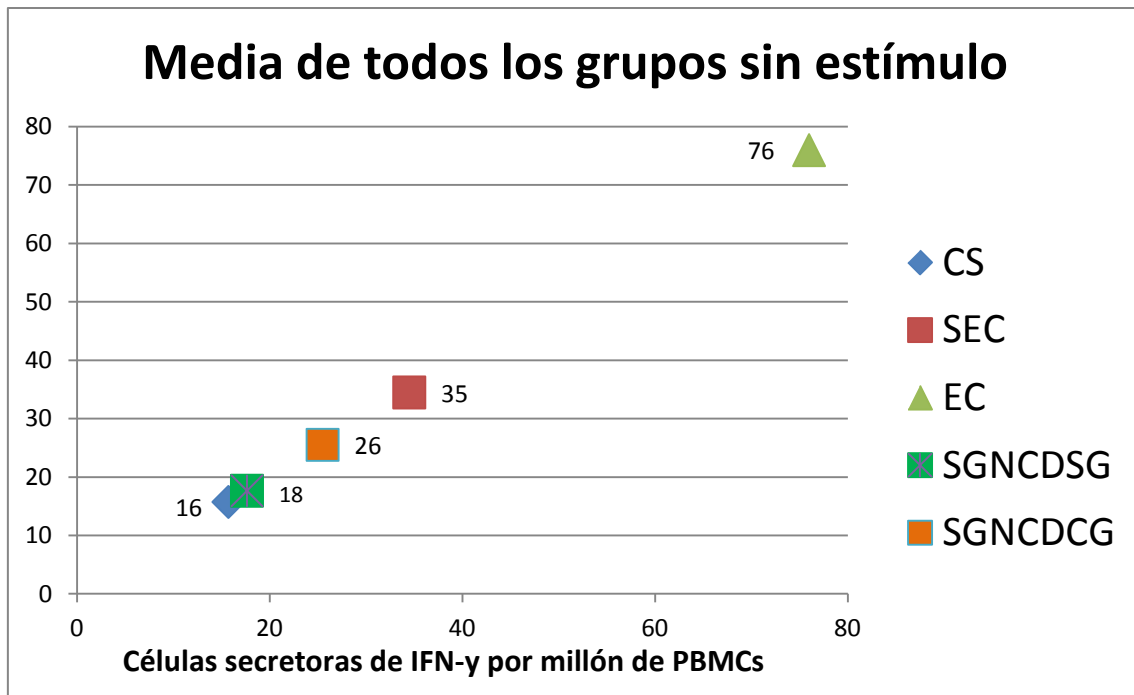


Gráfica 4: Valores medios de células secretoras de IFN- γ por millón de PBMCs cultivados con estímulo de 33-mer de todos los grupos. Se aprecia como la media de los pacientes sospechosos de enfermedad celiaca es muchísimo más elevada que el resto de grupos. Los valores de los enfermos celiacos son más elevados que los de las personas sanas y que los sospechosos de SGNC. También destaca como los niveles medios de células secretoras de IFN- γ por millón de PBMCs de los pacientes sospechosos de SGNC tanto en dieta sin gluten (SGNCDSDG) como en dieta con gluten (SGNCDCG) son más bajos que la media de los controles sanos. Se observa también como los valores tras la prueba de sobrecarga aumentan en el conjunto de pacientes con sospecha de SGNC, aunque como hemos visto en las 3 gráficas anteriores, no todos los pacientes siguen esa progresión.



Gráfica 5: Valores individuales medios de células secretoras de IFN- γ por millón de PBMCs cultivados con 33-mer. En la gráfica 4 se observa un valor medio de pacientes sospechosos de enfermedad celiaca muy elevado, esto se debe al valor tan alto que tiene SEC44. Si atendemos a los otros dos (SEC 2 Y SEC3) podemos ver como sus niveles son más altos que los controles sanos (sin tener en cuenta que el CS10 tiene unos valores elevados), y muy similares a los enfermos celiacos diagnosticados y a los sospechosos de SGNC13, 14 y 16 en dieta con gluten (tiempo 14).

