

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

-FACULTAD DE MEDICINA-



ESTUDIO DE NUEVOS MARCADORES DE INFLAMACIÓN EN ENFERMEDADES DEL INTESTINO

Trabajo realizado por la alumna RAQUEL OLMOS JUSTE
Tutor: Dr. EDUARDO ARRANZ SANZ

INDICE:

- Glosario de términos:	4
- Introducción	5
1. Fisiopatología de la enfermedad celiaca.....	5
2. Diagnóstico de la enfermedad celiaca.....	6
2.1. Manifestaciones clínicas.....	6
2.2. Marcadores genéticos.....	7
2.3. Marcadores serológicos.....	8
2.4. Estudio histopatológico de la biopsia.....	9
2.5. Respuesta a la dieta sin gluten.....	10
3. Nuevos marcadores de inflamación intestinal.....	10
3.1. La molécula FABP2.....	10
3.2. La quemoquina CXCL10.....	11
3.3. La citocina IFN- γ	12
3.4. Recuento de linfocitos intraepiteliales.....	12
4. Hipótesis de trabajo.....	13
5. Objetivos.....	13
- Material y métodos	13
1. Selección de pacientes.....	13
2. Biopsia duodenal y linfograma.....	14
3. Técnica ELISpot.....	15
4. Técnica ELISA.....	17
4.1. Test ELISA FABP2.....	17
4.2. Test ELISA CXCL10.....	18
5. Análisis estadístico.....	18
- Resultados	19
1. Los niveles de FABP2 aumentaron en pacientes con EC no tratados respecto a los controles.....	19
2. Los niveles de CXCL10 fueron mayores en el suero de pacientes con EC en actividad que en voluntarios sanos.....	22
3. Existe una correlación entre FABP2 y el riesgo genético asociado a la EC en pacientes con ingesta de gluten.....	23
- Discusión	24
- Conclusiones	27
- Bibliografía	28
- Anexo	30

- GLOSARIO DE TÉRMINOS:

EC: Enfermedad celíaca
DSG: Dieta sin gluten
IgA: Inmunoglobulina A
MALT: Tejido linfoide asociado a mucosas
CD: Células dendríticas
TG2: Enzima transglutaminasa tisular 2
LIE: Linfocitos intraepiliales
TCR: T- cell receptor
NK: Natural killer
MHC: Major histocompatibility complex (Complejo mayor de histocompatibilidad)
HLA: Human leukocyte antigen (antígenos leucocitarios humanos)
AAG: Anticuerpo anti-gliadina
AAE: Anticuerpo anti-endomisio
AATG2: Anticuerpo anti-transglutaminasa tisular 2
FABP2 o I-FABP: Fatty acid binding protein 2 o Intestinal fatty acid binding protein.
IFN- γ : Interferón gamma
LPS: Lipopolisacárido
SGNC: Sensibilidad al gluten no celíaca
ELISpot: Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay
EII: Enfermedad inflamatoria intestinal
RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium
DTT: Ditioneitol
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
FACS: Fluorescence-activated cell sorting
FBS: Fetal bovine serum
PBS: Tampón fosfato salino
TA: Temperatura ambiente
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
TBM: 3,3',5,5'- Tetrametilbenzidina
ROC: Receiver Operating Characteristic
AUC: Area under curve (área bajo la curva)
PT-gli: Péptido gliadina

- INTRODUCCIÓN:

La enfermedad celiaca (EC) se define como un proceso autoinmune multisistémico debido a una pérdida de tolerancia frente a proteínas de la dieta como al gluten de cereales. Las proteínas que causan esta enfermedad reciben el nombre de prolaminas y están presentes en el trigo (gliadinas), cebada (hordeínas), centeno (secalinas) y avena (aveínas). El único tratamiento que actualmente existe se basa en realizar una dieta libre de gluten (DSG), que da lugar a la desaparición de los síntomas y a la recuperación y normalización de la mucosa intestinal (1).

La enfermedad puede presentarse tanto en niños como en adultos y afecta algo más a mujeres con una de 2:1 (2). Los individuos que sufren EC tienen una predisposición genética, pero también influyen otros factores de riesgo como una dieta muy abundante en gluten, la ausencia de lactancia materna, los cambios en la microbiota intestinal (1) y se asocia con ciertas patologías autoinmunes como diabetes tipo I, déficit severo de IgA, lupus o psoriasis, además de otras enfermedades neurológicas o genéticas (2).

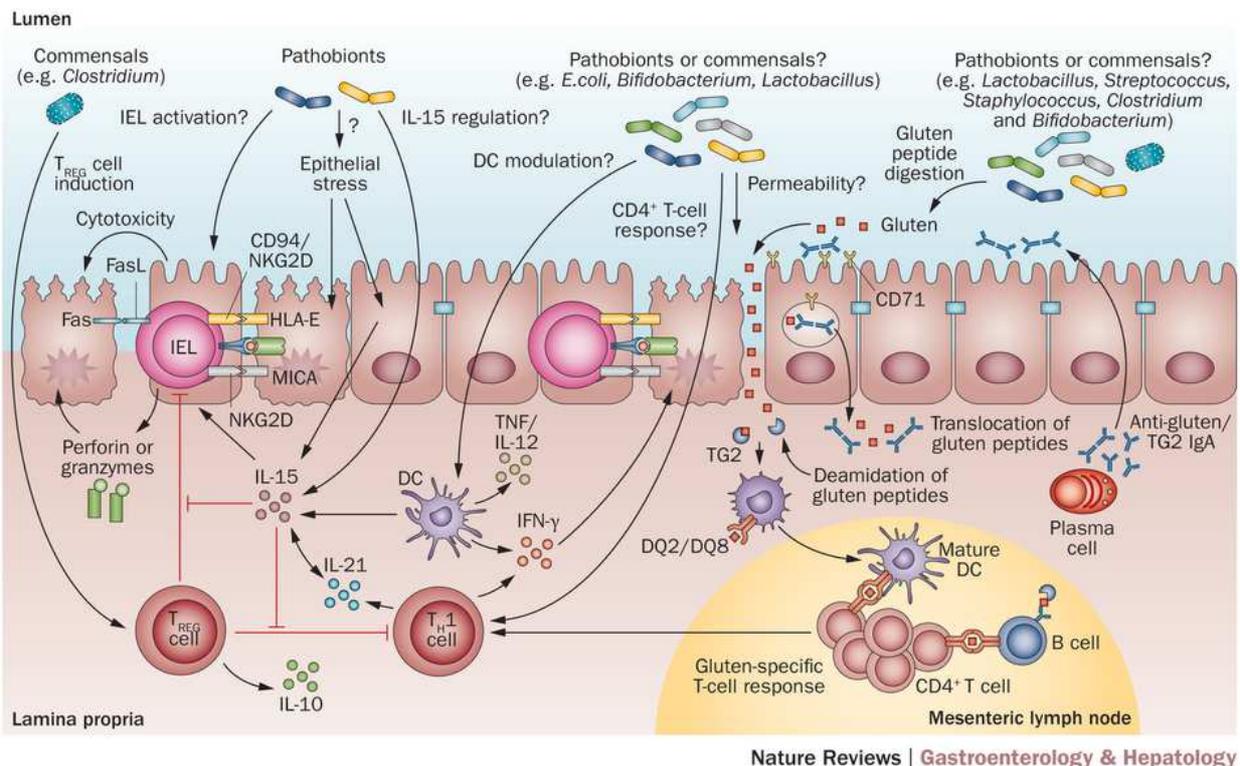
1. Fisiopatología de la enfermedad celiaca:

El tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) del intestino es capaz de distinguir entre antígenos dañinos y beneficiosos procedentes de la dieta y de la microbiota intestinal. El mantenimiento de una respuesta tolerogénica de las células T hacia antígenos de la dieta es conocida como tolerancia oral. En condiciones normales, en ausencia de infección o inflamación, la tolerancia oral se mantiene gracias a la presencia de la citocina TGF- β secretado por las células dendríticas (CD), dependiente de la presencia de ácido retinoico. Estas condiciones llevan a la diferenciación de las células T hacia células T reguladoras que controlan la polarización hacia fenotipos pro-inflamatorios (7).

Los péptidos del gluten atraviesan la barrera epitelial por mecanismos transcelulares o paracelulares y son deaminados por el enzima transglutaminasa tisular (TG2) en la lámina propia. Los péptidos de gliadina deaminados son captados por las CD induciendo una respuesta pro-inflamatoria tipo Th1 de los linfocitos T vírgenes presentes en la lámina propia, caracterizada por la producción de IFN- γ e IL-21. También ocurre la producción de anticuerpos anti-gliadina y anti-tG2 por las células plasmáticas en los individuos genéticamente predispuestos. El aumento del estrés celular de las células epiteliales puede inducir la producción de IL-15, y como consecuencia la activación y proliferación de los linfocitos intraepiteliales (LIE). Estos LIE pueden destruir por mecanismos de citotoxicidad a las células del epitelio causando daño en la barrera epitelial intestinal. Además, la IL-15 inhibe los efectos reguladores de las células Tregs e induce la formación de CD pro-inflamatorias. Los microorganismos presentes en el intestino (tanto comensales como patógenos) influyen también en el desarrollo de la EC favoreciendo un ambiente pro-inflamatorio (8).

La pérdida de la función de la barrera epitelial y la atrofia de las vellosidades intestinales características de la EC son mediadas por señales de citocinas y quemoquinas junto con la presencia de un número aberrante de linfocitos intraepiteliales (LIE). Estos linfocitos intraepiteliales constituyen una población muy heterogénea compuesta por linfocitos TCR $\alpha\beta$ +, CD8+ pero también TCR $\gamma\delta$ + y NK-Like. En un intestino sano, los LIE expresan receptores inhibitorios, producen citocinas anti-inflamatorias (IL-10, TGF- β) y factor de crecimiento de queratinocitos, lo que ayuda a mantener la homeostasis y la reparación del tejido epitelial (24). Por otro lado en la EC los LIE expresan receptores NK mediando así la destrucción del epitelio. La IL-15 secretada por las células epiteliales y las CD de la lámina propia está involucrada en la regulación y activación de los linfocitos intraepiteliales CD8+

haciendo que dichas células contribuyan también a la destrucción de la barrera epitelial mediante FasL. Además dicha IL-15 es capaz de aumentar la expresión de ciertos ligandos de superficie de las células epiteliales, incluido moléculas MHC de clase I y Fas, que también intervienen en la regulación y activación de los LIE CD8+, promoviendo la secreción de citocinas pro-inflamatorias y como consecuencia la citólisis de las células del epitelio intestinal. La activación de estos linfocitos CD8+ también está mediado por citocinas como IL-21 e IFN- γ provenientes de la activación de linfocitos TCD4+ por péptidos del gluten en la lámina propia de la mucosa. Cuando hay altos niveles de IL-15, el ácido retinoico promueve la diferenciación hacia respuestas pro-inflamatorias contra el gluten en vez de mantener la tolerancia oral (7,24).



Nature Reviews | Gastroenterology & Hepatology

Figura 1: Esquema general de la fisiopatología de la EC en el intestino delgado (ver texto).

2. Diagnóstico de la enfermedad celíaca:

Se estima que un alto porcentaje de pacientes con EC están aun por diagnosticar. En el pasado se creía que la EC era una enfermedad con una sintomatología clara y cerrada, por lo que se utilizaban para el diagnóstico métodos inespecíficos estudiando las funciones digestivas y de absorción del intestino delgado (10). En la actualidad, para un buen diagnóstico de la EC se emplean hasta cuatro herramientas: la sospecha clínica fundada, predisposición genética a la enfermedad, cuantificación de los anticuerpos séricos presentes en el suero, el estudio histopatológico de la biopsia duodenal y por último la respuesta a la DSG (9). Estas herramientas se basan en la detección de ciertos marcadores serológicos, histológicos y genéticos característicos de los enfermos celíacos.

2.1. Manifestaciones clínicas.

El cuadro sintomático de los pacientes con EC es muy variado, dependiendo de la edad del paciente y de la fase de la enfermedad, pero los más comunes son diarrea, vómitos, falta de apetito, anemia ferropénica o incluso estreñimiento, aunque también hay formas de la enfermedad que son asintomáticas conocidas como formas silentes

(1). Otros pacientes sobre todo niños, pueden presentar ciertos síntomas diferentes a los citados anteriormente como dolor abdominal de tipo cólico. A veces también pueden presentarse manifestaciones cutáneas como la dermatitis herpetiforme, característica en adolescentes y adultos jóvenes (9). Para realizar el diagnóstico, los pacientes pueden dividirse en dos grupos: los que presentan síntomas y los asintomáticos o pertenecientes a grupos de riesgo (9).

