

**TRABAJO FIN DE GRADO**

Servicio de Digestivo HCUV

**FACTORES DE CONFUSIÓN EN LA  
INTERPRETACIÓN DEL LINFOGRAMA  
DUODENAL**



Nerea Martínez Bermejo

Tutor: Luis Fernández Salazar

Cotutora: Sandra Izquierdo Santervás

## ÍNDICE

1.	Resumen.....	3
2.	Introducción .....	4
3.	Objetivos.....	5
4.	Materiales y métodos .....	6
4.1.	Tipo de estudio y población a estudio .....	6
4.2.	Variables recogidas.....	6
4.3.	Clasificación de los pacientes según genética.....	7
4.4.	Análisis del linfograma duodenal .....	8
4.5.	Análisis estadístico.....	8
4.6.	Cuestiones éticas .....	8
5.	Resultados.....	9
5.1.	Descripción de la muestra .....	9
5.2.	Estudios de asociación y correlación de diferentes variables con el recuento de LIEs, CD3- y CD3+y $\delta$ . .....	10
5.3.	Estudios de asociación en función del resultado del linfograma con diferentes variables.....	13
6.	Discusión.....	15
7.	Conclusiones .....	19
8.	Bibliografía.....	19
9.	Anexo.....	23
10.	Agradecimientos.....	29

## 1. Resumen

**Introducción:** El diagnóstico de enfermedad celiaca (EC) puede ser difícil en un porcentaje pequeño de pacientes cuando hay discordancia entre histología y serología, o cuando algunos pacientes ya han iniciado dieta sin gluten. El análisis del linfograma duodenal mediante citometría de flujo puede ser una herramienta útil si se demuestra el llamado “inmunofenotipo celiaco” que consiste en un aumento de linfocitos TCR $\gamma\delta$  y un descenso de CD3- CD103+.

**Objetivos:** Identificar posibles factores que inducen un fenotipo típico de EC en la citometría de flujo de personas no celiacas.

**Materiales y métodos:** En este estudio, observacional retrospectivo, se estudiaron 116 pacientes procedentes del servicio de Digestivo de HCUV a los que se les practicó endoscopias con biopsia de duodeno que mostrase una mucosa duodenal sin atrofia de vellosidades y que contasen además con biopsia para citometría de flujo entre los años 2019 a 2023. Se excluyeron pacientes que estaban haciendo dieta sin gluten. Se recogieron variables clínicas y analíticas de cada paciente y se realizaron estudios de asociación y correlación con los diferentes parámetros analizados en el linfograma duodenal, concretamente con LIEs, linfocitos  $\gamma\delta$  y CD3-.

**Resultados:** Se encuentran más LIEs en las biopsias de las mujeres que en las de hombres: 10,6 (54,3) vs 8,2 (26,3) ( $p < 0,064$ ). Entre los pacientes que toman estatinas se encuentran mayor porcentaje de LIEs {12,2 (49,7) vs 10,1 (52,9)} ( $p < 0,04$ ); y mayor porcentaje de linfocitos CD3+ $\gamma\delta$  {8,5 (32,5) vs 4,2 (51,4)} ( $p < 0,021$ ). En los pacientes con linfocitosis duodenal en el examen histológico se encuentran mayor porcentaje de LIEs y menor porcentaje de CD3- ( $p < 0,021$  y  $p < 0,042$  respectivamente). Además, se halla una correlación positiva débil entre los LIEs y la edad ( $r = 0,197$ ,  $p < 0,034$ ). Del total de linfogramas analizados, la mayoría (82,8%) son linfogramas no compatibles con EC. Los pacientes que toman estatinas tienen un porcentaje mayor de linfogramas compatibles con EC activa (33,3% vs 8,7%) y un porcentaje mayor de linfogramas compatibles con EC en latencia o remisión (16,7% vs 4,8%) frente a los pacientes que no las toman ( $p < 0,006$ ). También encontramos un mayor porcentaje de linfogramas compatibles con EC activa entre los pacientes que toman Ara-II (40% vs 9,9%) aunque sin que el  $p$  valor alcance diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,105$ ).

**Conclusión:** En la interpretación del linfograma duodenal es conveniente tener en cuenta algunos factores que pueden alterar el número de linfocitos, como el tratamiento con estatinas que se asocia la elevación de LIEs y linfocitos  $\gamma\delta$ .

**Palabras clave:** linfograma duodenal, citometría de flujo, linfocitos intraepiteliales duodenales, TCR $\gamma\delta$ , CD3-.

## 2. Introducción

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía crónica de carácter autoinmune que se produce en individuos genéticamente predispuestos que desarrollan una reacción inmune en respuesta al gluten de la dieta. La EC afecta principalmente al intestino delgado; sin embargo, las manifestaciones clínicas son amplias, con síntomas intestinales y extraintestinales (1).

Se estima que la prevalencia mundial de la EC es del 1% con una proporción considerable de pacientes no diagnosticados y con un aumento en los últimos años del diagnóstico en adultos asintomáticos o paucisintomáticos (2).

El gluten está presente en cereales como el trigo, la cebada, la avena y el centeno. Las gliadinas son las proteínas principales del gluten, ricas en prolina y glutamina, cuya digestión por enzimas intestinales puede ser incompleta. Los péptidos resultantes, por un aumento de la permeabilidad intestinal pueden cruzar la barrera intestinal y desencadenar respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas (3,4).

La respuesta inmune adaptativa es la consecuencia de la presentación de los péptidos de gluten desaminados por la transglutaminasa, por las células presentadoras de antígenos junto a los complejos de histocompatibilidad HLA DQ2/DQ8, a las células T CD4+ en la lámina propia. Esta interacción desencadena una respuesta inflamatoria, donde intervienen citocinas y otras moléculas, produciendo hiperplasia de criptas y atrofia de las vellosidades intestinales (3).

Para el diagnóstico de la EC hay que valorar diferentes aspectos: si el paciente tiene síntomas típicos; autoanticuerpos IgA anti-transglutaminasa 2 (antiTG2), IgA anti-endomisio (antiEm) e Ig anti-péptidos de gliadina; genotipo HLA DQ2 o DQ8; daño en la mucosa intestinal en la biopsia y respuesta a dieta sin gluten (5). Sin embargo, aproximadamente un 10% de los casos son difíciles de diagnosticar porque hay una falta de concordancia entre las serologías y la histología, por ejemplo, en pacientes con mínimos cambios histológicos (linfocitosis duodenal, Marsh 1) y serologías positivas o viceversa; o en pacientes que ya han iniciado una dieta sin gluten sin tener un diagnóstico previo. La caracterización mediante citometría de flujo de los linfocitos intraepiteliales (LIEs) del duodeno es una herramienta muy útil que ayuda al diagnóstico de la EC, sobre todo en estos casos dudosos o difíciles de diagnosticar. El llamado "inmunofenotipo celíaco" se caracteriza por un aumento en la proporción de LIEs frente

a las células epiteliales, y característicamente existe un aumento de linfocitos TCR $\gamma\delta$  junto con un descenso del fenotipo NK CD3- 103+ (6,7).

Estudios inmunofenotípicos han demostrado que el incremento de LIEs es el resultado de la expansión de ambos tipos de linfocitos: los mayoritarios que tienen el receptor TCR $\alpha\beta$ , pero también de la población minoritaria, los que tienen el receptor TCR $\gamma\delta$ , que en una persona sana corresponden a menos de un 10% del total de LIEs, y en la EC aumentan a un 15-30% (8,9). Las células  $\gamma\delta$ , aunque son minoritarias, tienen papeles muy importantes en la protección de la mucosa frente a infecciones causadas por virus, bacterias y hongos, participan en la selección de la microbiota y en funciones inmunoregulatoras. A pesar de estas funciones beneficiosas, las células  $\gamma\delta$  T también pueden dañar las mucosas convirtiéndose en potentes amplificadores de la inflamación, empeorando así las respuestas alérgicas y autoinmunes. (10). Está bien establecido que un aumento de las células T $\gamma\delta$  es una característica específica de la sensibilidad al gluten y raramente ocurre en otras enteropatías (7,11).