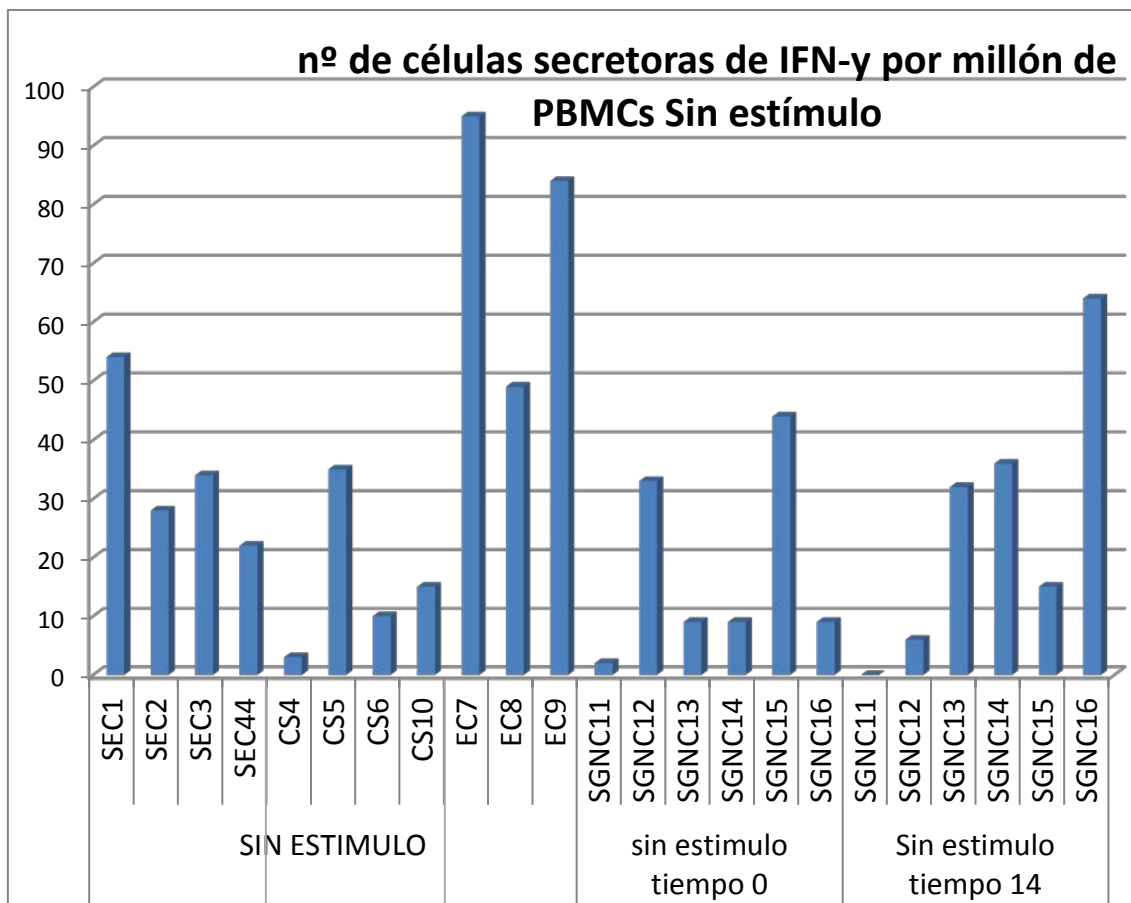
Con respecto a los pacientes con SGNC, ante una dieta sin gluten (tiempo 0) los niveles son más bajos que los controles celiacos y los controles sanos. Como se explica en la gráfica 1, se observa como los SGNC13, 14 y 16 tienen unos valores a tiempo 0 bajos que ascienden mucho a tiempo 14, y como ocurre lo contrario con el SGNC15.



Gráfica 6: Valores medios de células secretoras de IFN-γ por millón de PBMCs cultivados sin estímulo de todos los grupos. En esta gráfica destacan los niveles medios tan elevados de los enfermos celíacos. Los valores de personas con sospecha de EC tienen, al igual que en la gráfica 4, unos niveles más elevados que las personas sanas y que los pacientes con sospecha de SGNC.

En las personas con sospecha de SGNC, se mantiene la tendencia de incrementar los niveles de células secretoras de IFN-γ tras la prueba de sobrecarga oral con gluten. Claro que, como se representa en la gráfica 3 y 7, los valores individuales en algunos casos ascienden y en otros descienden, pero la tendencia global es claramente ascendente.