En los últimos años se han identificado pacientes que manifiestan unos síntomas similares a los de la EC; sin embargo, las pruebas diagnósticas serológicas, genéticas y el estudio histopatológico de las biopsias son negativas o ligeramente alteradas. Al someterlos a una dieta sin gluten (DSG) presentan una gran mejoría. Esta entidad ha recibido el nombre de “sensibilidad al gluten no celiaca” y podría afectar alrededor del 8 al 12% de la población (6).

2.2. Marcadores genéticos:

El sistema HLA (*human leukocyte antigen*) está codificado por un conjunto de genes situados en el brazo corto del cromosoma 6. Estos genes codifican para las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) implicadas en la presentación de antígeno a los linfocitos T, teniendo un papel muy importante en la regulación de la respuesta inmune celular y humoral del organismo. Las personas que padecen EC poseen en la superficie de sus células presentadoras de antígeno fundamentalmente moléculas del sistema HLA de clase II DQ2 y/o DQ8. La molécula DQ2 se encuentra presente en el 90% de los pacientes con EC y está codificada por los alelos DQA1*0501 y DQB1*0201 para las cadenas alfa y beta del heterodímero respectivamente. Se ha observado también que un 20-30% de la población general que no padece EC es portadora de estos alelos. Los enfermos que no tienen DQ2 son portadores de la molécula DQ8, codificada por los alelos DQA1*0301 y DQB1*0302 (3). Por lo tanto las personas que son portadoras de alguno de estos perfiles genéticos (Tabla 1) son más susceptibles a desarrollar la EC, ya que los péptidos de gluten modificados por la TG2 tienen mayor afinidad por estas moléculas induciendo una respuesta pro-inflamatoria. Dado que la EC es una enfermedad multigénica, la presencia de HLA-DQ2/DQ8 es una condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la patología y otros genes HLA o no HLA podrían contribuir a la susceptibilidad (9).

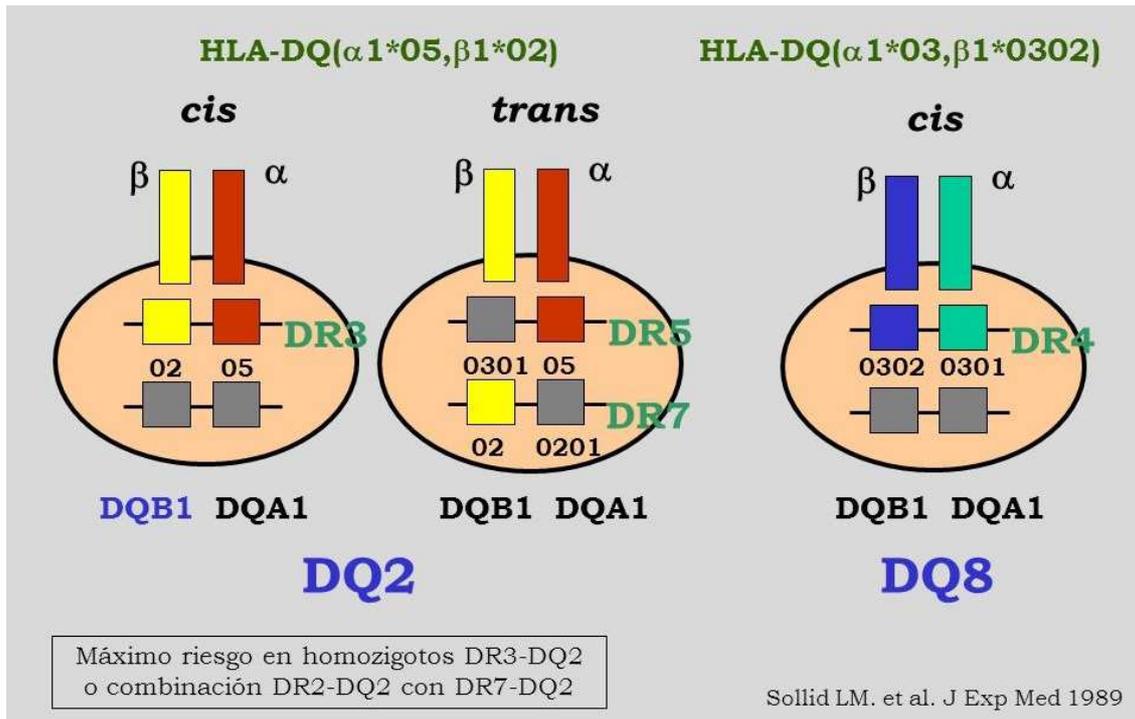


Figura 2: El mayor riesgo corresponde a los individuos portadores del heterodímero DQ2.5 codificado en cis por el haplotipo DR3-DQ2 (individuos homocigotos) y en trans por DR5-DQ7 o por DR7-DQ2 (individuos heterocigotos).

Haplotipos	DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 (DQ2.5)	DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 (DQ2.2)	DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0505 (DQ7.5)	DRB1*04-DQB1*302-DQA1*03 (DQ8)	Otros
DRB1*03-DQB1*0201-DQA1*0501 (DQ2.5)	Muy alto	Muy alto	Alto	Muy alto	Alto
DRB1*07-DQB1*0202-DQA1*0201 (DQ2.2)		Alto	Alto	Alto	Moderado
DRB1*11-DQB1*0301-DQA1*0505 (DQ7.5)				Moderado	Bajo
DRB1*04-DQB1*302-DQA1*03 (DQ8)				Alto	Moderado
Otros					Sin riesgo

Tabla 1: Riesgos genéticos atribuidos a las distintas combinaciones de haplotipos (4).

2.3. Marcadores serológicos de la enfermedad celiaca:

En el suero de los pacientes con EC se han encontrado algunos marcadores específicos característicos de la enfermedad, normalmente utilizados como herramientas de apoyo diagnóstico. Por marcadores serológicos de la EC se engloba a los anticuerpos anti-gliadina deaminada (AAG) de clase IgA e IgG y los anticuerpo anti-endomisio (AAE) de clase IgA, dirigidos contra una sustancia intermifibrilar del músculo liso (11). En la actualidad los más utilizados son sobre todo los anticuerpos antitransglutaminasa tisular tipo 2 (AATG2). La prueba basada en la cuantificación de estos anticuerpos tiene unos valores de sensibilidad y especificidad importantes, por lo que su detección tiene un alto valor predictivo de la EC (9).

En estudios recientes (23), se ha evaluado la posible utilización de estos anticuerpos como marcadores para el seguimiento del tratamiento con DSG, concluyendo que dichos anticuerpos no son efectivos, ya que solo aparecen cuando hay lesión de la mucosa. Después de un tiempo en tratamiento no se ha encontrado una relación entre los anticuerpos con la recuperación histológica de la mucosa (23). Por este y otros motivos, se están estudiando nuevos marcadores serológicos que puedan relacionarse con la inflamación intestinal de la EC como el FABP2 (*fatty acid binding protein 2*) CXCL10 o IFN- γ , de los cuales hablaremos más adelante.

2.4. Estudio histopatológico de la enfermedad celiaca:

Es importante conocer las lesiones de la mucosa intestinal características de los pacientes con EC y su evolución en el tiempo. Para el análisis histopatológico de estas lesiones se deben tomar muestras del tejido de la mucosa realizando una biopsia duodenal al paciente. Debido a que dicha lesión en la mucosa puede estar parcheada es recomendable obtener muestras de cinco partes del duodeno: una de ellas del bulbo y otras cuatro de entre la 2^o y la 3^o posición duodenal. La obtención de estas muestras se realiza mediante una gastroscopia. El informe anatomopatológico debe basarse en la clasificación de Marsh (figura 3) que establece varios grados de lesión: normal (estadio 0); infiltrativo (estadio 1) cuando hay aumento en el porcentaje de LIE superior al 30%; hiperplasia (estadio 2) cuando aumenta la longitud de las criptas y se observa un infiltrado inflamatorio de la submucosa. En estos tres primeros casos la morfología de las vellosidades es normal. En el estadio 3 ya se aprecia atrofia de las vellosidades, que puede ser atrofia parcial (3^a), atrofia subtotal (3^b) y atrofia total (3^c) (9, 12). Lesiones histológicas de la mucosa pueden aparecer también en otras enfermedades intestinales.

Esta técnica representa una herramienta diagnóstica y de seguimiento de la EC muy importante, pero en ciertos casos no es necesaria ya que se puede realizar un diagnóstico certero en base a la detección de otros marcadores relacionados con la enfermedad (AATG2), especialmente en niños.

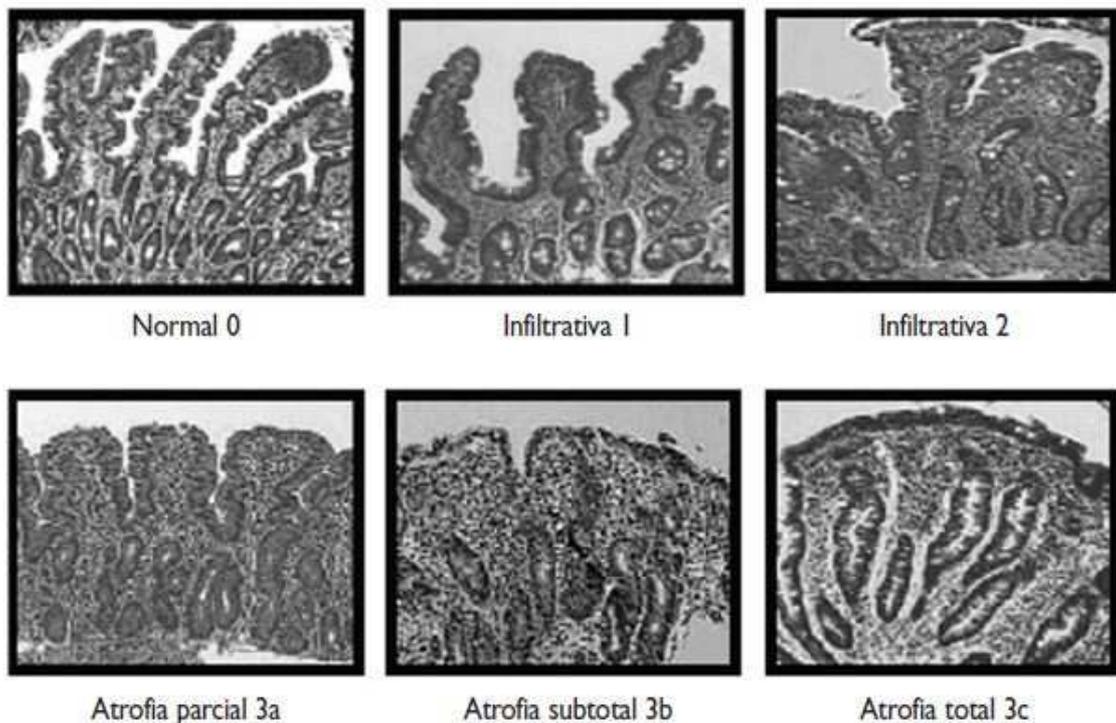


Figura 3: Grados de lesión de la mucosa en EC. (Imagen tomada de la Referencia 2).

2.5. Respuesta a la dieta sin gluten:

El tratamiento para la EC consiste en una dieta sin gluten. Esta dieta consiste en eliminar completamente los alimentos que contienen trigo, cebada, centeno o avena. También los productos lácteos deben suprimirse en los pacientes en actividad al principio de la dieta, reintroduciéndolos poco a poco. Para llevar a cabo correctamente el tratamiento se debe seguir un protocolo muy estricto para evitar la contaminación cruzada con trazas de gluten procedente de otros alimentos o utensilios de cocina.

La mayoría de los pacientes en tratamiento presenta una rápida mejoría al principio del mismo, dentro de las primeras 48 horas hasta en el 40% de los casos. Sin embargo, en algunos pacientes la respuesta no es tan precoz y la recuperación de la mucosa comienza a ser visible al cabo de 2 a 4 meses (12). Esta recuperación se considera como factor de confirmación del diagnóstico de la EC.

3. Nuevos marcadores de inflamación intestinal.

Hoy en día, la biopsia intestinal todavía es un procedimiento muy común para el diagnóstico de la EC. Sin embargo, debido a su complejidad, coste y a que es una técnica muy invasiva, se han estudiado otros métodos de ayuda diagnóstica basados en la detección de marcadores específicos de la enfermedad. Para ello, se deben conocer y valorar las distintas moléculas y células que intervienen en la patogenia y su posible utilidad para el diagnóstico de la enfermedad en distintas situaciones o en pacientes con manifestaciones clínicas. Estos marcadores también podrían ser de utilidad para el seguimiento de aquellos pacientes que se encuentran en tratamiento con DSG.