Si bien la citometría de flujo es una prueba altamente especializada, se utiliza de forma rutinaria en un número creciente de hospitales en todo el mundo, no sólo en el estudio de investigación de la patogénesis de la EC, sino también como biomarcador de diagnóstico y pronóstico, en el seguimiento de la EC y sus complicaciones como es la EC refractaria. Se reconoce que el linfograma celíaco estudiado por citometría de flujo no proporciona un "gold standard" para el diagnóstico de EC, pero puede reforzar el diagnóstico cuando no está claro. La citometría de flujo requiere la obtención de una única biopsia duodenal de la segunda porción del duodeno, además de las obtenidas para el análisis histológico en el mismo procedimiento (12).

Eliminar radicalmente el gluten de la dieta es el único tratamiento disponible para la EC, aunque es extremadamente desafiante en la vida real. Evitar el gluten de la dieta facilita la reparación de la arquitectura de la mucosa, la normalización del número total de LIEs y la recuperación clínica y funcional (13).

### **3. Objetivos**

El objetivo principal de este trabajo es identificar los posibles factores que inducen un fenotipo típico de EC en la citometría de flujo de los linfocitos intraepiteliales de personas no celiacas. Concretamente los factores asociados a un incremento de los LIES, a un descenso de linfocitos CD3- y a un aumento de los linfocitos  $\gamma\delta$ .

## 4. Materiales y métodos

### 4.1. Tipo de estudio y población a estudio

Se trata de un estudio observacional retrospectivo, realizado en el Servicio de Digestivo del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (HCUV). Se han estudiado los 116 pacientes a los que se les había practicado una endoscopia con biopsia de duodeno que mostrase una mucosa duodenal sin atrofia de vellosidades y que contasen además con biopsia para citometría de flujo de linfocitos intraepiteliales duodenales entre los años 2019 a 2023. En caso de positividad de IgA anti-transglutaminasa o anti-endomisio la biopsia de duodeno no debiera mostrar anomalías (Marsh 0).

Se excluyeron los pacientes que tuviesen un diagnóstico previo de enfermedad celíaca o que hiciesen una dieta sin gluten en el momento de la endoscopia.

### 4.2. Variables recogidas

Los datos clínicos y de laboratorio de los 116 pacientes seleccionados fueron recogidos a partir de la plataforma JIMENA IV de SACYL y proceden de historias clínicas e informes de los servicios médicos y datos de los laboratorios de Análisis Clínicos, Microbiología e Inmunología y Anatomía Patológica. El análisis de citometría se hizo en el laboratorio de Inmunología de las mucosas del Departamento de Inmunología de la Universidad de Valladolid-IBGM.

Las variables estudiadas fueron las siguientes:

- Edad y sexo
- Toma de fármacos durante el período de tiempo en el que se realizó la biopsia: antagonistas del receptor de la angiotensina 2 (ARA II), estatinas, inhibidores de la bomba de protones (IBP) y metformina.
- Hallazgos en la gastroscopia y biopsias:
  - Biopsia duodenal:
    - Presencia de linfocitosis intraepitelial.
    - Hiperplasia de criptas.
    - Inflamación inespecífica de la lámina propia.
    - Grado de lesión del intestino según la clasificación de Marsh (1-5).
    - Presencia de *Helicobacter pylori* detectada en biopsias gástricas o con test de ureasa rápida.
- Datos de laboratorio recogidos solo si se obtuvieron 6 meses antes o después de la biopsia de duodeno: Hb, leucocitos, linfocitos, hierro, folatos. IgA antiTG2 y anti-Em.

- Riesgo genético de la EC (14).

Los linfogramas y porcentajes de linfocitos intraepiteliales (LIE CD45+), células i-NK (CD3-), y células T $\gamma\delta$  (CD3+TCR $\gamma\delta$ ) se obtuvieron de los informes procedentes del Departamento de Inmunología de la Universidad de Valladolid-IBGM (en el anexo 1 se muestra una copia un informe anonimizado con el esquema).

#### 4.3. Clasificación de los pacientes según genética

Los genes HLA-DQA1 y HLA-DQB1 codifican las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la proteína heterodimérica HLA-DQ. El genotipado de estos *loci* o la determinación de los alelos específicos que codifican DQ2.5 y DQ8 (*HLA-DQA1\*05*, *HLA-DQB1\*02*, *HLA-DQA1\*03* y *HLA-DQB1\*03:02*) constituyen la base de la prueba genética o test genético que puede ayudar en el diagnóstico de la EC por su elevado valor predictivo negativo (14). El riesgo a presentar EC cuantificado de 1 a 5 (de mayor a menor) varía en función del genotipo HLA-DQ presente, según la tabla:

1	Riesgo muy alto	Presencia de HLA- DQ2.5 con dos copias del alelo HLA-DQB1*02: DQ2.5/DQ2.5, DQ2.5/DQ2.2
2	Riesgo alto	Una sola copia del alelo HLA DQB1*02: DQ2.2/7.5, DQ2.5/DQ8, DQ2.5/7.5, DQ2.5/otro
		Homocigoto DQ8/DQ8
3	Riesgo moderado	Presencia del HLA-DQ8 y/o del alelo HLA-DQB1*02: DQ8/DQ2.2, DQ2.2/DQ2.2, DQ 8/DQ 7.5, DQ8/otro, DQ2.2/otro
4	Riesgo bajo	Presencia del alelo HLA-DQA1*05: DQ7.5/DQ7.5, DQ7.5/otro
5	No riesgo	Sin alelos de riesgo

Tabla 1. Clasificación de los pacientes en 5 grupos de riesgo en función de la genética que presentan (14).

#### 4.4. Análisis del linfograma duodenal

La citometría permitió cuantificar los LIEs respecto al número total de enterocitos, y las proporciones de linfocitos  $\gamma/\delta$  y de linfocitos CD3- con respecto al total de LIEs.

	NO COMPATIBLE CON EC	COMPATIBLE CON EC EN ACTIVIDAD	COMPATIBLE CON EC EN REMISIÓN /LATENTE
CD45+(LIE)	<15 ( $\pm 1,5$ ) %	>15 ( $\pm 1,5$ ) %	<15 ( $\pm 1,5$ ) %
CD3- (células i-NK)	>7 ( $\pm 1$ ) %	<7 ( $\pm 1$ ) %	>7 ( $\pm 1$ ) %
CD3+TCR $\gamma\delta$ (Células T $\gamma\delta$ )	<10 ( $\pm 1$ ) %	>10 ( $\pm 1$ ) %	>10 ( $\pm 1$ ) %

*Tabla 2. Análisis del Linfograma Duodenal por Citometría de Flujo. Valores de referencia de los fenotipos de linfocitos intraepiteliales en el duodeno establecidos por el IBGM y puntos de corte establecidos para considerar los resultados compatibles con enfermedad celiaca en actividad, en remisión o no compatibles con enfermedad celiaca.*

#### 4.5. Análisis estadístico

Para el manejo de los datos, se elaboró una base de datos anonimizada en el programa Excel. Para su análisis se empleó el programa estadístico SPSS.

Las variables continuas se expresaron con media y desviación estándar (DS) en caso de seguir una distribución normal o con mediana y rango en caso de no seguirla. Las variables discontinuas se expresaron con frecuencias absolutas y relativas.

Las variables de interés se compararon con diferentes variables mediante estudios de correlación de Spearman en caso de ser variables continuas, o comparando medianas y rangos con test U Mann Whittney o Kruskal Wallis. En caso de ser variables discontinuas se utilizó test de Chi Cuadrado con correlación de Fisher. Se tomó un valor de  $p < 0.05$  para considerar que hay significación estadística.

#### 4.6. Cuestiones éticas

El trabajo de Fin de Grado expuesto tuvo la aprobación del Comité Ético del Área de salud de Valladolid Este (anexo 3).