En este caso, los valores medios de los controles sanos son los más bajos.



Gráfica 7: Valores individuales medios de células secretoras de IFN- γ por millón de PBMCs cultivados sin ningún estímulo. Se representan en esta tabla los valores medios, teóricamente basales (sin estímulo), de los 17 voluntarios.

Como sucediera en la gráfica 5, los pacientes con sospecha de EC tienen unos niveles similares a los pacientes SGNC13, SGNC14 y SGNC16 a tiempo 14, y unos valores superiores sobre las personas sanas, las cuales tienen unos niveles de células secretoras de IFN- γ bastante bajos, a excepción del CS5. Sin embargo, esta vez los pacientes con SEC tienen unos valores más bajos que los enfermos celíacos en dieta sin gluten, los cuales tienen los valores más elevados de todos los grupos, tal y como se demuestra en la gráfica 6. Curiosamente, el paciente SEC44 que en la gráfica 5 tenía unos valores increíblemente altos, ahora tiene los niveles más bajos de su grupo.

En cuanto a los pacientes con sospecha de SGNC, como se podía ver en la gráfica 3, los pacientes SGNC12 y SGNC15 tienden a disminuir sus niveles después de la prueba de sobrecarga, llegando a ser muy similares a los de los controles sanos. Ocurre lo contrario con SGNC13, 14 y 16, donde los niveles de células secretoras de IFN- γ a tiempo 0 son bajos y a tiempo 14 ascienden. Como se indica en el párrafo anterior, los valores de estos 3 pacientes son similares a los de los pacientes sospechosos de EC, que también están en dieta con gluten. En el caso del paciente SGNC11, como ya se indicó en la gráfica 3, los niveles de células secretoras de IFN- γ permanecen muy bajos y virtualmente invariables.

4. Discusión

La dificultad que supone trabajar con personas se ve reflejada claramente en este trabajo, tanto por la variabilidad multifactorial que afecta a estas personas (genética, alimentación, estilo de vida, etc.) y a sus resultados, como por la dificultad de reclutar a estas personas al estudio. Las personas, a diferencia de los animales de experimentación o líneas celulares, no están siempre disponibles ni tampoco están siempre receptivas a someterse al estudio, incluso a una simple extracción de sangre. En otras tantas ocasiones, son otros factores los que impiden participar en el trabajo, como la disponibilidad laboral y de horario, o la falta de cumplimiento de los requisitos necesarios para este estudio, como llevar 1 año en dieta sin gluten estricta para ser incluido como control de enfermedad celiaca.

4.1 Pacientes con sospecha de sensibilidad al gluten no celiaca

La cuantificación de células secretoras de IFN- γ en pacientes con sospecha de SGNC mediante la técnica del ELISpot de IFN- γ ha resultado ser viable. No estaba clara la presencia de estas células en sangre periférica ya que no hay ningún estudio al respecto, además de que está muy aceptada en la comunidad científica la hipótesis de que la SGNC es una intolerancia dominada por respuestas innatas, no adaptativas como la EC, por lo que a ciencia cierta, no se puede determinar si estos PBMCs secretores de IFN- γ que circulan por la sangre periférica son en realidad LTEGs.

La utilización de una prueba de sobrecarga oral con gluten también ha resultado ser muy beneficiosa para estos resultados, permitiéndonos ver de forma directa la variación de la ingesta de gluten sobre los niveles de células secretoras de IFN- γ en la sangre periférica. Sin embargo, parece necesario llevar a cabo un gluten challenge de un tiempo superior, tal vez de 28 días, para observar en un rango de tiempo mucho mayor si las variaciones observadas en los pacientes con sospecha de SGNC se mantienen o son diferentes tras 2 semanas más en dieta con gluten. Al mismo tiempo, habría sido muy beneficioso disponer de personas con EC demostrada que se sometiesen también a esta sobrecarga con gluten, lo cual resulta altamente complicado, ya que al estar diagnosticadas, estas personas celiacas son muy temerosas ante la ingesta de gluten, teniendo en cuenta que, además, se les realizarían 2 biopsias intestinales, lo cual tampoco es de su agrado.