Los marcadores serológicos más conocidos de la EC, como se ha mencionado previamente, son los autoanticuerpos frente a la gliadina desaminada, el endomisio y la transglutaminasa tipo 2. Estos marcadores no aparecen en todos los momentos de la enfermedad ni en todos los pacientes, por lo que no se les puede considerar un método de diagnóstico definitivo ya que se necesita del resto de pruebas para confirmar sus resultados (17,18). En este trabajo se pretende valorar la utilidad de otros marcadores de inflamación intestinal como la molécula I-FABP o la quemoquina CXCL10, y su posible papel dentro de la EC.

3.1. La molécula I-FABP:

Los ácidos grasos son moléculas clave debido a las importantes funciones que cumplen en el organismo, como es el almacenamiento de energía en forma de triacilglicerol. También forman parte de moléculas complejas como los fosfolípidos o el colesterol, cuya función estructural es muy importante para la célula. Estos nutrientes esenciales son obtenidos de la dieta, liberados por los adipocitos o sintetizados a partir de glucosa en el hígado. Su transporte a través del organismo se establece gracias a asociaciones de estos ácidos grasos con moléculas como la albúmina, lipoproteínas o las llamadas FABPs (*fatty acid-binding proteins*) (14). Las FABPs son una familia de pequeñas proteínas citosólicas (14-15KDa) con 9 isoformas distintas expresadas en diferentes tejidos, en los cuales se pueden encontrar más de un tipo de estas proteínas. Algunos estudios (15,17) han observado que las I-FABPs (intestinal) y las L-FABPs (liver) facilitan la absorción de lípidos desde la luz intestinal al interior de los enterocitos que forman la barrera epitelial del intestino, por lo que la expresión de estas moléculas en las células epiteliales es muy elevada, y de forma constitutiva en un intestino sano.

En el transcurso de la EC, los cambios histológicos en la mucosa duodenal progresan desde un aumento en los LIE hasta la hiperplasia de las criptas y finalmente la pérdida de las vellosidades. Esta atrofia de las vellosidades es resultado de la apoptosis de los enterocitos de la barrera epitelial del intestino. Debido a la pérdida de la barrera epitelial, las moléculas I-FABP y L-FABP contenidas en los enterocitos son

liberadas al torrente sanguíneo, y como consecuencia de ello, se pueden observar altos niveles de estas proteínas en el suero de pacientes con EC antes del tratamiento, comparándolos con los niveles en individuos sanos (15,17). Se sabe que I-FABP es un mejor marcador del daño intestinal comparado con L-FABP ya que este último es expresado también en otros tejidos como hígado o riñón, mientras que I-FABP es exclusivo del epitelio intestinal (15).

En un estudio llevado a cabo por un grupo de investigadores holandeses (21) se evaluaron los niveles del marcador I-FABP en diferentes partes del aparato digestivo de individuos sanos, observándose que la concentración de este marcador varía a lo largo del intestino delgado, siendo su máxima expresión en el yeyuno y algo más baja en el íleon y duodeno (21), mientras que la expresión era mínima lo largo de todo el colon. En una visión microscópica de la mucosa, se ha localizado el marcador I-FABP en el citoplasma de los enterocitos maduros y las células de goblet presentes en la parte superior de las vellosidades, mientras que en las células de la parte interior de las criptas no se confirmó expresión de este marcador. La presencia de I-FABP en la parte alta de las vellosidades, que es la parte de la mucosa que primero se destruye en la EC, hace que su detección pueda ser un indicio de la patología en sus estadios iniciales (19,21).

Se han publicado varios trabajos en los que se estudian los niveles de este marcador en muestras de suero de pacientes con EC, en DSG y en controles sanos (15, 16, 20, 21, 22). En todos ellos, los pacientes con EC activa mostraron unos niveles altos de I-FABP en suero comparados con los controles sanos. Sin embargo, pacientes con lesión tipo Marsh 3b de atrofia intestinal (con pérdida de los enterocitos de las vellosidades) mostraron bajos niveles de I-FABP en suero debido a la pérdida de dichas células que son las que secretan el marcador (21). En los pacientes en DSG durante un año se vio una reducción de los niveles de este marcador con respecto al momento antes de empezar el tratamiento, normalizándose hasta niveles parecidos a los de los individuos sanos. En uno de los estudios, se observó una caída de los niveles de I-FABP en el suero después de 6 meses en DSG, y aún más acentuado después de 1 año (16).

3.2. La quemoquina CXCL10:

El marcador CXCL10, también conocido como IP-10, es una proteína de 10 KDa sintetizada por diversas células inmunitarias y otros tipos celulares en respuesta a IFN- γ y principalmente. Es expresada de forma constitutiva a bajos niveles en diferentes órganos del sistema inmune como el timo, bazo o los ganglios linfáticos. Funcional y estructuralmente es una quemoquina inducida por IFN- γ , pero también puede ser inducida por estimulación con IFN- α , IFN- β , LPS (lipopolisacárido) o en las células T gracias a la presentación de antígeno. En ciertas enfermedades relacionadas con el sistema inmune, se ha visto que los niveles de esta quemoquina se correlacionan con los linfocitos T infiltrados en el tejido, sugiriendo que IP-10 juega un papel importante en el reclutamiento de células T a los sitios de inflamación. También es la encargada de dirigir la migración y estimulación mediante adhesión de los linfocitos T activados y células NK al tejido gracias a su unión a CXCR3, una proteína G que funciona como receptor de esta quemoquina, expresado principalmente en los linfocitos T activados de fenotipo Th1, células NK y también en linfocitos T CD8+ (25).

En los últimos años, se ha estudiado la relación de CXCL10 con la EC y su posible utilidad como marcador de inflamación específico (15, 26, 27). En relación con esto último, se investigó la estimulación con gliadina de monocitos humanos, observándose un incremento en la expresión de CXCL10, que podría sugerir un papel importante de esta molécula en el reclutamiento de células T al epitelio, como parte de la respuesta inmune innata. En estos estudios (15) se observó que la quemoquina inflamatoria

CXCL10 era producida en abundancia por la mucosa duodenal en pacientes con EC no tratados ya que se detectaron altos niveles en el suero. En otro estudio (27), analizaron la histología del tejido duodenal observándose que los pacientes con EC mostraban una sobreexpresión de CXCL10 en las células de la lámina propia y alrededor de las mismas, mientras que en los pacientes en DSG y en los controles, la expresión era escasa. Todo ello sugiere que en los pacientes con EC activa hay una gran cantidad de CXCL10 en el tejido duodenal, que es liberado al torrente sanguíneo en respuesta a altos niveles de IFN- γ en presencia de gluten (27). También se vio que los niveles volvieron a la normalidad en pacientes tratados con DSG (15).

Como conclusión podemos decir que ésta y otras quemoquinas relacionadas con el reclutamiento de las células T, podrían ser utilizados como posibles biomarcadores para la evaluación de la enfermedad, además de servir como futura diana terapéutica para la EC y para la sensibilidad al gluten en general (15,26).

3.3. La citoquina IFN- γ :

La citocina IFN- γ es una de las principales moléculas que intervienen en el proceso inflamatorio de la EC producida por las células TCD4+ de la lámina propia en respuesta al gluten (13). Según algunos estudios publicados (13), se sabe que las células dendríticas estimuladas con péptidos del gluten son capaces de activar linfocitos T gracias a la unión específica de la molécula HLA-DQ2 con dichos péptidos, y además estas células expresan en su superficie integrinas típicas de linfocitos activados en la lámina propia como $\alpha 4\beta 7$. En este mismo estudio se observó que la secreción de IFN- γ por los linfocitos T aumenta hasta 8 veces después de una sobrecarga de gluten en pacientes que siguieron DSG durante dos semanas y hasta 200 veces en pacientes que siguieron la DSG durante 8 semanas o más (13).

En estudios realizados en nuestro laboratorio se está llevando a cabo la detección de la citocina IFN- γ producida por células T presentes en muestras de sangre de pacientes celíacos en respuesta a un antígeno determinado, en este caso péptidos del gluten. De esta forma podemos obtener una cuantificación y análisis de las células T cuando se produce una sobre carga oral de gluten in vivo. Por todo ello se ha concluido que la detección de esta citocina puede ser una herramienta útil que permite la evaluación cuantitativa de la toxicidad de ciertos antígenos del gluten in vivo (13), pudiendo apoyar estos resultados al diagnóstico final de la enfermedad.

3.4. Recuento de linfocitos intraepiteliales:

Otra forma de analizar las muestras de la biopsia duodenal es realizar un linfograma como método de ayuda diagnóstica, cuantificando el número de linfocitos intraepiteliales (LIE) mediante citometría de flujo (5). Las muestras de la biopsia de los pacientes se procesan y se analizan con el citómetro de flujo, obteniendo unos valores para los LIE totales, y proporciones de células NK-like y los linfocitos TCR $\gamma\delta$ + presentes en el tejido duodenal del paciente, que serán comparados con unos valores normales de referencia (5). Si los valores para estas células coinciden con los valores para un paciente celíaco en actividad el diagnóstico de EC será claramente positivo gracias a esta prueba. También puede ser que los valores se correspondan con los de un paciente celíaco en remisión o latencia, lo cual debe ser apoyado también por el resto de pruebas diagnósticas. Este tipo de análisis se utiliza actualmente en nuestro laboratorio como prueba de ayuda diagnóstica de rutina de EC en el Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Clínico de Valladolid.

Gracias a estudios realizados en nuestro laboratorio (5) se ha concluido que en la detección de LIE en individuos con sensibilidad al gluten no celíaca, dichos individuos responden específicamente al gluten o a sus péptidos derivados. Además, se han observado diferencias significativas en estos experimentos entre individuos sanos, pacientes con EC en actividad y pacientes con sensibilidad al gluten no celíaca (SGNC).

4. HIPÓTESIS DE TRABAJO:

Trabajos previos han sugerido un posible papel de I-FABP como marcador de inflamación intestinal. Sin embargo, no existen valores de referencia de este marcador para la EC. Por lo cual, nos hemos planteado el análisis de dicho marcador en diferentes grupos de pacientes bien definidos, a diferencia de estudios previos que solo distinguen entre individuos sanos y pacientes con EC tanto al diagnóstico como en tratamiento con DSG. Además queremos comprobar si I-FABP puede ser un marcador temprano de inflamación en la EC que pueda tener utilidad como ayuda diagnóstica en estos pacientes.

En nuestro estudio vamos a utilizar muestras de suero de pacientes y voluntarios de otros experimentos que en general tienen un diagnóstico claro y definido, aportando todos los datos disponibles en cada caso; con el fin de comparar los resultados obtenidos para los diferentes grupos entre sí y con otros marcadores de inflamación como CXCL10 o el IFN- γ . De esta forma, se pretende valorar el papel del marcador I-FABP dentro de la EC y su posible utilidad como herramienta de ayuda diagnóstica, evitando así el uso de técnicas invasivas como la biopsia duodenal.

5. OBJETIVOS DEL TRABAJO:

1. Valorar el papel del marcador FABP2 en de la enfermedad celiaca y su posible utilidad como marcador temprano de inflamación en el intestino.
2. Comparar la presencia del marcador FABP2 en los diferentes grupos de pacientes con EC: al diagnóstico, en tratamiento con DSG y tras sobrecarga de gluten; con pacientes con otras enfermedades intestinales y voluntarios sanos.
3. Evaluar la relación entre los niveles de FABP2 y otros marcadores de inflamación como CXCL10 e IFN- γ .
4. Estandarizar la utilidad de FABP2 como ayuda diagnóstica junto con los marcadores serológicos, genéticos o histopatológicos asociados a la EC.

- MATERIAL Y MÉTODOS:

1. Selección y clasificación de los pacientes:

Para realizar nuestros experimentos hemos utilizado sueros de pacientes celiacos, tanto tratados como sin tratar, y de voluntarios sanos. Las muestras fueron cedidas por los Servicios de Pediatría y de Aparato Digestivo, Hospital Clínico de Valladolid, y del Hospital Universitario Río-Hortega. Se obtuvo el consentimiento escrito de los pacientes adultos y de los padres o tutores legales de los niños. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de Valladolid.

Todas las muestras pertenecen a pacientes incluidos en otros estudios realizados previamente en el laboratorio, de los cuales se han obtenido los datos disponibles, como sexo y edad del paciente, marcadores genéticos, linfograma, ELISpot (unidades productoras de IFN- γ frente péptidos de gliadina), serología y marcadores histológicos (**ver anexo I**).