## 5. Resultados

### 5.1. Descripción de la muestra

En total se incluyeron 116 pacientes. Las características descriptivas de la muestra se resumen en la *Tabla 1*. La edad media de los pacientes fue 44,6 años. La mayoría de los pacientes eran mujeres (76,7%). Aunque se incluyen solo personas no celiacas, el riesgo genético moderado de presentar EC se daba en el 27,3%; el riesgo alto en el 38,2%; y el riesgo muy alto en el 12,7% de los 55 pacientes en quienes se investigó. Se excluyeron los casos de atrofia de vellosidades y casi todas las biopsias duodenales eran normales o mostraban una inflamación crónica inespecífica. En 71 pacientes se investigó la infección por *H. pylori*, detectándose solo en 10 (14,1%).

<b>CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PACIENTES</b>	
EDAD (n=116)	44,6 (17,1)
SEXO	
Hombre	27/116 (23,3%)
Mujer	89/116 (76,7%)
<b>FÁRMACOS</b>	
ARA II	5/116 (4,3%)
Ibersartán	1/5 (20%)
Telmisartán	1/5 (20%)
Valsartán	2/5 (40%)
Olmesartán	1/5 (20%)
IBP	36/116 (31%)
Omeprazol	27/36 (75%)
Esomeprazol	4/36 (11,1%)
Lansoprazol	5/36 (13,9%)
ESTATINAS	12/116 (10,3%)
Simvastatina	6/12 (50%)
Atorvastatina	4/12 (33,3%)
Pravastatina	1/12 (8,3%)
Rosuvastatina	1/12 (8,3%)
METFORMINA	6/116 (5,2%)
<b>GASTROSCOPIA</b>	
<b>RESULTADOS BIOPSIA</b>	
Presencia de linfocitos intraepiteliales	12/116 (10,3%)
Hiperplasia de criptas	1/116 (0,9%)
Presencia de inflamación inespecífica	53/116 (45,7%)
<b>CLASIFICACIÓN MARSH</b>	
Marsh 0	105/116 (90,5%)
Marsh 1	10/116 (8,6%)
Marsh 2	1/116 (0,9%)
H.PYLORI (n= 71)	
Negativo	61/71 (85,9%)
Positivo	10/71 (14,1%)

VALORES DE LABORATORIO	
AntiTG2 (U/ml) (n=105)	0,63 (49,4)
AntiTG2 positiva (n=105)	2/105 (1,9%)
Anti-Em positivo (n=65)	1/65 (1,5%)
IgA (mg/Dl) (n=90)	209 (3059,6)
Hemoglobina (g/dl) (n=94)	13,5 (10,2)
Leucocitos (células / $\mu$ l) (n=98)	6340 (10610)
Linfocitos (células/ $\mu$ l) (n=97)	2010 (4330)
Hierro ( $\mu$ g/dl) (n=91)	74 (153)
Folatos (ng/ml) (n=74)	5,6 (18,8)
RIESGO GENÉTICO	
Riesgo muy alto	7/55 (12,7%)
Riesgo alto	21/55 (38,2%)
Riesgo moderado	15/55 (27,3%)
Riesgo bajo	5/55 (9,1%)
No alelos de riesgo	7/55 (12,7%)
RESULTADOS LINFOGRAMA	
Linfograma normal	96/116 (82,8%)
Compatible con EC en actividad	13/116 (11,2%)
Compatible con EC latente/en remisión	7/116 (6%)
SUBTIPOS LINFOCITOS (%) (n=116)	
LIEs (CD45+)	10,3 (54,3)
CD3-	6,9 (35,1)
CD3+TCR $\gamma$ $\delta$	4,5 (51,4)

Tabla 3. Características descriptivas de lo muestra. Características generales de los pacientes. AntiTG2: anticuerpos antitransglutaminasa (se consideran positivos valores >10), AntiEm: anticuerpos antiendomisio, ARA II: antagonistas del receptor de la angiotensina II, IBP: inhibidor de la bomba de protones.

## 5.2. Estudios de asociación y correlación de diferentes variables con el recuento de LIEs, CD3- y CD3+y $\delta$ .

Se encuentra más LIEs en las biopsias de las mujeres que en las de los hombres: 10,6 (54,3) vs 8,2 (26,3), sin que el p-valor alcance la significación estadística ( $p < 0,064$ ); y en el grupo de pacientes que toman estatinas en comparación con el grupo que no las toman: 12,2 (49,7) vs 10,1 (52,9) con un  $p$  valor  $< 0,04$  como se muestra en la *Figura 1*. Similarmente, como se muestra en la *Figura 2*, también se encuentra un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de linfocitos CD3+y $\delta$  entre los pacientes que toman estatinas y los que no toman estatinas: 8,5 (32,5) vs 4,2 (51,4), siendo  $p < 0,021$ . También se muestran ciertas diferencias, aunque no estadísticamente significativas ( $p < 0,144$ ) entre el porcentaje de CD3+y $\delta$  y grupo de pacientes que toman

ARA-II y los que no toman ARA-II: 9 (16,2) vs 4,3 (51,4). No se encuentran diferencias en el % de linfocitos con el resto de los fármacos. Se muestran resultados en la *Tabla 4*.

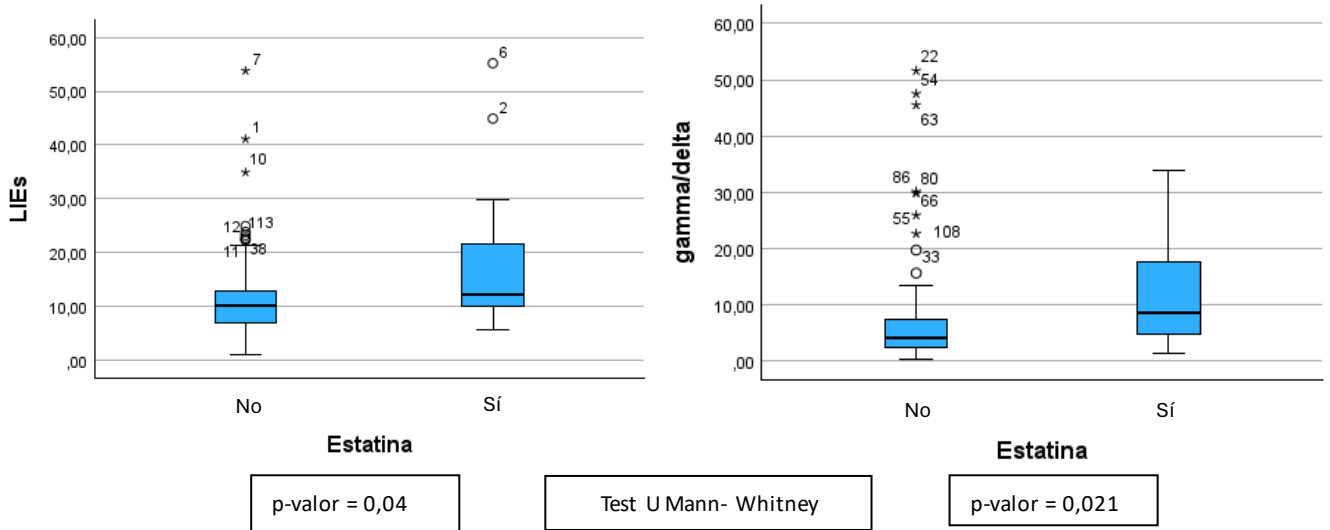
Se comprueba que los pacientes con linfocitosis duodenal (*Marsh 1*) en el examen histológico de la biopsia tienen más LIEs en el linfograma: 10,1 (52,9) vs 12,9 (48,8) con un p valor <0,021; y menor porcentaje de CD3-: 7,73 (35,1) vs 3 (23,9) con p valor <0,042; pero sin clara diferencia en el porcentaje de  $\gamma\delta$ .

No se encuentra asociación entre la detección de *H. pylori* con el porcentaje de los diferentes subtipos de linfocitos. Se muestran resultados en la *Tabla 4*.