En cuanto a la aplicación de los estímulos 33-mer y PT-gliadina, además de mostrar unos resultados altamente similares en el mismo paciente, permiten comparar los diferentes grupos de manera muy equitativa, ya que, de este modo, los resultados de los todos los grupos están unidos frente a un mismo estímulo, mientras que el control negativo (sin estímulo) no representa las mismas condiciones en todos los grupos, aunque, esto a su vez aporta unos datos muy interesantes sobre la cuantificación de

células secretoras de IFN- γ en su estado “natural”, simplemente con el estímulo de una dieta con o sin gluten. Paradójicamente, se desconoce porque los resultados de 33-mer y PT-gliadina no son superiores a los de sin ningún estímulo, ya que se interpreta que estimulan más células además de las ya están activadas. Una posible respuesta podría ser que si de un millón de células (PBMCs) solo hay 50 secretoras de IFN- γ , la probabilidad de capturar estas células bastante baja, lo que produciría resultados un poco dispersos. Quizás lo mejor habría sido hacer el ensayo por duplicado o triplicado.

De forma resumida, las gráficas 1, 2 y 3 representan la variación del número de células secretoras de IFN- γ en sangre periférica de pacientes con sospecha de SGNC antes durante y después de la prueba de sobrecarga con gluten. Prestando atención a la variación desde el tiempo 0 (dieta sin gluten) hasta el tiempo 14 (dieta con gluten) podemos observar como hay 2 claras tendencias, una con unos niveles de células secretoras de IFN- γ muy bajos a tiempo 0 pero que ascienden mucho en el tiempo 14, como en los pacientes SGNC13, SGNC14 y SGNC16; y otra con unos valores notablemente altos a tiempo 0 y que disminuyen a tiempo 14, como es el caso para los pacientes SGNC12 y SGNC15. Destaca, por tanto, como pacientes que se presuponen intolerantes al gluten, al someterse a una prueba de sobrecarga oral, sus niveles descienden, claro que, también puede ser que estos resultados sean los de un verdadero paciente con SGNC. Con un grupo de pacientes más amplio y una sobrecarga de mayor duración se podría confirmar si estas 2 claras tendencias se mantienen. En el caso del paciente SGNC11, sus niveles son tan bajos e invariables frente a la prueba de sobrecarga, que todo parece indicar que su posible patología no está mediada por células secretoras de IFN- γ . Paralelamente, el hecho de que aparezcan 2 respuestas diferentes en pacientes con sospecha de SGNC tras 14 días de gluten challenge indica que esta duración es más efectiva que una prueba de sobrecarga de solo 3 días con solo un análisis de sangre en el día 0 y en el día 6.

En las gráficas 1, 2 y 3 destaca también la tendencia de los valores de SGNC13, SGNC14 y SGNC15 a tiempo 7, los cuales son notablemente más elevados que los otros 3 pacientes con sospecha de SGNC, pero se desconoce el motivo real de esta diferencia, lo que está claro, es que también es un resultado muy llamativo que podría tener una gran significación en futuros ensayos con pacientes con sospecha de SGNC.

Para comparar a los pacientes con SGNC en dieta sin gluten (tiempo 0) y en dieta con gluten (tiempo 14) frente a los controles celíacos en dieta sin gluten y los controles sanos en dieta con gluten, además de con los pacientes con sospecha de EC en dieta con gluten, tenemos que fijarnos en las gráficas individuales (gráficas 5 y 7), ya que, como se ha demostrado en el párrafo anterior, entre los pacientes con sospecha de SGNC se encuentran 2 tendencias opuestas cuando se comparan los tiempo 0 y 14.

Los pacientes con una tendencia ascendente (SGNC13, SGNC14 y SGNC16) tienen valores ante el estímulo 33-mer (gráfica 5) en una dieta sin gluten más bajos incluso que los controles sanos. Ante una dieta con gluten (tiempo 14), estos 3 pacientes presentan unos valores superiores a los controles sanos, y similares a los enfermos celíacos y a los pacientes con sospecha de EC.

El análisis de los niveles de células secretoras de IFN- γ en pacientes con sospecha de SGNC sin ningún estímulo (gráfica 7) muestra de nuevo unos niveles más bajos que el resto de grupos mientras están en dieta sin gluten. Ante una dieta con gluten (tiempo 14) de nuevo superan los niveles de los controles sanos y son similares a los pacientes con sospecha de EC, aunque, esta vez, los niveles de los enfermos celíacos son superiores.