- Resumen de los datos por grupo:

- **Pacientes con sobrecarga de gluten:** Los individuos elegidos para este grupo son pacientes con sospecha de sensibilidad al gluten no celiaca (SGNC) que pertenecieron a un ensayo anterior en el cual se les realizó una sobrecarga con gluten durante 14 días tras haber estado en DSG durante al menos 6 meses, y a continuación se realizó un ensayo ELISpot y linfograma al comienzo (tiempo 0), ELISpot a mitad del proceso (tiempo 7) y ELISpot y linfograma al final de la sobrecarga (tiempo 14). Para nuestro experimento hemos elegido los 5 pacientes que más datos aportaban, para así tener más evidencias de su diagnóstico. Todos ellos presentaban alelos de riesgo de la enfermedad para la molécula HLA de clase II. El linfograma en todos ellos corresponde con valores normales o compatibles con EC en tratamiento. Por el contrario, vemos que los resultados del ELISpot (estos sí tomados 7 días después de la sobrecarga de gluten) muestran que sí que hay bastantes células productoras de IFN- γ y por lo tanto inflamación causada por la ingesta de gluten. En este grupo de pacientes no se obtuvieron datos referentes a la histología del tejido duodenal ni a la serología.

- **Pacientes en tratamiento sin gluten:** Los pacientes elegidos estuvieron en tratamiento con DSG al menos durante 6 meses. Los datos del ELISpot (gliadina) que hemos conseguido revelan un bajo número en general de células productoras de IFN- γ (excepto en los pacientes 2 y 3) y en el caso del paciente 5 un linfograma normal, lo que evidencia que el tratamiento de estos pacientes estaría resultando efectivo y por lo tanto todos ellos deben estar clasificados en este grupo. No se han aportado datos del linfograma ni de la genética de todos los pacientes, lo cual hubiese sido bueno para apoyar el diagnóstico y el correcto seguimiento del tratamiento.

- **Pacientes celíacos al diagnóstico:** En el momento de la toma de muestra tanto de la biopsia como de la sangre para el ELISpot los pacientes realizaban ingesta de gluten en la dieta. Los datos aportados para el diagnóstico son claros indicadores de EC, excepto los resultados del ELISpot, ya que aun está siendo valorada su utilidad diagnóstica. Para este grupo obtuvimos también información de los marcadores genéticos, de la serología y del daño histológico de la mucosa clasificado según la escala de Marsh, presentando claras evidencias de EC.

- **Pacientes no celíacos con otras enfermedades intestinales:** Se han seleccionado sueros de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), que se utilizarán como controles de enfermedad, a comparar con los grupos de enfermos celíacos. Para este grupo, además del diagnóstico previo de la enfermedad, se ha conseguido los datos de los niveles de calprotectina en heces. Según algunos estudios, los niveles de esta molécula en heces se correlacionan con alta actividad inflamatoria en EII, es decir, que la calprotectina en heces es un marcador sensitivo de la inflamación de la mucosa en esta enfermedad. Los niveles de calprotectina se relacionan de forma positiva con el grado de daño intestinal (28).

- **Voluntarios sanos:** En este grupo se engloban los voluntarios sanos que se prestaron para anteriores proyectos de investigación, por lo que servirán como control. Solo se tomaron muestras de sangre para la realización del ELISpot

2. Biopsia duodenal y linfograma:

En alguno de los pacientes incluidos en este estudio se utilizó la técnica del linfograma duodenal como herramienta de ayuda diagnóstica. La obtención de muestras de tejido duodenal se realizó a través de gastroscopia a pacientes con EC o con sospecha de la enfermedad. Después de sedarles se obtuvieron 4 muestras de tejido por paciente, de las cuales dos se utilizaron para el linfograma y dos se procesaron y guardaron para futuros experimentos. El objetivo de esta técnica consiste en la obtención de células de la capa epitelial (LIE + enterocitos) para hacer un recuento de las poblaciones de LIE: CD3+, NKT y células T $\gamma\delta$.

Las biopsias deben ser procesadas antes de 1 hora desde su extracción para evitar perder nuestras células de interés. El protocolo para realizar el linfograma es el siguiente:

1. **Procesamiento y separación celular.** Se realiza en **campana de flujo** del laboratorio 2 trozos de biopsias con 10 ml de medio completo (RPMI) + 100µl EDTA 0,02% + 100µl DTT 0,1M y se incuba durante 45-60 min a 37°C en la noria.
Los sucesivos pasos se deben realizar en **pojata**: agitar la muestra de la noria para ayudar a desprender las células, recogerlas con una pipeta y centrifugar 10 min a 1800 rpm. Decantar y resuspender el pellet para después pasar 60 µl a dos tubos de citometría (30 µl en cada uno) para hacerlo por duplicado. Añadir los anticuerpos para citometría (3 µl cada uno e incubar en nevera durante 30 min.
2. **Tinción/fluorocromo con anticuerpos específicos:** TCRγδ con FITC (FL1); CD8 con PE (FL2); CD3 con APC (FL4) y CD45 con PE-Cy7 (FL5). Después de incubar se lava con 3ml de FACS y se centrifuga 7 min a 1400 rpm. Decantar y añadir 300 µl de FACS. El análisis se realiza en el citómetro FC500 y después se analizan los resultados.

Para conocer la utilidad de los valores obtenidos, se ha realizado previamente la estandarización de la técnica para obtener valores de referencia para el número de LIE totales, células NK-*like* y células con TCRγδ (5). Contabilizando el porcentaje de células obtenidas de cada tipo podemos ayudar en el diagnóstico, al compararlas con los valores de referencia establecidos para la enfermedad y para los individuos sanos (5).

Valores de referencia para un **individuo sano**:

- CD45+ (Linfocitos Intraepiteliales, LIEs): <12% con respecto al total de células del epitelio.
- CD103+CD3- (Células i-NK): >20% del total de LIEs.
- CD3+TCRγδ (Células Tγδ): <15% del total de LIEs.

Valores de referencia para un individuo **celiaco en actividad**:

- CD45+ (Linfocitos Intraepiteliales, LIEs): >12% con respecto al total de células del epitelio.
- CD103+CD3- (Células i-NK): <20% del total de LIEs.
- CD3+TCRγδ (Células Tγδ): >15% del total de LIEs

3. Técnica de ELISpot:

Esta técnica consiste en obtener linfocitos en sangre periférica de pacientes con sospecha de EC que serán transferidos posteriormente a unos pocillos preparados y tapizados con anticuerpo anti-IFN-γ. Después se estimulan dichos linfocitos con péptidos del gluten, que permiten verificar si este gluten es el responsable de los resultados que se obtengan al final del experimento. Después de la fase de revelado, lo que veremos es una serie de puntos negros en el fondo de los pocillos que representan unidades productoras de IFN-γ. De esta forma podemos cuantificar la cantidad de linfocitos encargados de producir IFN-γ en respuesta a los péptidos del gluten.

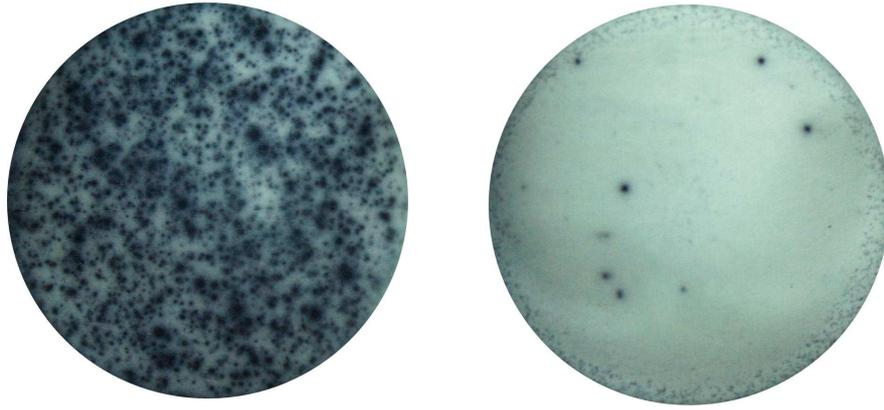


Figura 4: Ejemplo de ensayo ELISpot. Izquierda: control positivo donde cada punto representa una unidad productora de IFN- γ . Derecha: pocillo con células estimuladas con un péptido de gliadina donde se observan unidades productoras de IFN- γ .

El protocolo utilizado en nuestro laboratorio para el ensayo ELISpot es el siguiente:

a. Obtención de células mononucleares de sangre periférica y preparación del ELISpot.

Después de separar la sangre recién extraída del paciente del suero (que guardaremos para utilizarlo posteriormente), se mezcla con PBS en relación 1:2 en un tubo de 50ml. Se agrega esta sangre a otro tubo con Ficoll en proporción 1:2 lenta y homogéneamente y se centrifuga 30 min a 4°C y 2000rpm sin freno. Después se recoge el halo de células mononucleares con una pipeta sin coger el ficoll, enrasar el falcon con FACS al 2% y centrifugar 15 min a 4°C 1200rpm con freno. A continuación, se decantan y resuspenden en unas gotas de FACS a 37°C para volver a enrasar, lavar y centrifugar (3 lavados en total) 10 min a 4°C y 1200rpm con freno. Mientras se realiza esta primera parte hay que lavar 4 veces con PBS las tiras de ELISpot (1 tira de 8 pocillos por paciente) y acondicionar los pocillos con medio RPMI completo (10% FBS, 1% L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina) durante 30 min.

b. Incubación de células en la placa de ELISpot.

Se deben sembrar 200.000 células por pocillo, por lo que se deben contar las células mononucleares obtenidas gracias a la cámara de Neubauer en el microscopio y hacer los cálculos. En cada pocillo con un volumen final de 200 μ l se echarán las 200.000 células y además:

En el pocillo 1: como control positivo 0,2 μ l de mAbCD3-2 (anticuerpo anti-CD3) diluido 1:1000.

En los pocillos 2 y 3: 1,43 μ l por pocillo del péptido 33-mer (100 μ g/ml).

En los pocillos 4 y 5: 2,15 μ l por pocillo del péptido PT-gliadina (1 mg/ml).

En los pocillos 6, 7 y 8: células sin estímulo como control negativo.

A continuación taparemos la placa y lo dejamos incubar durante 2 días a 37°C y 5% de CO₂.

c. Revelado de la placa.

Pasado el tiempo de incubación, eliminamos el medio de cultivo y lavamos los pocillos 5 veces echando 200 μ l por pocillo con PBS al 0,5% de FBS (50ml PBS+250 μ l de suero). Después diluimos el anticuerpo de revelado con el PBS al 0,5% de FBS en relación 1:200, añadimos 4,5 μ l de anticuerpo, 900 μ l de PBS y 4,5 μ l de FBS. Ponemos 100 μ l en cada pocillo de la dilución anterior y se incuba la placa durante 2 h a TA. Cuando ha terminado el tiempo de incubación, lavamos 5 veces los pocillos con PBS y se añade 100 μ l de sustrato de revelado a cada pocillo, revelando hasta que se vean puntos morados en el fondo. Después se detiene la reacción lavando con dH₂O, secar y guardar la placa en oscuridad a temperatura ambiente. Fotografiar cada pocillo

y contar los puntos morados de cada ensayo, sin contar los del control positivo. Cada punto corresponde a una unidad formadora de IFN- γ .

4. Técnica de ELISA:

La técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) permite cuantificar proteínas específicas presentes en un medio biológico como puede ser suero, plasma, heces, orina, etc. En nuestro, se utilizará para el estudio de los marcadores I-FABP y CXCL10 presentes en el suero de diversos grupos de pacientes con EC y controles.

Los kits utilizados son el ELISA específico para la detección en suero de la proteína I-FABP (con una sensibilidad de 25pg/ml) y otro kit ELISA específico para la detección en suero del marcador CXCL10 (con una sensibilidad de 2.0 pg/ml). Todas las muestras de ambos ensayos se estudiaron por duplicado. Los kits incluyen sus propios reactivos, buffers y placas con 96 pocillos recubiertos con anticuerpos específicos para la proteína de interés. Ambos experimentos se basan en un sándwich-ELISA cuyo revelado es llevado a cabo gracias a una enzima peroxidasa. A la hora de realizar los experimentos se siguieron estrictamente los protocolos específicos que incluían los kits.

Como paso previo se realizó la separación del suero del resto de componentes de la sangre, mediante centrifugación de la sangre recién extraída del paciente 10 min a 1200rpm. Tras pasar el suero a tubos eppendorf se realizó una centrifugación 1 min a 1200rpm para eliminar posibles células. Después se congela la muestra a -20 o a -80°C.

4.1. Test ELISA para FABP2:

El protocolo seguido para la realización del experimento fue el siguiente:

- Tras atemperar los sueros y los reactivos del kit a temperatura ambiente antes de usados; Se preparan las soluciones *standard*: añadir 400 μ l de diluyente C en el vial liofilizado de las soluciones *standard* para preparar una reacción a concentración 100 ng/ml. A partir de este concentrado realizar diluciones seriadas 1:4 para obtener todas las concentraciones requeridas en el protocolo.