		LIEs	P	CD3-	P	CD3+ $\gamma\delta$	p
Sexo	Hombres (27)	8,2 (26,3)	0,064	8,8 (34,9)	0,163	5,1 (51,2)	0,145
	Mujeres (89)	10,6 (54,3)		6,5 (33,1)		4,3 (46,8)	
Ara-II	NO (111)	10,3 (54,3)	0,744	7,1 (35,1)	0,886	4,3 (51,4)	0,144
	SÍ (5)	10,5 (24,8)		6,7 (14,6)		9 (16,2)	
Estatinas	NO (104)	<b>10,1 (52,9)</b>	<b>0,04</b>	7,2 (35,1)	0,2	<b>4,2 (51,4)</b>	<b>0,021</b>
	SÍ (12)	<b>12,2 (49,7)</b>		5,7 (14,2)		<b>8,5 (32,5)</b>	
IBP	NO (80)	10,2 (52,9)	0,7	8,6 (35,1)	0,113	4,6 (51,4)	0,725
	SÍ (36)	10,6 (51,7)		6,1 (26,9)		4,2 (33,2)	
Metformina	NO (110)	10,4 (54,3)	0,571	6,9 (35,1)	0,891	4,5 (51,4)	0,803
	SÍ (6)	8,8 (24,8)		6,9 (11,8)		5 (13,1)	
Linfocitosis duodenal	NO (104)	<b>10,1 (52,9)</b>	<b>0,021</b>	<b>7,73 (35,1)</b>	<b>0,042</b>	4,3 (51,4)	0,758
	SÍ (12)	<b>12,9 (48,8)</b>		<b>3 (23,9)</b>		4,9 (6,2)	
Infamación inespecífica	NO (63)	10,3 (44)	0,439	7,1 (30,1)	0,938	4,3 (50,6)	0,557
	SÍ (53)	10,5 (52,7)		6,7 (34,9)		4,5 (33,7)	
<i>H. pylori</i>	NO (61)	10,1 (5,9)	0,941	6,7 (34,9)	0,914	4 (47,3)	0,895
	SÍ (10)	10,2 (5,9)		6,3 (25,6)		4 (7,9)	
AntiEm	Negativos(64)	10,7 (52,7)	0,736	7,7 (34,5)	0,331	4,7 (50,6)	0,694
	Positivos (1)						
AntiTG2	Negativos(103)	10,5 (54,3)	0,639	6,7 (35,1)	0,149	4,8 (51,4)	0,174
	Positivos (2)	9,2 (0,4)		13,6 (2,7)		2,5 (3)	
Riesgo genético	Muy alto (7)	11,5 (38,9)	0,487	4,6 (10,8)	0,099	2,7 (45,9)	0,583
	Alto (21)	10,9 (19,6)		7,9 (30,1)		5,2 (44,7)	
	Moderado (15)	8,3 (29,8)		5,9 (15,6)		4,8 (32,5)	
	Bajo (5)	14,7 (34,1)		12,4 (25,5)		4,7 (13,9)	
	No alelos de riesgo (7)	9,6 (48,7)		6,2 (13,4)		3,6 (5,3)	

Test U Mann- Whitney y Kruskal Wallis

Tabla 4. Se muestra la asociación entre las diferentes variables discontinuas y el %LIEs, CD3- y CD3+yδ obtenidos del linfograma. Se realiza test de U-Mann-Whitney o Krussal Wallis (si son más de 2 muestras independientes), se muestran las medianas y rangos para cada grupo y los p valores obtenidos tras el análisis de asociación.



Figuras 1 y 2. Gráficos que representan las diferencias en el porcentaje de LIEs y CD3+yδ entre el grupo que no toma estatinas (0) y el grupo que toma estatinas (1).

Entre los estudios de correlación mostrados en la *Tabla 5*, solamente se halla una correlación positiva débil entre los LIEs y la edad ( $r=0,197$ ;  $p<0,034$ ). Ningún valor analítico se correlaciona con las diferentes poblaciones linfocitarias.

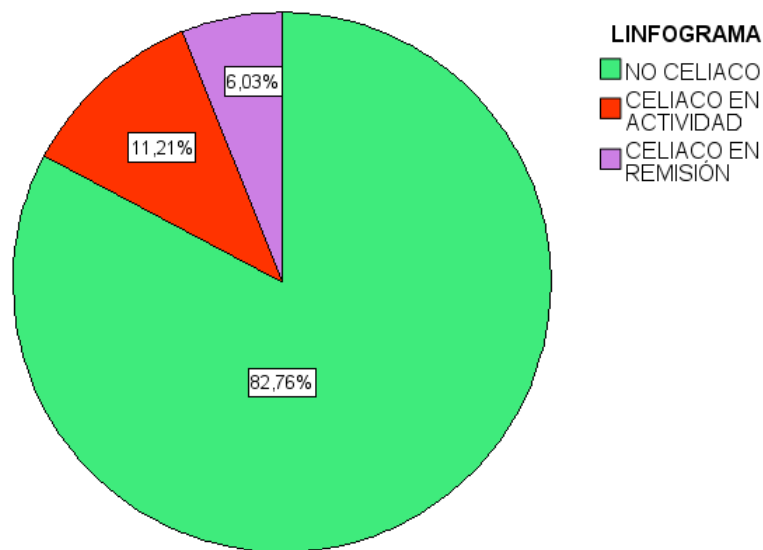
	LIEs		CD3-		CD3+yδ	
	rho	p	rho	p	rho	p
Edad (años) (116)	<b>0,197</b>	<b>0,034</b>	-0,055	0,558	-0,069	0,464
AntiTG2 (U/ml) (105)	-0,12	0,224	0,022	0,825	0,079	0,421
IgA (mg/dl) (89)	-0,048	0,657	-0,094	0,381	-0,041	0,7
Hb (g/dl) (94)	-0,05	0,632	-0,065	0,536	-0,079	0,451
Leucocitos (cél/s/μl) (98)	-0,014	0,889	0,106	0,298	-0,069	0,498
Linfocitos (cél/s/μl) (97)	-0,135	0,186	0,102	0,319	-0,024	0,814
Hierro (μg/dl) (91)	-0,063	0,551	-0,139	0,189	-0,101	0,341
Folatos (ng/ml) (74)	0,104	0,378	0,005	0,967	0,158	0,179

Correlación de Spearman

Tabla 5. Se muestra la correlación entre las diferentes variables continuas y el % LIEs, CD3-, CD3+yδ obtenidos del linfograma. Se realiza estudio de correlación de Spearman al tratarse de muestras no paramétricas. Se muestra el coeficiente de correlación (rho) y p valor para cada variable.

### 5.3. Estudios de asociación en función del resultado del linfograma con diferentes variables

Del total de linfogramas, la mayoría (82,8%) no presentaban valores considerados patológicos en el recuento de LIEs, CD3- y CD3+yδ como se muestra en la *Figura 3*. Tan sólo un 11,2% presentaban un linfograma compatible con EC en actividad y un 6% compatible con EC en latencia o remisión. Sin embargo, es importante tener en cuenta que ningún paciente realmente se ha diagnosticado como celíaco, son pacientes con biopsias normales, un Marsh 1, o con mínima inflamación inespecífica en la lámina propia.



*Figura 3. Diagrama de Sectores de los diferentes grupos de pacientes según resultados del linfograma.*

Se compara los grupos de pacientes que toman un determinado fármaco con los que no lo toman y se estudia la asociación con el resultado del linfograma según la clasificación hecha arriba.

Los pacientes que toman estatinas tienen un porcentaje mayor de linfogramas compatibles con EC activa (33,3% vs 8,7%) y un porcentaje mayor de linfogramas compatibles con EC en latencia o remisión: 16,7% vs 4,8% que los pacientes que no las toman ( $p < 0,006$ ). Los resultados se muestran en la *Tabla 6* y en la *Figura 4*.