Dicho esto, resulta curioso determinar que los pacientes con sospecha de padecer SGNC tienen unos niveles de células secretoras de IFN- γ en sangre periférica cuando se encuentran en dieta sin gluten más bajos incluso que las personas sanas, y, sin embargo, los niveles en una dieta con gluten no son lo suficientemente similares a los EC como para clasificarlos como tal. De nuevo, el hecho de tener un número tan bajo de controles celíacos dificulta el poder dar una conclusión definitiva.

En los pacientes con una tendencia descendente del tiempo 0 al tiempo 14, como son SGNC12 y SGNC15, los datos del número de células secretoras de IFN- γ frente al estímulo del péptido 33-mer (gráfica 5) en el tiempo 0 (dieta sin gluten) son superiores o al menos similares a los controles celíacos, pero menores que los niveles de enfermos celíacos y pacientes con sospecha de EC. Ante una dieta con gluten, estos valores descienden por debajo de los valores de las personas sanas. Esta tendencia es la misma pero con los tiempos al revés en los pacientes SGNC13, SGNC14 y SGNC16. No se dispone del dato del SGNC12 a tiempo 0 ante el 33-mer, pero se puede aceptar que es muy aproximado al que tiene a tiempo 0 sin estímulo.

Cuando no aporta ningún estímulo en el ELISpot (gráfica 7), a tiempo 0 los niveles de los pacientes SGNC12 y SGNC15 son superiores a los controles sanos, similares a los pacientes con sospecha de EC pero mucho más bajos que los enfermos celíacos. Ante una dieta con gluten (tiempo 14) los pacientes SGNC12 y SGNC15, tienen unos valores inferiores a los enfermos celíacos y los pacientes con sospecha de EC, y unos niveles similares o incluso inferiores a los controles celíacos.

4.2 *Pacientes con sospecha de enfermedad celiaca*

No hemos de olvidar que los pacientes con sospecha de EC son pacientes al diagnóstico y, por tanto, mantienen una dieta con gluten.

Los pacientes con sospecha de EC siempre tienen unos valores más elevados que los controles sanos en términos medios (gráficas 4 y 6) y, en la mayoría de los casos, también en términos individuales (gráficas 5 y 7), lo cual indica que los niveles de los 4 pacientes con sospecha de EC difieren de los valores “normales” o sanos. Es cierto que el valor tan increíblemente alto de SEC44 sesga la media de la gráfica 4, pero si se excluyese ese valor, la media seguiría siendo notablemente superior a la del resto de grupos (77 células/millón cuando el resto de grupos oscila en un rango de [19-46]).

En cuanto a los valores de los controles celíacos, los pacientes con sospecha de EC tienen unos valores superiores pero similares ante el estímulo del 33-mer (gráfica 5), pero son bastante más bajos cuando no hay estímulo (gráfica 7). Esta variabilidad de resultados impide poder dar un resultado concluyente para el apoyo o rechazo del diagnóstico de estos pacientes como enfermos celíacos. Si se certificara una exclusión tanto del grupo de celíacos como de personas sanas, probablemente estaríamos ante un caso de otra patología asociada al consumo de gluten, por lo que la cuantificación de los niveles de células secretoras de IFN- γ serviría como método de apoyo diagnóstico a la EC o a otra patología asociada al consumo de gluten. Para ello, se precisan trabajos que analicen la respuesta celular de grupos con diferentes patologías ante una dieta con y sin gluten.

Está claro que tener niveles superiores de células secretoras de IFN- γ en sangre periférica frente a las personas sanas es un dato muy importante y destacable, pero el hecho de que haya tan pocos celíacos como control dificulta el poder dar un resultado más significativo, ya que, al ser tan baja la muestra de controles, la variabilidad de cada persona ejerce un efecto mayor en el resultado, como se observa claramente con el EC8 cuyos niveles ante el 33-mer son bajísimos. También debería haber un número de controles celíacos mayor. Además, tratándose de personas con sospecha de padecer la enfermedad celiaca, deberían compararse también con enfermos celíacos en dieta con gluten, pero como indicaba anteriormente, es verdaderamente complicado conseguir voluntarios celíacos que accedan a someterse a una sobrecarga con gluten durante 14 días.