- Después se añaden 100 μ l de cada *standard* a su correspondiente pocillo en la placa de ELISA, además 100 μ l de los sueros elegidos diluidos 1:2 con diluyente C. Cubrir la placa e incubar 2,5 h a temperatura ambiente con agitación de la misma.

- Pasado el tiempo de incubación se descarta la solución de los pocillos y se lava 4 veces con solución de lavado correctamente diluido a 1X para retirar el excedente.

- A continuación añadir 100 μ l en cada pocillo del anticuerpo biotinilado previamente diluido 1:80 con diluyente B. Incubar durante 1 h a temperatura ambiente con agitación de la placa.

- Pasada la hora de incubación descartar la solución y volver a lavar 4 veces con solución de lavado 1X.

- A continuación se añaden 100 μ l en cada pocillo de anticuerpo Streptavidin-HRP (peroxidasa) previamente diluido 1:1500 en solución HRP-Streptavidin. Se incuba la placa en agitación durante 45 min a temperatura ambiente.

- Después del tiempo de incubación requerido se descarta la solución de los pocillos y se lava 4 veces con solución de lavado 1X para retirar el anticuerpo excedente.

- Añadir 100 μ l de sustrato TMB en cada pocillo e incubar durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad y agitación.

- Después de 30 min se añaden 50 μ l de solución de Stop para parar la reacción enzimática.

- Pasados otros 30 min desde que detuvo la reacción, se procede a medir las absorbancias en un lector de placas de ELISA. Según el protocolo se deben realizar dos mediciones: una a 450nm y otra a 550nm. Para corregir imperfecciones ópticas se restan a los valores medidos a 450nm los valores medidos a 550nm. Para calcular la

concentración de proteína presente en cada pocillo se debe realizar una curva patrón con las concentraciones y absorbancias conocidas de los pocillos *standard*. Al haber estudiado cada muestra por duplicado, se obtiene una media de los dos valores de absorbancia más exacto. A continuación, se realiza la curva patrón en cuyo eje X se sitúan los valores de las concentraciones estándar frente a sus absorbancias correspondientes en el eje Y. Mediante una herramienta estadística se obtiene la ecuación que nos permitirá calcular las concentraciones de FABP2 de cada suero.

4.2. Test ELISA para CXCL10:

El protocolo seguido para la realización del experimento fue el siguiente:

- Tras atemperar todos los sueros y reactivos del kit a temperatura ambiente, se preparan las soluciones *standard*: se añaden 3ml de Standard Diluent Buffer en los viales de *standard* liofilizado para obtener una disolución a concentración 5000 pg/ml. Realizar una dilución 1:10 para obtener una concentración de 500 pg/ml, y a partir de ésta se hacen diluciones seriadas 1:2 para obtener el resto de concentraciones estándar requeridas en el protocolo.

- A continuación se añaden 50 µl de cada dilución *standard* y de cada suero en sus correspondientes pocillos.

- Después añadir 50 µl de anticuerpo biotinilado anti-Human IP-10 en cada pocillo excepto en los blancos (0 pg/ml) consiguiendo un volumen final de 100 µl por pocillo. Incubar durante 3 h a temperatura ambiente.

- Pasado el tiempo de incubación, descartar la solución de los pocillos y lavar 4 veces con solución de lavado correctamente diluida a 1X (dilución 1:25) para descartar el exceso de anticuerpo.

- A continuación se añaden 100 µl de anticuerpo Streptavidin-HRP (previamente diluido 1:100 en diluyente Streptavidin-HRP) en todos los pocillos excepto en los dos blancos. Incubar la placa con el anticuerpo 30 min a temperatura ambiente.

- Descartar la solución y lavar 4 veces con solución de lavado 1X para eliminar el excedente.

- Después de los lavados añadir 50 µl de Stabilized Chromogen en cada pocillo y observar como va cambiando a color azul. Incubar la placa durante 30 min a temperatura ambiente en oscuridad (armario). A pesar de que en el protocolo especificaba 30 min se dejó solamente 20 ya que al no haber diluido los sueros la cantidad de proteína presente podría ser muy alta y había riesgo de que el lector de placas no detectase las absorbancias.

- Pasados los 20 min de incubación, se detiene la reacción enzimática añadiendo 100 µl de solución de Stop en cada pocillo.

- A continuación se midieron las absorbancias en un lector de placas de ELISA a 450nm. Para la realización de la curva patrón se utilizó un software estadístico que nos proporcionó las ecuaciones correspondientes para calcular la cantidad de proteína presente en cada suero.

5. Análisis estadístico:

Para la realización de las curvas estándar se utilizó el software My Curve Fit (*online curve fitting*) realizando una regresión logística de cuatro parámetros para ambos test ELISA, obteniendo los correspondientes valores para la ecuación. Sustituyendo en dicha ecuación los valores de las absorbancias, obtuvimos los valores para las concentraciones de proteína de cada suero, realizando la media de los duplicados.

El resto de los análisis estadísticos fueron realizados usando SPSS 19.0 (SPSS, IBM, IL). Se realizaron diagramas de barras utilizando el valor medio de cada grupo con sus correspondientes barras de error, curva ROC del marcador FABP2 para la discriminación entre sanos y enfermos y un diagrama de dispersión para ver la progresión del marcador FABP2 en el grupo de sobrecarga de gluten. Para las comparaciones en todos los casos entre los diferentes grupos se utilizó el test no

paramétrico para muestras independientes U- de Mann-Whitney, considerando un p valor por debajo de 0,05 estadísticamente significativo.

Para realizar la curva ROC se utilizó el test AUC (área bajo la curva) que mide la concentración a la cual el marcador presenta una sensibilidad y especificidad óptimas para la discriminación entre enfermos y sanos. Para realizar este gráfico se utilizaron las concentraciones de FABP2 de un total de 6 individuos sanos y 9 enfermos celíacos al diagnóstico. Para hallar la concentración de proteína a la cual se discrimina entre sanos y enfermos se realizó el Índice de Youden, indicando el valor en el cual la relación entre la especificidad y sensibilidad era más alta (valor más próximo a 1).

Para observar la posible correlación entre los marcadores estudiados y otros datos de los pacientes se empleó la prueba para correlaciones bivariadas rho de Spearman, que se utiliza para medir la posible asociación o independencia entre dos variables aleatorias. Un p valor por debajo de 0,05 se consideró estadísticamente significativo y por lo tanto que existe una correlación entre las variables de estudio. Valores de rho entre 0 y 0,19 se considera muy baja correlación; valores entre 0,2 y 0,39 se considera baja correlación; entre 0,4 y 0,59 correlación moderada; valores entre 0,6 y 0,79 se considera buena correlación y entre 0,8 y 1 correlación muy buena.

RESULTADOS:

1. Los niveles de FABP2 en suero aumentaron en los pacientes celíacos no tratados respecto a los controles.

	Pac. 1	Pac. 2	Pac. 3	Pac. 4	Pac. 5	Pac. 6	Pac. 7	Pac. 8	Pac. 9	MEDIA
SGNC t=7	0,941	0,426	0,298	0,096	0,579					0,468
SGNC t=14	2,075	0,683	0,362	0,468	0,397					0,797
ECD SG	0,656	1,061	1,389	0,558	0,447	0,211	0,690			0,726
EC al diagnóstico	3,809	0,649	0,934	0,600	5,124	1,805	0,225	0,586	0,173	1,419
EII	0,211	0,781	0,885	0,327	0,468	0,305				0,496
SANOS	0,218	0,544	0,319	0,151	0,621	0,247				0,350

Tabla 2: Concentraciones séricas de FABP2 expresadas en ng/ml. Se estudiaron un total de 35 pacientes, repartidos en un grupo de 5 para sobrecarga de gluten y 6 pacientes en el resto de grupos.

Con los datos obtenidos de la Tabla 2 se realizó un diagrama de barras (figura 5), donde se pueden apreciar las diferencias en los niveles del marcador FABP2 entre los grupos de pacientes establecidos. Después se realizó la prueba estadística no paramétrica comparando entre sí cada grupo y obteniendo p valores por encima de 0,05 en todos los casos.

Al comparar los grupos en sobrecarga de gluten se observa un aumento general de los niveles de FABP2 a día 14 respecto a día 7 (figura 6). Para esta comparativa se utilizaron 5 pacientes con sospecha de sensibilidad al gluten no celiaca en DSG durante al menos 6 meses a los que se les sometió a una sobrecarga de gluten después de recogerles una muestra de sangre a t=0. Seguidamente se recogieron muestras a t=7 y a t=14 y se llevó a cabo la cuantificación de FABP2 en los sueros a estos dos últimos tiempos.

Para comprobar la posible utilidad diagnóstica del marcador FABP2 se realizó una curva ROC (figura 7) y la prueba AUC (área bajo la curva). Realizado el test con el software estadístico se muestra un AUC de 0,889, lo cual nos sugiere que la relación entre la especificidad y la sensibilidad es bastante alta ya que dicho valor para el área es próximo a 1. Este test ha permitido establecer un valor de corte en los niveles del marcador y así determinar la concentración óptima para establecer la condición de enfermo frente a sano que nos dio como resultado una concentración de 0,563 ng/ml. Siete de los quince pacientes resultaron estar por debajo de este umbral considerando su condición de sanos mientras que ocho de ellos tienen niveles por encima del punto de corte por lo que les consideramos enfermos. Para que este test tuviese mayor validez y fiabilidad habría que repetirlo con un mayor número de pacientes para ambas condiciones, ya que con una muestra de 15 individuos no se puede considerar que nuestro valor de corte sea fiable.

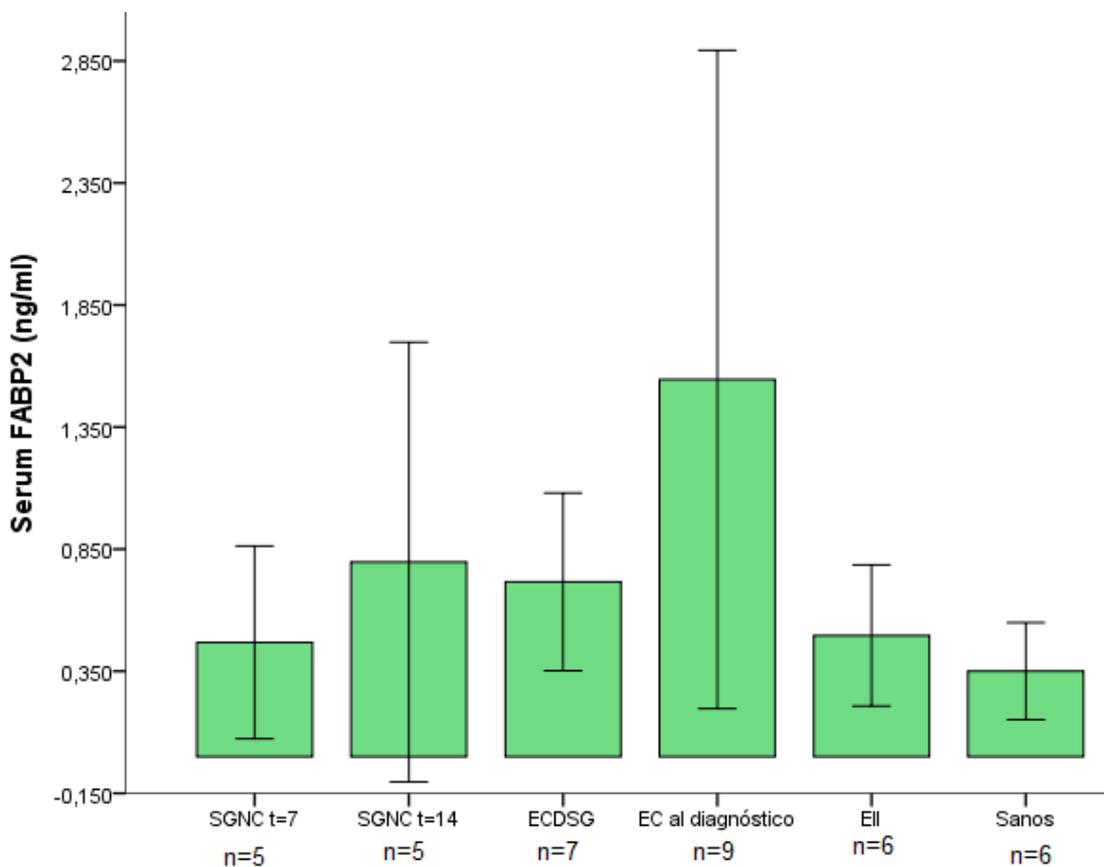


Figura 5: Niveles de FABP2 en los diferentes grupos de pacientes. Diagrama de barras que representa el valor medio de los niveles de FABP2 (ng/ml).