En cuanto a la toma de fármacos Ara-II, se encuentra un mayor porcentaje de linfogramas compatibles con EC activa entre los 5 pacientes que toman estos antihipertensivos (40%) frente a los pacientes que no los toman (9,9%), pero sin que el *p valor* alcance diferencias significativas ( $p < 0,105$ ). También, los linfogramas normales

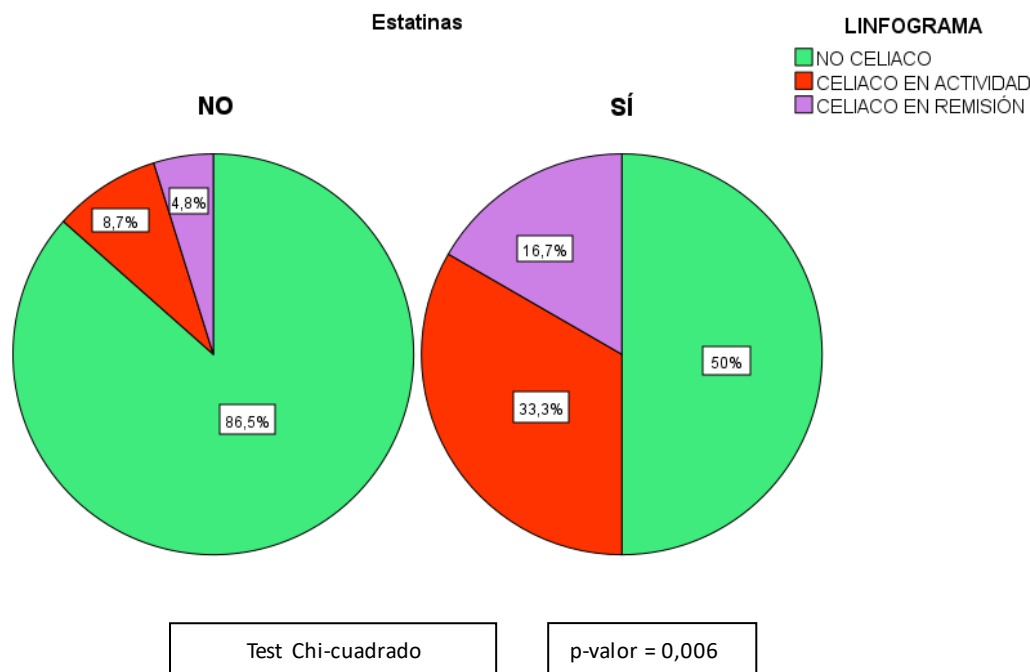
o no compatibles con EC son más frecuentes en el grupo de pacientes que no toman Ara-II (83,8% vs 60%). No se encuentran diferencias en el linfograma entre los 36 pacientes que toman IBP ni tampoco entre los 6 pacientes que toman metformina.

LINFOGRAMA	No ARA-II	Sí ARA-II	p
No compatible con EC	83,8% (93/96)	60% (3/96)	0,105
Compatible con EC activa	9,9% (11/13)	40% (2/13)	
Compatible con EC en remisión	6,3% (7/7)	0% (0/7)	
LINFOGRAMA	No ESTATINAS	Sí ESTATINAS	p
No compatible con EC	86,5% (90/96)	50% (6/96)	<b>0,006</b>
Compatible con EC activa	8,7% (9/13)	33,3% (4/13)	
Compatible con EC en remisión	4,8% (5/7)	16,7% (2/7)	
LINFOGRAMA	No IBP	Sí IBP	p
No compatible con EC	85% (68/96)	77,8% (28/96)	0,457
Compatible con EC activa	8,8% (7/13)	16,7% (6/13)	
Compatible con EC en remisión	6,3% (5/7)	5,6% (2/7)	
LINFOGRAMA	No METFORMINA	Sí METFORMINA	p
No compatible con EC	82,7% (91/96)	83,3% (5/96)	0,759
Compatible con EC activa	10,9% (12/13)	16,7% (1/13)	
Compatible con EC en remisión	6,4% (7/7)	0% (0/7)	

Test Chi-cuadrado

*Tabla 6. Se muestra tabla de contingencia de la variable “resultados de linfograma” con la toma o no de los diferentes fármacos. Se expresan como %dentro de Ara-II, estatinas, IBP y metformina y (recuento de pacientes que toman o no el fármaco / total de pacientes en cada subgrupo de linfograma). Se realiza Test Chi cuadrado con p valores asociados.*

Se estudian también si existe asociación entre los resultados de los linfogramas con los diferentes tipos de ARA-II (ibersartán, telmisartán, valsartán y olmesartán) y estatinas (simvastatina, atorvastatina, pravastatina y rosuvastatina), realizándose prueba Chi cuadrado con *p valor < 0,405* y *p valor < 0,423* respectivamente (no se muestran estos resultados en la tabla, sí en el *anexo2*).



*Figura 4. Diagrama de sectores que representa la proporción de cada tipo de linfograma compatible o no con Enfermedad Celíaca en actividad o remisión en los grupos de pacientes que toman estatinas y los que no las toman. Se adjuntan porcentajes en cada gráfico.*

## 6. Discusión

Este trabajo tiene como objetivo identificar qué factores influyen en los valores del linfograma duodenal en pacientes no celíacos. Concretamente qué factores pueden influir en el aumento de LIEs y en las proporciones de los diferentes subtipos linfocitarios que caracterizan el inmunofenotipo celíaco. En la literatura previa hay datos sobre diversas circunstancias que provocan lesiones histológicas similares a las de la EC (15); pero apenas se ha estudiado esto en la citometría de flujo.

El diagnóstico histológico de linfocitosis duodenal (Marsh 1, más de 25 LIEs por cada 100 enterocitos) se observa en la EC, pero no es específico de ésta, también aparece en otras enteropatías como infecciones gastrointestinales por *Helicobacter pylori* o *Giardia lamblia*, enfermedades autoinmunes, toma de AINES, IBPs, olmesartán, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), deficiencia de IgA (11,16,17). El 10% de nuestros pacientes presentaba un aumento de linfocitos intraepiteliales según el informe del servicio de Anatomía Patológica, un estadio Marsh 1 en caso de que hubieran sido celíacos.

La prevalencia de la infección por *H. pylori* en la población mundial es del 50% variando entre unos países y otros (18) y por tanto es un importante factor de confusión. Hay numerosos estudios sobre la infección por *H. pylori*, que la asocian con una histología

Marsh 1 y su erradicación lleva a una normalización del recuento de LIEs (8). Sin embargo, no hay asociación entre *H. pylori* y EC, ya que diferentes estudios han demostrado que la prevalencia de la infección es la misma en pacientes celíacos y no celíacos, incluso algunos estudios hablan de que podría ser un factor protector en la patogénesis de la EC (19,20).

Los resultados encontrados en nuestro estudio no muestran ningún cambio relevante respecto a la infección por *H. pylori*, siendo el %LIEs, CD3- y  $\gamma\delta$  similares en presencia y ausencia de infección. También es verdad que el número de pacientes con infección detectada está por debajo de lo esperado, tan sólo 10 pacientes positivos frente a 61 negativos, y además no se estudió en muchos pacientes. Esos 10 pacientes mostraron un linfograma no compatible con EC.

La duodenitis linfocítica está presente tan solo en el 3,8% de la población con serología celíaca negativa y solo un 16% de los casos de duodenitis linfocítica son diagnosticados de EC (8). Por otro lado, en casi el 10% de los casos de EC puede ser el primer signo como forma latente o potencial de EC (11). Nuestros datos muestran un menor número de linfocitos CD3- en los pacientes con duodenitis linfocítica, pero sin incremento de los linfocitos  $\gamma\delta$ . Los estudios genéticos facilitan interpretar estos resultados porque aproximadamente un 50% de pacientes con duodenitis linfocitaria (Marsh 1) presentan haplotipos HLA DQ2-DQ8 negativos, que dado su alto valor predictivo negativo, descarta con alta probabilidad la EC (17). En los pacientes incluidos en el estudio vemos que tan solo el 48% cuenta con el estudio genético. Este bajo porcentaje no supone mala práctica clínica, ya que no se trata de pacientes con atrofia de vellosidades y/o serología positiva. Vemos por otro lado dentro de este 48% un porcentaje muy superior al esperado de genética de riesgo probablemente por un sesgo en la selección (pacientes pertenecientes a grupos de riesgo como enfermedades autoinmunes o familiares de celíacos).