5. Conclusión

Se ha demostrado que es viable la cuantificación mediante la técnica del ELISpot de células secretoras de IFN- γ procedentes de sangre periférica de pacientes con sospecha de SGNC sometidos a una prueba de sobrecarga oral con gluten.

De igual modo, se han encontrado 4 tendencias claramente diferentes en los niveles de células secretoras de IFN- γ en pacientes con sospecha de SGNC ante una prueba de sobrecarga oral con gluten de 14 días.

Ante un posible apoyo al diagnóstico de pacientes con sospecha de EC, los niveles notablemente superiores de células secretoras de IFN- γ permiten excluirlos como pacientes sanos, pero no se puede concluir que sean celíacos debido al número tan bajo de controles celíacos de los que se dispone.

Sorprende el dato de que, en algún momento, ya sea antes o después de la prueba de sobrecarga, todos los pacientes con sospecha de SGNC poseen niveles de células secretoras de IFN- γ más bajos incluso que los controles sanos.

6. Bibliografía

- [1]-***Introducción al conocimiento actual de la enfermedad celiaca***. Editado por Eduardo Arranz y José Antonio Garrote. Editorial Ergon. 2º Edición. 2011. ISBN: 978-84-8473-958-6.
- [2]- Nilsen E M, Lundin K E, Krajci P, Scott H, Sollid L M, Brandtzaeg P. **Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma**. *Gut* 1995; 37:766-776 doi:10.1136/gut.37.6.766.
- [3]- Al-Dawoud A, Nakshabendi I, Foulis A, McI Mowat A. **Immunohistochemical analysis of mucosal gamma-interferon production in coeliac disease**. *Gut* 1992; 33:1482-1486.
- [4]- Ontiveros N, Tye-Din JA, Hardy MY, Anderson RP. **Ex vivo whole blood secretion of interferon IFN- γ and IFN- γ -inducible protein 10 measured by enzyme-linked immunosorbent assay are as sensitive as IFN- γ enzyme linked immunospot for the detection of gluten-reactive T cells in human leucocyte antigen (HLA)-DQ2.5(+)-associated coeliac disease**. *Clin Exp Immunol*. 2014 Feb; 175(2):305-15. doi: 10.1111/cei.12232.
- [5]-Anderson RP, van Heel DA, Tye-Din JA, Barnardo M, Salio M, Jewell DP, Hill AV. **T cells in peripheral blood after gluten challenge in coeliac disease**. *Gut*. 2005 Sep; 54(9):1217-23.
- [6]-Cornell HJ, Skerritt JH, Puy R, Javadpour M. **Studies of in vitro gamma-interferon production in coeliac disease as a response to gliadin peptides**. *Biochim Biophys Acta*. 1994 May 25; 1226(2):126-30.
- [7]-Bendix U, Lentz S, Rothschild M, Lehmann I, Osman AA, Mothes T. **Effect of gamma-interferon on binding of gliadin and other food peptides to the human intestinal cell line HT-29**. *Clin Chim Acta* 1997; 261:69e80.
- [8]-Bolte G, Seilmeier W, Wieser H, Holm K, Beuermann K, Newport B, Stern M. **Enhanced peptide-binding capacities of small intestinal brush border membranes in coeliac disease**. *Pediatr Res* 1999; 46:666e70.
- [9]-Arranz E, Montalvillo E, Garrote JA. ***Inmunopatogenia de la enfermedad celiaca***. En Rodrigo L y Pena AS, editores. *Enfermedad celiaca y sensibilidad al gluten no celiaca*. Barcelona, España: OmniaScience; 2012. p. 123-149.
- [10]-Husby S, Murray J. **Non-coeliac gluten hypersensitivity: What is all the fuss about?** *F1000Prime Rep*. 2015 May 12;7:54. doi: 10.12703/P7-54.