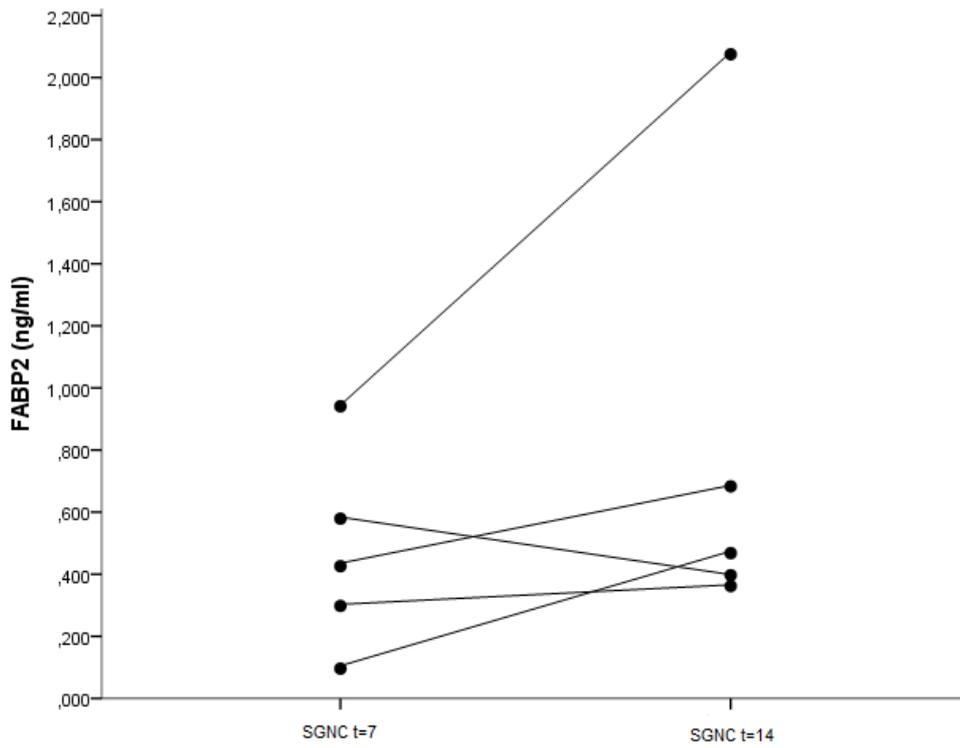


Figura 6: Niveles de FABP2 en suero en pacientes tras 7 y 14 días de sobrecarga de gluten.

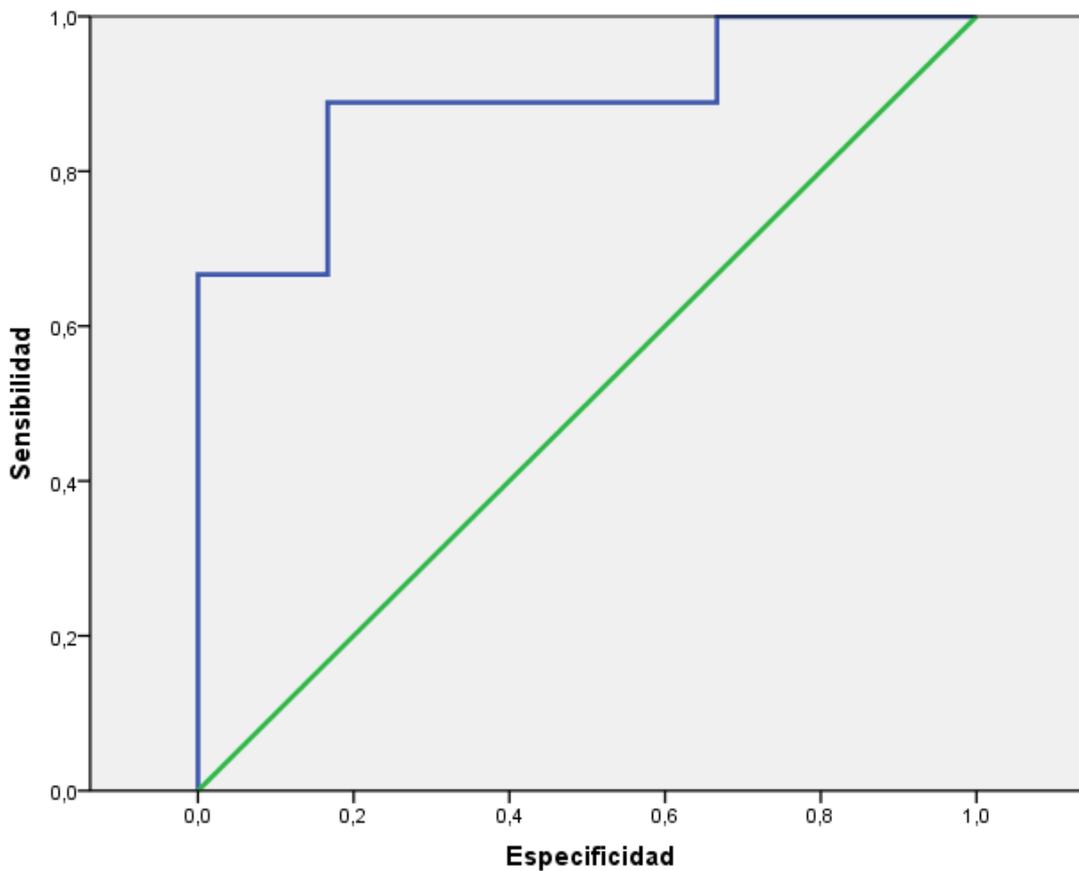


Figura 7: Curva ROC para el marcador FABP2.

2. Los niveles del marcador CXCL10 fueron mayores en el suero de los pacientes con EC en actividad que en voluntarios sanos.

Los niveles de CXCL10 hallados después de realizar el test ELISA fueron los mostrados en la siguiente tabla:

	Pac. 1	Pac. 2	Pac. 3	Pac. 4	Pac. 5	Pac. 6	Pac.7	Pac.8	Pac.9	MEDIA
SGNC t=7	101,2	43,3	38,4	190	32,5					81,1
SGNC t=14	112,3	51,1	55,5	161	34,8					82,9
ECD SG	125,5	72,3	262,4	317,8	31,6	104	72,7			140,9
EC al diagnóstico	254,3	56,1	152,3	183,3	467,3	230,3	162,5	144,6	63,8	190,5
EII	179,3	40,4	54,9	26	89,1	67,2				76,2
SANOS	106,1	115,4	93,9	48,2	126,4	57,8				91,3

Tabla 3: Concentraciones en suero de CXCL10 expresado en pg/ml.

Con los resultados obtenidos en la Tabla 3 se ha realizado un gráfico (figura 8) donde se pueden comparar las medias obtenidas de CXCL10 para cada grupo. En este gráfico se observan diferencias entre el grupo control de voluntarios sanos y los pacientes con EC al diagnóstico, aunque los resultados no sean estadísticamente significativos. Al igual que para el marcador anterior, se compararon todos los grupos entre sí mediante un test no paramétrico para muestras independientes donde se obtuvo un p valor mayor de 0,05 en todos los casos.

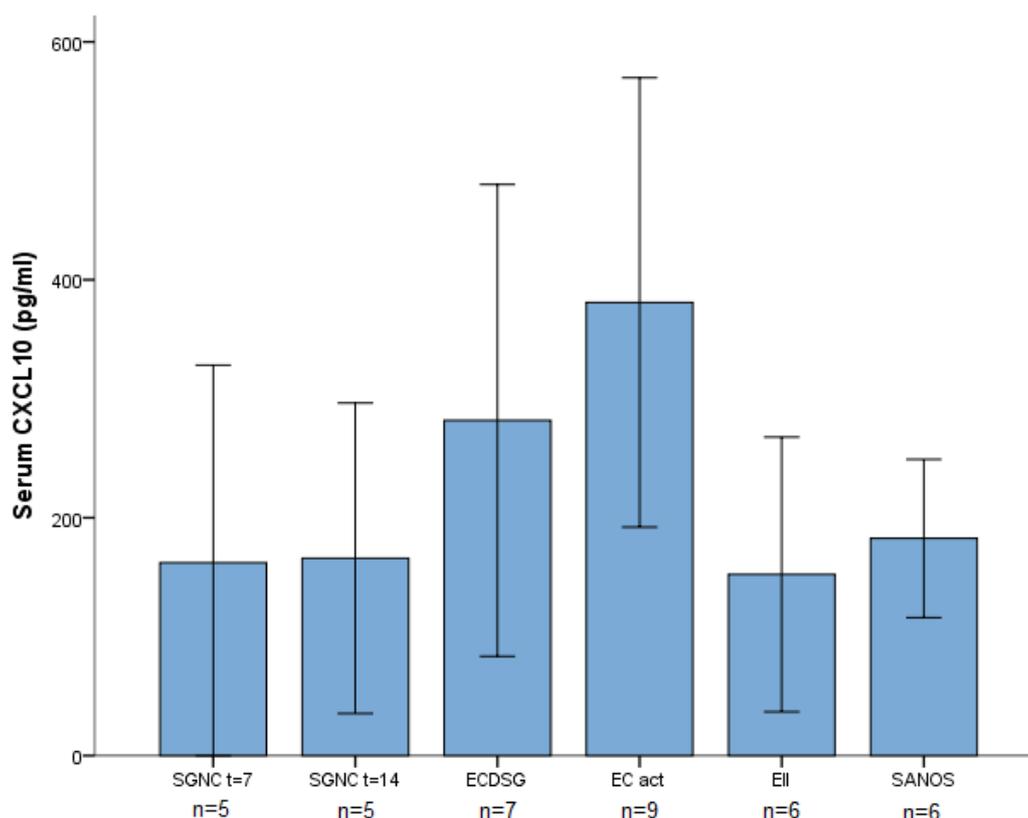


Figura 8: Niveles de CXCL10 en los distintos grupos de estudio. Diagrama de barras que representa el valor medio de CXCL10 (pg/ml).

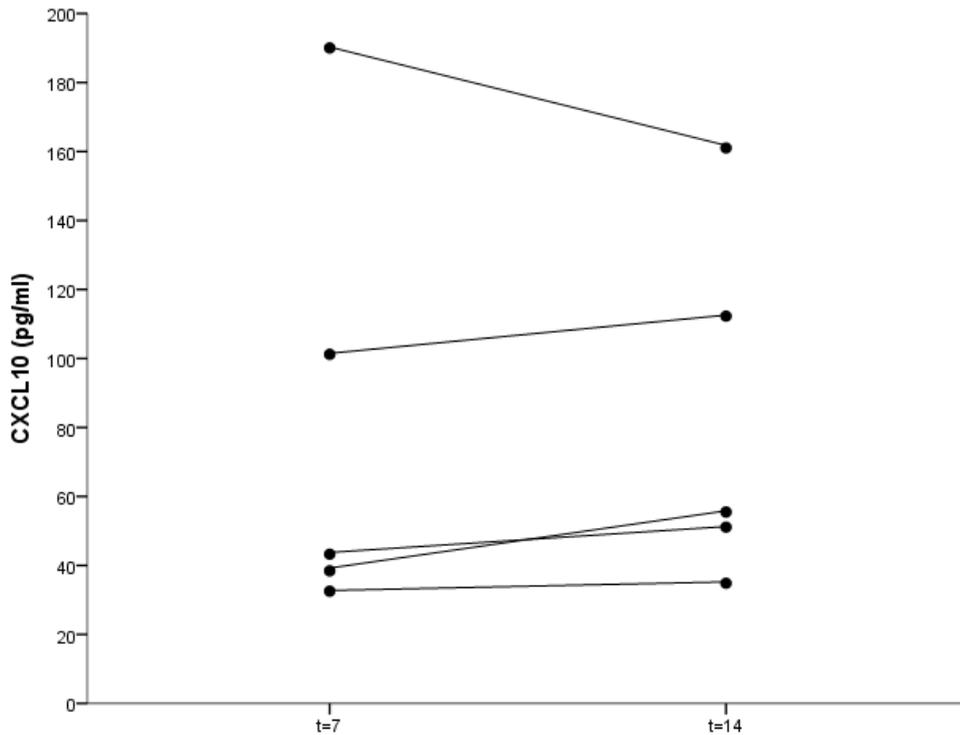


Figura 9: Niveles de CXCL10 en suero en pacientes después de 7 y 14 días de sobrecarga de gluten.

En la figura 9 se puede observar como los niveles de CXCL10 en los 5 pacientes con sobrecarga de gluten están más elevados al día 14 comparado con el día 7, excepto para uno de ellos donde los niveles disminuyen.