El linfograma celíaco consistente en el aumento de LIEs, descenso de CD3- y aumento de TCR $\gamma\delta$ + apoyaría el diagnóstico de EC (21). El linfograma que permite caracterizar estos linfocitos intraepiteliales no es necesario en el diagnóstico de formas claras de EC con atrofia de vellosidades y anti-TG2 positiva pero sí es útil en la valoración de otros pacientes en los que se sospecha la EC por atrofia de vellosidades pero serología negativa, con lesiones intestinales poco relevantes en la biopsia y serología positiva, o en pacientes que ya han iniciado una DSG (22). Una situación clínica especialmente confusa es en la que se plantea la sensibilidad al gluten no celíaca. En la valoración de estos pacientes solo contamos con sus síntomas y la relación con que se establece



entre estos y la ingesta del gluten, por lo que es imprescindible la identificación de biomarcadores.

La DSG es el único tratamiento de la EC y conduce a la desaparición de síntomas, negativización de anti-TG2 y resolución de la atrofia de las vellosidades intestinales. La DSG, sin embargo, aunque sí modifica el linfograma induciendo un descenso de los LIEs y un ascenso de los CD3-, no normaliza el aumento de las células TCR $\gamma\delta$ + que se mantiene con valores elevados en el celiaco a pesar del cumplimiento de la dieta. Estos hechos refuerzan la importancia que tiene ser consciente de la presencia o ausencia del gluten en la dieta al interpretar las diferentes pruebas diagnósticas iniciales de un paciente con sospecha de EC (23,24). La persistencia del aumento de los valores de células TCR $\gamma\delta$ + después de una DSG a largo plazo, abre la posibilidad de utilizar este biomarcador para confirmar la EC en pacientes que empezaron DSG y en los que la serología y la histología pueden no ser fiables (25). Es importante resaltar que no se incluyeron en el estudio pacientes que hacían DSG con el fin de obtener resultados más certeros para interpretar todas las pruebas diagnósticas, en especial el linfograma.

El linfograma permitiría, además, identificar la “enfermedad celíaca potencial” en el caso de pacientes con serología positiva y sin atrofia de vellosidades. De entre los linfogramas analizados, 13 presentan valores compatibles con EC activa y 7 compatibles con EC en remisión o latente, sin embargo, ninguno de ellos cumple criterios de EC. La proporción de linfocitos CD3- puede considerarse un marcador útil en el manejo de la EC potencial, un incremento persistente de linfocitos CD3- parecen proteger de la progresión hacia atrofia de vellosidades, mientras que la población de linfocitos  $\gamma\delta$  está persistentemente elevada en cualquier momento de la historia natural de la enfermedad (12,23). Al no contar con un seguimiento prospectivo no podemos determinar, por el momento, si se trata de formas potenciales de EC, pero nos inclinamos por la teoría de que otros factores están condicionando los resultados de la citometría de flujo.

De especial interés han sido los hallazgos encontrados en este estudio respecto a la toma de fármacos. El tratamiento con estatinas se asoció con mayor número de LIEs totales y un aumento de linfocitos  $\gamma\delta$ , así como con mayor número de “linfogramas de fenotipo celiaco”. Estas diferencias han sido estadísticamente significativas. Esta asociación no se había descrito hasta ahora, y sería interesante realizar más estudios sobre ello para desde un punto de vista clínico poder tenerlo en cuenta a la hora de valorar un linfograma en un paciente en el que se sospeche EC, y con esto disminuir la tasa de falsos positivos, y para estudiar los posibles efectos inmunes de las estatinas ya planteadas en otros procesos gastrointestinales (26–30).

No hemos encontrado diferencias en los linfogramas en relación con los IBPs ni con la metformina. Ya se habían relacionado la toma de IBPs con la EC en estudios previos. La posible disbiosis intestinal provocada por los IBPs se ha relacionado con la respuesta inflamatoria que parece estar implicada en la patogenia de la EC, particularmente en el contexto de pacientes con predisposición genética HLA-DQ2/DQ8 (20,31).

Respecto a los fármacos antihipertensivos ARA-II pueden intuirse ciertas diferencias respecto al % de CD3+ $\gamma\delta$  produciéndose un aumento en aquellos pacientes que toman el fármaco, y mayor % de linfogramas compatibles con EC, sin embargo, las diferencias no han resultado ser estadísticamente significativas. Probablemente se deba a un número de linfogramas reducido de pacientes que tomaban estos fármacos, siendo tan solo 5. Los ARA-II son capaces de inducir un cuadro idéntico a la EC, sobre todo se han descrito casos con el olmesartán (32,33) y se ha visto que puede aumentar el riesgo de desarrollar esta enfermedad (34), por lo que esperábamos encontrar resultados más firmes.

En nuestro trabajo, hemos encontrado una débil correlación entre la edad y los LIEs. La relación con la edad y resultados de citometría se comunicó previamente en un estudio que incluía pacientes pediátricos y adultos sanos. No se encontró variación en la proporción de TCR $\gamma\delta$ + en relación con la edad, pero sí un incremento de CD3- en menores de 3 años y en algunos pacientes ancianos (19).

El número de solicitudes de estudio de las poblaciones linfocitarias en la biopsia del duodeno y por tanto el número de pacientes que presentan un patrón celíaco es mayor en mujeres que en hombres. Esto se debe muy probablemente a la mayor prevalencia de EC en mujeres que en hombres, y por tanto mayor frecuencia en la sospecha clínica, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de linfocitos al comparar ambos sexos.

Se trata de un estudio retrospectivo con las limitaciones inherentes a esta metodología. Un número mayor de pacientes con técnicas diagnósticas de detección de *H. pylori*, más pacientes con estudio genético y en tratamiento con ARA-2 podría haber dado más información relevante. Sin embargo, podemos confirmar la influencia que las estatinas, y probablemente otros factores, tienen en los linfocitos intraepiteliales de la mucosa duodenal lo que no solo ayuda en la interpretación del linfograma ante la sospecha de la EC, también abre un área de investigación a desarrollar que puede tener implicaciones clínicas.

## 7. Conclusiones

En la interpretación del linfograma duodenal es conveniente tener en cuenta algunos factores que condicionen alteraciones en el número de linfocitos, como el tratamiento con estatinas que se asocia a la elevación de LIEs y linfocitos  $\gamma/\delta$ .

## 8. Bibliografía

1. Lebwohl B, Sanders DS, Green PHR. Coeliac disease. *The Lancet*. 2018 Jan 6;391(10115):70–81.
2. Elli L, Branchi F, Tomba C, et al. Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. *World J Gastroenterol*. 2015 Jun 21;21(23):7110–9.
3. Leonard MM, Sapone A, Catassi C, Fasano A. Celiac Disease and Nonceliac Gluten Sensitivity: A Review. *JAMA*. 2017 Aug 15;318(7):647–56.
4. Caio G, Volta U, Sapone A, et al. Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Med*. 2019 Jul 23;17:142.
5. Catassi C, Fasano A. Celiac Disease Diagnosis: Simple Rules Are Better Than Complicated Algorithms. *The American Journal of Medicine*. 2010 Aug 1;123(8):691–3.
6. Valle J, Morgado JMT, Ruiz-Martín J, et al. Flow cytometry of duodenal intraepithelial lymphocytes improves diagnosis of celiac disease in difficult cases. *United European Gastroenterol J*. 2017 Oct;5(6):819–26.
7. Nijeboer P, van Gils T, Reijm M, et al. Gamma-Delta T Lymphocytes in the Diagnostic Approach of Coeliac Disease. *J Clin Gastroenterol*. 2019;53(5):e208–13.
8. Al-Toma A, Volta U, Auricchio R, et al. European Society for the Study of Coeliac Disease (ESsCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. *United European Gastroenterol J*. 2019 Jun;7(5):583–613.
9. Vitale S, Picascia S, Gianfrani C. The cross-talk between enterocytes and intraepithelial lymphocytes. *Mol Cell Pediatr*. 2016 Jun 1;3:20.
10. Kang I, Kim Y, Lee HK. Double-edged sword:  $\gamma\delta$  T cells in mucosal homeostasis and disease. *Exp Mol Med*. 2023 Sep;55(9):1895–904.