- [11]Brottveit M, Beitnes AC, Tollefsen S, Bratlie JE, Jahnsen FL, Johansen FE, Sollid LM, Lundin KE. **Mucosal cytokine response after short-term gluten challenge in celiac disease and non-celiac gluten sensitivity.** *Am J Gastroenterol.* 2013 May;108(5):842-50. doi: 10.1038/ajg.2013.91. Epub 2013 Apr 16.
- [12]-Raki M, Fallang LE, Brottveit M, Bergseng E, Quarsten H, Lundin KE & Sollid LM. **Tetramer visualization of gut-homing gluten-specific T cells in the peripheral blood of celiac disease patients.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:2831–6.
- [13]- Al-Dawoud A, Nakshabendi I, Foulis A, Mowat AM. **Immunohistochemical analysis of mucosal gamma interferon production in coeliac disease** *Gut* 1992; 33:1482-1486.
- [14]- Nilsen EM, Jahnsen FL, Lundin KE, Johansen FE, Fausa O, Sollid LM, Jahnsen J, Scott H, Brandtzaeg P. **Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease.***Gastroenterology* 1998 Sep; 115(3):551-63.
- [15]- Faresjö, Maria. **Enzyme Linked Immuno-Spot; a Useful Tool in the Search for Elusive Immune Markers in Common Pediatric Immunological Diseases.** *Review. Cells* 2012, 1(2), 141-152; doi:10.3390/cells1020141.
- [16]-Hansson T, Dannæus A & Klareskog L. **Cytokine-producing cells in peripheral blood of children with coeliac disease secrete cytokines with a type 1 profile.** *Clin Exp Immunol* 1999; 116:246–250.
- [17]-Camarca A, Radano G, Di Mase R, Terrone G, Maurano F, Auricchio S, Troncone R, Greco L, Gianfrani C. **Short wheat challenge is a reproducible in-vivo assay to detect immune response to gluten.** *Clin Exp Immunol.* 2012 Aug; 169(2):129-36. doi: 10.1111/j.1365-2249.2012.04597.x.
- [18]-Brottveit M, Ráki M, Bergseng E, Fallang LE, Simonsen B, Løvik A, Larsen S, Løberg EM, Jahnsen FL, Sollid LM, Lundin KE. **Assessing possible celiac disease by an HLA-DQ2-gliadin Tetramer Test.** *Am J Gastroenterol.* 2011 Jul; 106(7):1318-24. doi: 10.1038/ajg.2011.23.
- [19]- Anderson RP, van Heel DA, Tye-Din JA, Jewell DP, Hill AVS. **Antagonists and non-toxic variants of the dominant wheat gliadin T cell epitope in coeliac disease.** *Gut* 2006;55:485–491. doi: 10.1136/gut.2005.064550.
- [20]-Tanner GJ, Howitt CA, Forrester RI, Campbell PM, Tye-Din JA, Anderson RP. **Dissecting the T-cell response to hordeins in coeliac disease can develop barley with reduced immunotoxicity.** *Aliment Pharmacol Ther.* 2010 Nov; 32(9):1184-91. doi: 10.1111/j.1365-2036.2010.04452.x.
- [21]-Munish Ashat & Rakesh Kochhar. **Non-celiac gluten hypersensitivity.** *Trop Gastroenterol* 2014 Apr-Jun; 35(2):71-8.

[22]-Montoro M, Dominguez Cajal M. **Enfermedad celíaca en el adulto**. En Rodrigo L y Peña AS, editores. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. Barcelona, España: OmniaScience; 2013. p. 233-284.

[23]-Peña AS, Rodrigo L. **Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca**. En Rodrigo L y Peña. AS, editores. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. Barcelona, España: OmniaScience; 2013. p. 25-43

[24]-Bernardo D, Garrote JA, Nadal I, León AJ, Calvo C, Fernández-Salazar L, Blanco-Quirós A, Sanz Y, Arranz E. **Is it true that coeliacs do not digest gliadin? Degradation pattern of gliadin in coeliac disease small intestinal mucosa**. Gut. 2009 Jun;58(6):886-7. doi: 10.1136/gut.2008.167296.

[25]-Biesiekierski JR, Peters SL, Newnham ED, Rosella O, Muir JG, Gibson PR: **No effects of gluten in patients with self-reported non-celiac gluten sensitivity after dietary reduction of fermentable, poorly absorbed, short-chain carbohydrates**. Gastroenterology 2013, 145:320-8.e1-3.