3. Correlación entre los niveles séricos de FABP2 y el riesgo genético asociado a la EC en pacientes que toman gluten.

Se realizó una prueba estadística con el fin de observar si hay alguna correlación entre los marcadores séricos analizados y los datos recogidos para cada uno de los casos de estudio.

En primer lugar se evaluó la relación entre los niveles de FABP2 en los pacientes que estaban tomando gluten en la dieta (pacientes con SGNC y con EC al diagnóstico) y el riesgo genético de acuerdo a los haplotipos que presentan. Se observó una correlación significativa entre ambas variables con un p valor de 0,01.

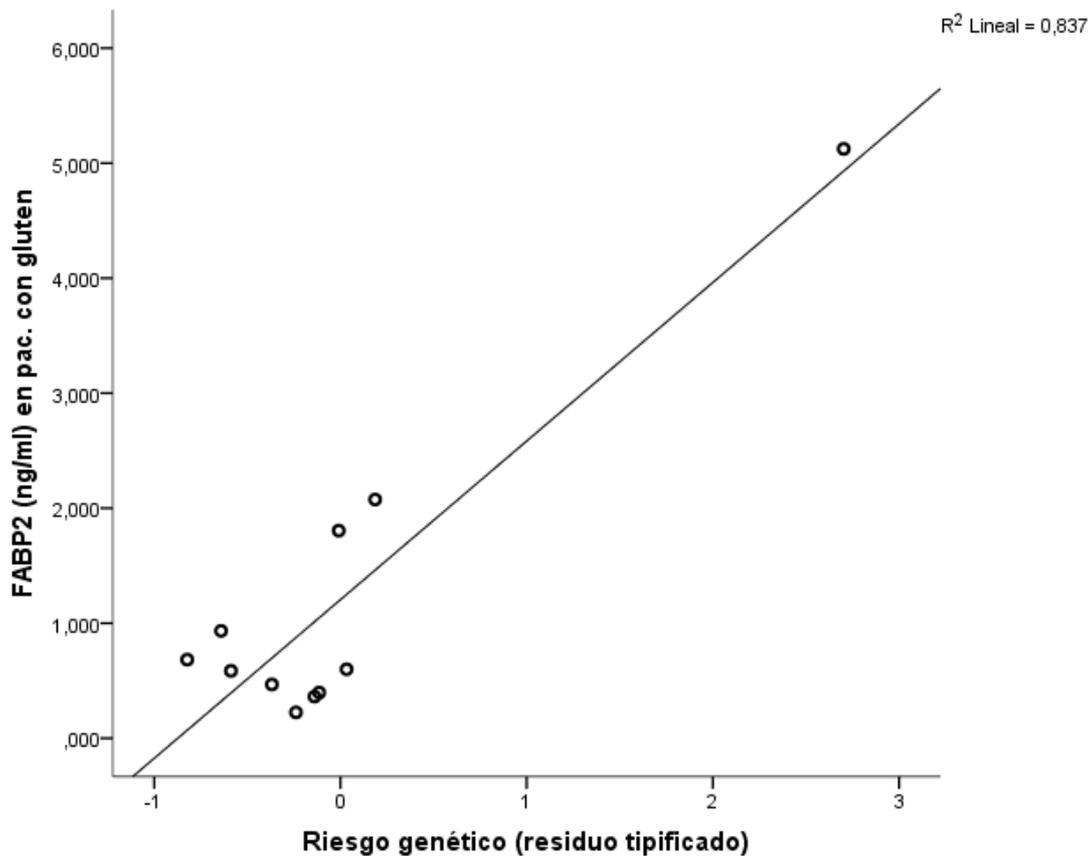


Figura 10: Gráfico de dispersión que muestra una relación lineal entre los niveles de FABP2 en pacientes que toman gluten y el riesgo genético a padecer la EC.

También se evaluó la posible correlación entre otros datos: los niveles de FABP2 séricos con los resultados del ELISpot en pacientes sin ingesta de gluten; además de los niveles de CXCL10 con los datos del ELISpot en pacientes con sobrecarga de gluten. Para estas pruebas no se observaron correlaciones estadísticamente significativas.

- DISCUSION:

En este estudio se ha evaluado el papel del marcador FABP2 en la EC y su posible utilidad como ayuda diagnóstica en esta enfermedad. También se han medido los niveles del marcador de inflamación CXCL10 y se han comparado ambos resultados. Para ello, se ha realizado un test ELISA con el fin de cuantificar los niveles de estos marcadores en el suero de diferentes grupos de pacientes: celíacos con gluten, sin gluten, controles sanos y en enfermos de EII. Los datos de todos los pacientes se han recogido en el anexo.

En pacientes con EC no tratada los niveles de FABP2 fueron más elevados que los niveles hallados en los controles sanos. Estos resultados se corresponden con los observados en otros estudios (15, 16, 20, 21, 22). En los pacientes del grupo de sobrecarga de gluten (SGNC t=7 y SGNC t=14) observamos que el valor medio para el día 14 (t=14) es más alto que a día 7 (figura 6). Esto puede ser debido a que los tiempos de respuesta para la sobrecarga de gluten sean mayores de lo esperado. Estos resultados han sido confirmados en un estudio anterior (22), en el que observaron que los niveles de FABP2 aumentaban a los 14 días en pacientes con EC

después de una sobrecarga de gluten en la dieta. En el mismo estudio, se observó también que los niveles en suero de este marcador se correlacionaban con el número de LIE después de la sobrecarga, lo que indica que FABP2 refleja un daño inicial inducido por el gluten (22). En cuanto al grupo de los pacientes con EII, se han obtenido unos valores dentro de lo esperado, ya que este marcador no es indicador de daño intestinal en el colon y, por tanto, su expresión se encuentra a bajos niveles de forma constitutiva en esta parte del intestino (21). Los pacientes con EC en tratamiento de DSG presentan unos niveles de FABP2 en general bajos aunque sí vemos heterogeneidad en el grupo, pudiendo ser debido a diferencias en el tiempo que lleven realizando la dieta sin gluten, dato que desconocemos. Esto puede indicar que la mucosa intestinal no se ha recuperado por completo en aquellos pacientes que presentaron niveles más altos del marcador.

Además, se llevó a cabo un test de correlación entre diversos datos recogidos sobre los pacientes del estudio y los niveles de FABP2 obtenidos. Se observó una correlación significativa entre el riesgo genético a padecer la enfermedad y los niveles de FABP2. No se tienen referencias bibliográficas sobre correlaciones de este marcador con otros datos, por lo que no podemos comparar nuestros resultados con estudios anteriores.

Se realizó también un test ELISA específico para detectar los niveles del marcador pro-inflamatorio CXCL10, el cual sabemos que está directamente relacionado con la producción de IFN- γ . Los resultados obtenidos en otros estudios indican la presencia de CXCL10 en los enterocitos de pacientes con EC no tratada y su consecuente liberación al torrente sanguíneo debido a la rotura de la barrera epitelial intestinal (27). En dicho estudio (27) se comprobó también que los pacientes con EC sin tratar tienen en el suero una concentración de CXCL10 significativamente mayor que en los controles sanos. Nuestros resultados permiten observar también el aumento de los niveles de CXCL10 en el suero de pacientes con EC, comparando con los controles sanos, aunque no alcanzó la significación estadística.

Los resultados obtenidos en nuestro experimento mostraron que para los grupos de pacientes de sobrecarga de gluten no se observan diferencias entre los días 7 y 14 de la sobrecarga. Esto puede ser debido a que el tiempo de respuesta al estímulo se prolonga en el tiempo más de lo esperado, o que la respuesta se mantiene durante este periodo de tiempo, con niveles del marcador de inflamación CXCL10 similares. No se han encontrado referencias bibliográficas sobre ningún estudio publicado en relación con este marcador en situaciones de sobrecarga de gluten, por lo que no podemos contrastar nuestros resultados obtenidos con otros previos.

En cuanto al grupo de enfermos con EII, se trata de casos con inflamación intestinal pero en los que todavía no se ha confirmado la entidad concreta (principalmente, enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa). En el primer caso, la enfermedad está caracterizada por tener una respuesta pro-inflamatoria de tipo Th1, cuya citocina principal es el IFN- γ , la cual induce la expresión de CXCL10. Por el contrario, la colitis ulcerosa se caracteriza por tener un tipo de respuesta Th2. Los bajos niveles del marcador CXCL10 obtenidos en los pacientes con este tipo de patologías intestinales sugieren que la mayoría de ellos están en el segundo grupo. Aunque, en principio, no se conocía qué tipo de patología intestinal concreta tenían estos pacientes, en uno de ellos (paciente 1) sí pudo confirmarse el diagnóstico de enfermedad de Crohn, precisamente el caso con los niveles de proteína CXCL10 más elevados en suero, comparado con el resto de pacientes del grupo, lo que sugiere que esta hipótesis podría ser cierta.

Los pacientes con EC que no están tomando gluten presentan unos niveles de este marcador bastante altos en general. Esto puede ser debido al tiempo que dichos pacientes lleven realizando la dieta, dato que desconocemos. Por ello, nuestros resultados sugieren que los pacientes que presentan los niveles más elevados de CXCL10 podrían llevar menos tiempo en tratamiento, como es el caso de los pacientes

3 y 4. De acuerdo a estudios previos, los niveles de CXCL10 en pacientes tratados con DSG mostraron unos niveles intermedios comparados con pacientes con EC y los controles sanos (27). Tras realizar un test de correlación entre los niveles de esta quemoquina y los resultados obtenidos en el ELISpot no vemos en general una relación como cabría de esperar, ya que la presencia del marcador CXCL10 en estos pacientes viene inducida por IFN- γ debido a la ingesta de gluten, por lo que en presencia de un número elevado de células productoras de IFN- γ deberíamos observar también niveles altos del marcador.

Para finalizar, podemos decir que los resultados no son concluyentes. Como hemos podido observar en la tabla de recogida de datos de los pacientes (ANEXO I), las manifestaciones y comportamiento de la enfermedad es diferente en cada paciente, por lo que es difícil establecer unas pautas de diagnóstico y unos claros valores de referencia para los marcadores estudiados. Los experimentos deben ser repetidos con un mayor número de pacientes de cada grupo para poder así obtener significación estadística y mayor fiabilidad en los resultados. Para el grupo de pacientes sometidos a una prueba de sobrecarga con gluten, hubiese sido mejor evaluar los niveles del marcador a tiempos más largos para conocer la evolución completa del marcador, incluidos los tiempos de liberación a sangre y eliminación, para poder valorar así los picos de detección en suero y de aclaramiento posterior. Desafortunadamente no disponíamos de medios ni de sueros para realizar el experimento de esta forma. Con respecto a los datos obtenidos para el ensayo ELISpot hemos observado que no se ajustan mucho a lo esperado, aunque la utilidad de estos experimentos en la EC sigue siendo evaluada.

Debido a que la estandarización de los marcadores finalmente no ha sido posible por el bajo número de pacientes por grupo y por la falta de otros datos, podemos decir que los marcadores de inflamación estudiados son una herramienta de ayuda al diagnóstico de la enfermedad pero no presentan fiabilidad suficiente para diagnosticar o monitorizar la enfermedad por sí mismos.

Comparando los niveles obtenidos para los dos marcadores estudiados en los diferentes grupos de pacientes, podemos establecer un patrón dependiendo del estadio de la enfermedad: niveles séricos elevados de FABP2 y de CXCL10 en el momento de realizar el diagnóstico de la enfermedad, seguido de una bajada de los niveles después de empezar la DSG, para subir nuevamente con la prueba de sobrecarga de gluten. Con estos resultados podemos afirmar que ambos marcadores están presentes en la EC. La relación que podemos establecer entre ellos es que se encuentran en alta proporción en las células de la barrera epitelial intestinal del tejido duodenal de los pacientes en fase activa, y que cuando ésta se rompe debido a daño secundario a la ingesta de gluten, estos marcadores son liberados al torrente sanguíneo pudiendo ser detectados mediante un sencillo test ELISA específico para cada uno de ellos. Por todo ello concluimos que estas moléculas podrían ser unos buenos indicadores de daño intestinal causado por el gluten, mientras que la presencia de los autoanticuerpos es indicador de una activación de la respuesta inmunitaria frente al gluten en los pacientes con susceptibilidad genética a padecer la EC. La molécula FABP2 refleja rápidos cambios en la mucosa, debido a su tiempo de vida corto, que pueden ser detectados en el suero de los pacientes y que podrían tener utilidad para monitorizar los efectos de la DSG, al menos como los anticuerpos séricos utilizados en la actualidad (IgA-antiTG2 e IgA-anti-endomisio), aunque estos últimos sí son buenos para el diagnóstico de la enfermedad (17, 18, 21).