11. Kakar S, Nehra V, Murray JA, et al. Significance of intraepithelial lymphocytosis in small bowel biopsy samples with normal mucosal architecture. *Am J Gastroenterol*. 2003 Sep;98(9):2027–33.
12. Roy G, Fernández-Bañares F, Corzo M, et al. Intestinal and blood lymphograms as new diagnostic tests for celiac disease. *Front Immunol*. 2023 Jan 10;13:1081955.
13. Leon F. Flow cytometry of intestinal intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *Journal of Immunological Methods*. 2011 Jan 5;363(2):177–86.
14. Núñez C, Garrote JA, Arranz E, et al. Recommendations to report and interpret HLA genetic findings in coeliac disease. *Rev Esp Enferm Dig [Internet]*. 2018 [cited 2024 Mar 26]; Available from: <https://online.reed.es/fichaArticulo.aspx?iarf=684763746236-414275197163>
15. Leonard MM, Lebwohl B, Rubio-Tapia A, Biagi F. AGA Clinical Practice Update on the Evaluation and Management of Seronegative Enteropathies: Expert Review. *Gastroenterology*. 2021 Jan;160(1):437–44.
16. Sergi C, Shen F, Bouma G. Intraepithelial lymphocytes, scores, mimickers and challenges in diagnosing gluten-sensitive enteropathy (celiac disease). *World J Gastroenterol*. 2017 Jan 28;23(4):573–89.
17. Aziz I, Evans KE, Hopper AD, Smillie DM, Sanders DS. A prospective study into the aetiology of lymphocytic duodenosis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2010;32(11–12):1392–7.
18. Hooi JKY, Lai WY, Ng WK, et al. Global Prevalence of Helicobacter pylori Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*. 2017 Aug;153(2):420–9.
19. Rostami-Nejad M, Javad Ehsani-Ardakani M, Assadzadeh H, et al. Pathological and Clinical Correlation between Celiac Disease and Helicobacter Pylori Infection; a Review of Controversial Reports. *Middle East J Dig Dis*. 2016 Apr;8(2):85–92.
20. McMillan A, Perez C, Brooks AE. A review of the long-term use of proton pump inhibitors and risk of celiac disease in the context of HLA-DQ2 and HLA-DQ8 genetic predisposition. *Medicine*. 2023 Sep 22;102(38):e35351.
21. Camarero C, Leon F, Sanchez L, Asensio A, Roy G. Age-Related Variation of Intraepithelial Lymphocytes Subsets in Normal Human Duodenal Mucosa. *Dig Dis Sci*. 2007 Mar 1;52(3):685–91.

22. Fernández-Bañares F, Crespo L, Núñez C, et al. Gamma delta+ intraepithelial lymphocytes and coeliac lymphogram in a diagnostic approach to coeliac disease in patients with seronegative villous atrophy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2020 Apr;51(7):699–705.
23. Camarero C, De Andrés A, García-Hoz C, et al. Assessment of Duodenal Intraepithelial Lymphocyte Composition (Lymphogram) for Accurate and Prompt Diagnosis of Celiac Disease in Pediatric Patients. *Clin Transl Gastroenterol.* 2021 Nov;12(11):e00426.
24. Popp A, Taavela J, Graziano P, et al. A New Intraepithelial  $\gamma\delta$  T-Lymphocyte Marker for Celiac Disease Classification in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) Duodenal Biopsies. *Digestive Diseases and Sciences.* 2021;66(10):3352.
25. Fernández-Bañares F, Carrasco A, Martín A, Esteve M. Systematic Review and Meta-Analysis: Accuracy of Both Gamma Delta+ Intraepithelial Lymphocytes and Coeliac Lymphogram Evaluated by Flow Cytometry for Coeliac Disease Diagnosis. *Nutrients.* 2019 Aug 23;11(9):1992.
26. Gaviola ML, Scribe EC, Leverett HN, Howard ML. Statin Effects on Incidence, Treatment Success, and Mortality of Clostridium difficile Infections. *J Pharm Pract.* 2020 Aug;33(4):497–505.
27. Park JH, Mortaja M, Son H, et al. Statin prevents cancer development in chronic inflammation by blocking interleukin 33 expression. *Res Sq.* 2023 Jan 12;rs.3.rs-2318750.
28. Su VYF, Pan SW, Yen YF, et al. Statin use and impact on tuberculosis risk. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2021 Sep;19(9):1093–8.
29. Tajbakhsh A, Gheibihayat SM, Askari H, et al. Statin-regulated phagocytosis and efferocytosis in physiological and pathological conditions. *Pharmacol Ther.* 2022 Oct;238:108282.
30. Lin TY, Lan WH, Chiu YF, et al. Statins' Regulation of the Virulence Factors of Helicobacter pylori and the Production of ROS May Inhibit the Development of Gastric Cancer. *Antioxidants (Basel).* 2021 Aug 16;10(8):1293.
31. Jang S, Lebwohl B, Abrams JA, et al. Celiac disease serology and gut microbiome following proton pump inhibitor treatment. *Medicine (Baltimore).* 2020 Aug 28;99(35):e21488.

32. Muñoz-Muñoz C, López-Vivancos J, Huaman W, García-Cors M. Sprue-like enteropathy due to olmesartan. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015 Oct;107(10):647–8.
33. Adike A, Corral J, Rybnicek D, et al. Olmesartan-Induced Enteropathy. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2016;12(4):230–2.
34. Basson M, Mezzarobba M, Weill A, et al. Severe intestinal malabsorption associated with olmesartan: a French nationwide observational cohort study. *Gut.* 2016 Oct;65(10):1664–9.

## 9. Anexo

Anexo 1. Copia de un informe de citometría de flujo anónimo procedente del Departamento de Inmunología de la Universidad de Valladolid-IBGM



Grupo de "Inmunología de las Mucosas"  
Facultad de Medicina  
Av. Ramón y Cajal nº7, 4ªPlanta  
47005, Valladolid



**Procedencia:** Hospital Clínico Universitario

**Servicio:** Aparato Digestivo



### LINFOGRAMA DUODENAL

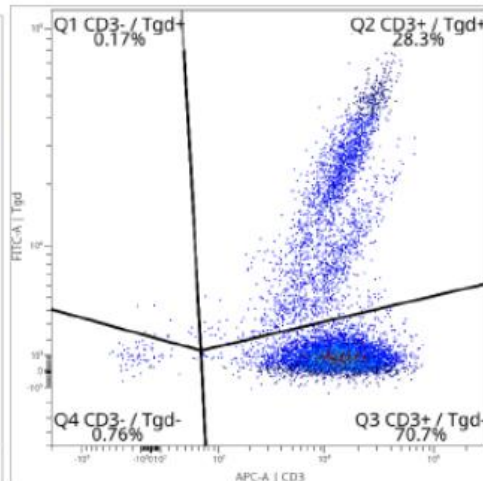
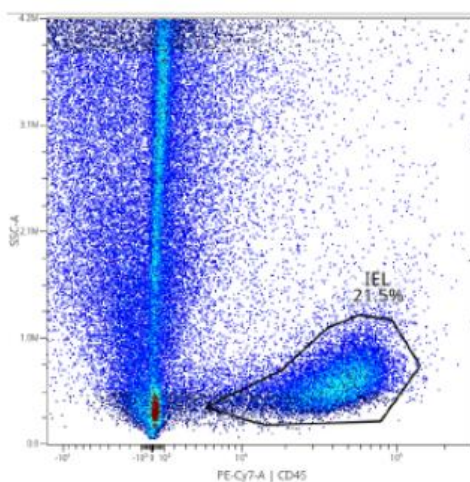
#### Enfermedad Celiaca

CD45+ (Linfocitos Intraepiteliales, LIE):  
CD3- (Células i-NK):  
CD3+TCRγδ (Células Tγδ):

Referencia	Actividad	Remisión/latente
<15 (± 1,5) %	>15 (± 1,5) %	<15 (± 1,5) %
>7 (± 1) %	<7 (± 1) %	>7 (± 1) %
<10 (± 1) %	>10 (± 1) %	>10 (± 1) %

#### RESULTADOS:

CD45+ (Linfocitos Intraepiteliales, LIE): 21,5 % / total de células del epitelio  
CD3- (Células i-NK): 0,76 % / total de LIE  
CD3+TCRγδ (Células Tγδ): 28,3 % / total de LIE



#### INTERPRETACIÓN:

Linfograma compatible con una enfermedad celiaca en actividad.