Un buen test diagnóstico para la EC sería una prueba que combinase la detección en suero de autoanticuerpos específicos de la enfermedad que reflejan una activación de la respuesta inmunitaria frente al gluten, con la detección de daño de la barrera epitelial intestinal mediante los niveles de FABP2 en suero, todos ellos

basados en técnicas dependientes de una extracción de sangre, método mucho menos invasivo que la biopsia duodenal por gastroscopia. Sería también de gran utilidad confirmar la relación entre los niveles de FABP2 en muestras de suero y orina, ya que si fuera así, la recogida de una muestra de orina es un método aún menos invasivo que la extracción de sangre al no tener que utilizar agujas. Este test que combine ambas medidas de autoanticuerpos y FABP2 podría sustituir también a las biopsias rutinarias de confirmación diagnóstica y/o monitorización y seguimiento de los pacientes.

- CONCLUSIONES:

1. Los niveles de FABP2 en suero son más elevados en los pacientes con EC no tratada que en los voluntarios sanos. Los niveles de CXCL10 en suero son también más elevados en los pacientes con EC que en los controles. En ambos casos no se observó significación estadística.
2. En los pacientes con EC que están tomando gluten, se observó una correlación significativa entre los niveles séricos de FABP2 y los haplotipos genéticos que presentan.
3. Los marcadores estudiados podrían servir de ayuda para el diagnóstico de la EC pero no como herramienta exclusiva, ya que solo evalúan el daño de la mucosa, y se necesitaría otra prueba para evaluar la activación de la respuesta inmune frente al gluten en el intestino.
4. Para el diagnóstico de la EC sería de gran utilidad disponer de un test que combinase la detección de los marcadores de daño intestinal como FABP2 o CXCL10, con la detección de los autoanticuerpos específicos de la enfermedad.

- BIBLIOGRAFIA:

- (1) Polanco, I., & Ribes, C. (1995). Enfermedad celíaca. *Pediatría Integral*, 1(2), 124.
- (2) Allué, I. P. (2011). Estado actual del diagnóstico de la enfermedad celíaca en el niño y adolescente. *Evidencias en pediatría*, 7(3), 2.
- (3) Rodrigo, L., & Peña, A. S. (2013). *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. OmniaScience.
- (4) Garrote JA, Arranz E. Pruebas de laboratorio en el diagnóstico de la enfermedad celiaca. En: Test de laboratorio en Gastroenterología y Hepatología. S.Santolaria, J.C. García-Pagán, Editores. Clínicas Iberoamericanas de Gastroenterología y Hepatología, 2017, Vol.10, pp 83-94.
- (5) Montalvillo, E., Bernardo, D., Martínez-Abad, B., Allegretti, Y., Fernández-Salazar, L., Calvo, C., ... & Arranz, E. (2015). Increased Intraepithelial Vα24 Invariant NKT Cells in the Celiac Duodenum. *Nutrients*, 7(11), 8960-8976.
- (6) Rodríguez Sáez, L. (2010). Enfermedad celiaca. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 34(2), 49-59.
- (7) Kupfer, S. S., & Jabri, B. (2012). Pathophysiology of celiac disease. *Gastrointestinal endoscopy clinics of North America*, 22(4), 639-660.
- (8) Verdu, E. F., Galipeau, H. J., & Jabri, B. (2015). Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 12(9), 497.
- (9) Miranda Díaz, M., Alonso Romero, L., De Castro Ochoa, M., & Millán Jiménez, A. (2012). Enfermedad celiaca: nuevos criterios diagnósticos. *Vox Paediatrica*, 19(2), 28-33.
- (10) Fasano, A., & Catassi, C. (2001). Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology*, 120(3), 636-651.
- (11) Aliaga, E. D., Miquel, B. P., & Ribes-Koninckx, C. (2003). Marcadores serológicos de enfermedad celiaca. *Acta Pediátrica Española*, 61(1), 24-32.
- (12) Rodrigo Sáez, L. (2006). La enfermedad celiaca en el adulto. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 98(6), 397-407.
- (13) Anderson, R. P., Van Heel, D. A., Tye-Din, J. A., Barnardo, M., Salio, M., Jewell, D. P., & Hill, A. V. S. (2005). T cells in peripheral blood after gluten challenge in coeliac disease. *Gut*, 54(9), 1217-1223.
- (14) Chmurzyńska, A. (2006). The multigene family of fatty acid-binding proteins (FABPs): function, structure and polymorphism. *Journal of applied genetics*, 47(1), 39-48.
- (15) Bottasso Arias, N. M., García, M., Bondar, C., Guzman, L., Redondo, A., Chopita, N., ... & Chirido, F. G. (2015). Expression pattern of fatty acid binding proteins in celiac disease enteropathy. *Mediators of inflammation*, 2015.
- (16) Adriaanse, M. P. M., Tack, G. J., Passos, V. L., Damoiseaux, J. G. M. C., Schreurs, M. W. J., Wijck, K., ... & Vreugdenhil, A. C. E. (2013). Serum I - FABP as marker for enterocyte damage in coeliac disease and its relation to villous atrophy and circulating autoantibodies. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 37(4), 482-490.
- (17) Vreugdenhil, A. C., Wolters, V. M., Adriaanse, M. P., Van den Neucker, A. M., van Bijnen, A. A., Houwen, R., & Buurman, W. A. (2011). Additional value of serum I-FABP levels for evaluating celiac disease activity in children. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 46(12), 1435-1441.
- (18) Not, T., Zibera, F., Vatta, S., Quaglia, S., Martelossi, S., Villanacci, V., ... & Ferrara, F. (2011). Cryptic genetic gluten intolerance revealed by intestinal antitransglutaminase antibodies and response to gluten-free diet. *Gut*, 60(11), 1487-1493.

- (19) Pelsers, M. M., Namiot, Z., Kisielewski, W., Namiot, A., Januszkiewicz, M., Hermens, W. T., & Glatz, J. F. (2003). Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clinical biochemistry*, 36(7), 529-535.
- (20) Rodríguez - Martín, L., Vaquero, L., & Vivas, S. (2015). Letter: serum I - FABP as marker for enterocyte damage in first - degree relatives of patients with coeliac disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 42(1), 121-122.
- (21) Derikx, J. P., Vreugdenhil, A. C., Van den Neucker, A. M., Grootjans, J., van Bijnen, A. A., Damoiseaux, J. G., ... & Buurman, W. A. (2009). A pilot study on the noninvasive evaluation of intestinal damage in celiac disease using I-FABP and L-FABP. *Journal of clinical gastroenterology*, 43(8), 727-733.
- (22) Adriaanse, M. P., Leffler, D. A., Kelly, C. P., Schuppan, D., Najarian, R. M., Goldsmith, J. D., ... & Vreugdenhil, A. C. (2016). Serum I-FABP detects gluten responsiveness in adult celiac disease patients on a short-term gluten challenge. *The American journal of gastroenterology*, 111(7), 1014-1022.
- (23) Tursi, A., Brandimarte, G., & Giorgetti, G. M. (2003). Lack of usefulness of anti-transglutaminase antibodies in assessing histologic recovery after gluten-free diet in celiac disease. *Journal of clinical gastroenterology*, 37(5), 387-391.
- (24) Abadie, V., Discepolo, V., & Jabri, B. (2012, July). Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 34, No. 4, pp. 551-566). Springer-Verlag.
- (25) Dufour, J. H., Dziejman, M., Liu, M. T., Leung, J. H., Lane, T. E., & Luster, A. D. (2002). IFN- γ -inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *The Journal of Immunology*, 168(7), 3195-3204.
- (26) Rashtak, S., & Murray, J. A. (2012). Review article: coeliac disease, new approaches to therapy. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 35(7), 768-781.
- (27) Bondar, C., Araya, R. E., Guzman, L., Rua, E. C., Chopita, N., & Chirido, F. G. (2014). Role of CXCR3/CXCL10 axis in immune cell recruitment into the small intestine in celiac disease. *PloS one*, 9(2), e89068.
- (28) D'haens, G., Ferrante, M., Vermeire, S., Baert, F., Noman, M., Moortgat, L., ... & Van Olmen, G. (2012). Fecal calprotectin is a surrogate marker for endoscopic lesions in inflammatory bowel disease. *Inflammatory bowel diseases*, 18(12), 2218-2224.

ANEXO I: Datos de pacientes

Clasificación	Paciente	Sexo	Edad	Marcadores genéticos (Riesgo)	Linfograma	ELISpot	Serología	Marcadores Histológicos (Marsh)	
Pacientes con sensibilidad al gluten no celiaca en sobrecarga	1	V	49	DQ2.2/DQ2.5 (Muy alto)	Compatible con EC en tratamiento	t=7 PT-gli: 158 t=14 PT-gli: 73	Sin datos	Sin datos	
	2	M	46	DQ2/DQ8 (Muy alto)	Normal	t=7 PT-gli: 4 t=14 PT-gli: 24	Sin datos	Sin datos	
	3	V	26	DQ6/DQ7.5 (Bajo)	Normal	t=7 PT-gli: 86 t=14 PT-gli:65	Sin datos	Sin datos	
	4	V	42	DQ2.2/DQ5 (Moderado)	Normal	t= 7 PT-gli: 30 t=14 PT-gli: 50	Sin datos	Sin datos	
	5	M	41	DQ6/DQ5 (Bajo)	Compatible con EC en tratamiento	t=7 PT-gli: 14,5 t=14 PT-gli:7,5	Sin datos	Sin datos	
Pacientes celiacos	Con gluten al diagnóstico	1	M	48	Sin datos	Compatible con EC	PT-gli: 11,5	Positiva	3c
		2	V	32	Sin datos	Compatible con EC	PT-gli: 16	Positiva	3
		3	V	39	DQ2.5/DQ8 (Muy alto)	Normal	PT-gli: 11	Positiva	3c
		4	M	90	DQ2.3/DQ7.5 (Bajo)	Compatible con EC	PT-gli: 69	Negativa	0
		5	M	18	DQ2.5/DQ7.5 (Alto)	Compatible con EC	PT-gli: 15	Positiva	3b
		6	M	46	DQ2.5/DQ2.5 (Muy alto)	Compatible con EC	PT-gli: 93	Positiva	Sin datos
		7	M	76	DQ5/DQ6 (Bajo)	Compatible con EC	PT-gli: 2	Negativa	Sin datos
		8	M	24	DQ2.5/DQ7.3 (Alto)	Normal (valores al límite con EC)	PT-gli:3	Positiva	3a
		9	M	47	Sin datos	Compatible con EC	PT-gli: 23,5	Negativa	Sin datos

Clasificación		Paciente	Sexo	Edad	Marcadores genéticos (Riesgo)	Linfograma	ELISpot	Serología	Marcadores Histológicos (Marsh)	
Pacientes celíacos	Sin gluten	1	M	49	Sin datos	Sin datos	PT-gli: 7,5	Sin datos	Sin datos	
		2	V	36	Sin datos	Sin datos	PT-gli: 57,5	Sin datos	Sin datos	
		3	M	Sin datos	Sin datos	Sin datos	PT-gli: 50	Sin datos	Sin datos	
		4	M	43	Sin datos	Sin datos	PT-gli: 8,5	Sin datos	Sin datos	
		5	V	27	DQ2.5/DQ2.5 (Muy alto)	Normal	Sin datos	Sin datos	Sin datos	
		6	M	Sin datos	Sin datos	Sin datos	PT-gli: 13,5	Sin datos	Sin datos	
		7	M	38	DQ6/DQ6 (Bajo)	Normal	PT-gli: 20	Negativa	Sin datos	
Controles	Voluntarios sanos	1	V	59	Sin datos	Sin datos	PT-gli:1	Sin datos	Sin datos	
		2	V	53	DQ2.5/DQ7.5 (Alto)	Sin datos	PT-gli:3,5	Sin datos	Sin datos	
		3	V	48	Sin datos	Sin datos	PT-gli:7,5	Sin datos	Sin datos	
		4	M	31	Sin datos	Sin datos	PT-gli: 21,5	Sin datos	Sin datos	
		5	V	Sin datos	Sin datos	Sin datos	PT-gli:18,5	Sin datos	Sin datos	
		6	M	Sin datos	Sin datos	Sin datos	PT-gli:17,5	Sin datos	Sin datos	
	Pacientes con EII	Paciente	Sexo	Edad	Diagnóstico previo	Calprotectina en heces				
		1	V	51	EII (Enfermedad de Crohn)	53,64				
		2	M	62	EII/ Diabetes tipo 2	54,94				
		3	V	56	EII	40,67				
		4	V	20	EII	26,52				
		5	M	66	EII	93,46				
		6	M	50	EII	29,15				