#### OBSERVACIONES:

Análisis realizado en muestras criopreservadas.

### Funcionamiento de la citometría de flujo

La citometría de flujo es una tecnología que permite analizar y cuantificar de manera simultánea múltiples características celulares a medida que son transportadas en un fluido e incididas por un haz de luz. El citómetro de flujo mide el tamaño y la granularidad de la célula, así como la fluorescencia relativa de la misma. Estas características se determinan usando un sistema óptico acoplado a un procedimiento electrónico que graba la manera en que la célula dispersa el haz de luz y emite fluorescencia. Se marcan las células con anticuerpos monoclonales que están acoplados a fluorocromos, y cuando son excitados, emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda; que es lo que se lee y se mide mediante el sistema electrónico.

Los resultados se representan mediante gráficos de puntos como vemos en el informe de arriba. En el diagrama de la izquierda se representan los LIEs totales que se han reconocido en el citómetro de flujo mediante el marcador CD45+. Seleccionamos esta población de LIEs totales, y representamos otro diagrama, el de la derecha, el más importante, en el que se muestran la relación entre dos marcadores diferentes CD3- y Tgd, en función de si expresan uno u otro, ninguno o los dos.

Este gráfico se divide en 4 cuadrantes:

- En el cuadrante inferior derecho se representa la población CD3+, Tgd-.
- En el cuadrante superior derecho se representa la población CD3+, Tgd+ que muestran una relación lineal.
- En el cuadrante inferior izquierdo se representa la población CD3-, Tgd-
- En el cuadrante superior izquierdo se representan los CD3-. Tgd+, prácticamente inexistentes.

El propio sistema electrónico del citómetro proporciona el % de cada tipo de población linfocitaria que detecta en función de sus marcadores CD3 y Tgd; y estos porcentajes son los que se usan para interpretar en su conjunto el linfograma deduciendo si puede ser compatible o no con enfermedad celiaca.



**Anexo 2. Estudios de asociación de los diferentes subtipos de estatinas y Ara-II con resultados de linfograma.**

ESTATINAS					
LINFOGRAMA	SIMVASTATINA	ATORVASTATINA	PRAVASTATINA	ROSUVASTATINA	p
No compatible con EC	50% (3/6)	75% (3/6)	0% (0/6)	0% (0/6)	0,423
Compatible con EC activa	33,3% (2/4)	0% (0/4)	100% (1/4)	100% (1/4)	
Compatible con EC en remisión	16,7% (1/2)	25% (1/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	

Test Chi-cuadrado

*Tabla 7. Se muestra tabla de contingencia de la variable “resultados de linfograma” con la toma de los diferentes tipos de estatinas. Se expresan como %dentro de cada tipo de estatinas y entre paréntesis el recuento de pacientes que toman el fármaco / total de pacientes en cada subgrupo de linfograma. Se realiza Test Chi cuadrado con p valor no significativo.*

ARA-II					
LINFOGRAMA	IBERSARTÁN	TELMISARTÁN	VALSARTÁN	OLMESARTÁN	p
No compatible con EC	0% (0/3)	100% (1/3)	50% (1/3)	100% (1/3)	0,405
Compatible con EC activa	100% (1/2)	0% (0/2)	50% (1/2)	0% (0/2)	
Compatible con EC en remisión	0% (0)	0% (0)	0% (0)	0% (0)	

Test Chi-cuadrado

*Tabla 8. Se muestra tabla de contingencia de la variable “resultados de linfograma” con la toma de los diferentes tipos de ARA-II. Se expresan como %dentro de cada tipo de Ara-II y entre paréntesis el recuento de pacientes que toman el fármaco / total de pacientes en cada subgrupo de linfograma. Se realiza Test Chi cuadrado con p valor no significativo.*

## Anexo 4. Aprobación de la Sociedad Española de Patología Digestiva para la presentación del trabajo como comunicación oral breve en el Congreso Nacional de Junio de 2024.



Estimado/a Dr./Dra. Sandra Izquierdo Santervás,

Nos complace comunicarle que su comunicación "[240392] OB038 FACTORES DE CONFUSIÓN EN LA INTERPRETACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO DUODENAL" ha sido **ACEPTADA** para su presentación "Oral breve" en el 83º Congreso de la Sociedad Española de Patología Digestiva, en la sesión "SESIÓN COMUNICACIONES ORALES BREVES - TRACTO ESÓFAGO-GASTRO-INTESTINAL", que tendrá lugar "en la Sala 2" el día 14/06/2024 a las 11:45h.

Si precisa actualizar algún dato o introducir alguna imagen/tabla, podrá hacerlo hasta el día 10/04/2024 a las 23:59 horas.

Es imprescindible nos confirme aceptación y consentimiento a la grabación y difusión de la presentación, enviando un correo electrónico a [secretariatecnica@sepd.es](mailto:secretariatecnica@sepd.es) indicando en el ASUNTO el ID y título de la comunicación.

Para la emisión del certificado de la comunicación, es necesario que el presentador esté inscrito en el congreso, le rogamos revise las [normas de presentación](#) correspondientes.

Si es usted médico/a o investigador/a joven (de hasta 40 años), puede solicitar a través del gestor de comunicaciones, una [beca FEAD](#) consistente en una inscripción gratuita al 83º Congreso de la Sociedad Española de Patología Digestiva.

Si tiene alguna consulta, no dude en ponerse en contacto con la secretaría técnica: [secretariatecnica@sepd.es](mailto:secretariatecnica@sepd.es)

## **10. Agradecimientos**

Expreso mi más sincero agradecimiento a mi tutor de TFG, Luis Ignacio Fernández Salazar, jefe del servicio de Aparato Digestivo del HCUV y profesor de la Universidad de Valladolid. Gracias por su labor y ayuda, por cada pregunta respondida, por haberme guiado en este proyecto. También agradecer a mi cotutora Sandra Izquierdo Santervás, por haberme proporcionado la información y datos necesarios para realizar este trabajo. Y, por supuesto, también mencionar a Aida Fiz, investigadora en el Instituto de Biomedicina y Genética Molecular (IBGM). Gracias por el tiempo dedicado a explicarme su trabajo, por ayudarme a entender el funcionamiento de la citometría de flujo y por los recursos proporcionados. Por último, gracias a mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

## INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de enfermedad celíaca (EC) puede ser difícil en un porcentaje pequeño de pacientes cuando hay discordancia entre histología y serología, o cuando algunos pacientes ya han iniciado dieta sin gluten. El análisis del linfograma duodenal mediante citometría de flujo puede ser una herramienta útil si se demuestra el llamado "inmunofenotipo celíaco" que se caracteriza por un aumento en la proporción de linfocitos intraepiteliales (LIEs), y característicamente existe un aumento de linfocitos TCR $\gamma\delta$  y un descenso del fenotipo NK CD3- CD103+.

## OBJETIVO

Identificar los posibles factores que inducen un fenotipo típico de EC en la citometría de flujos de personas no celíacas. Concretamente los factores asociados a un incremento de los LIEs, a un descenso de linfocitos CD3- y a un aumento de los linfocitos  $\gamma\delta$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

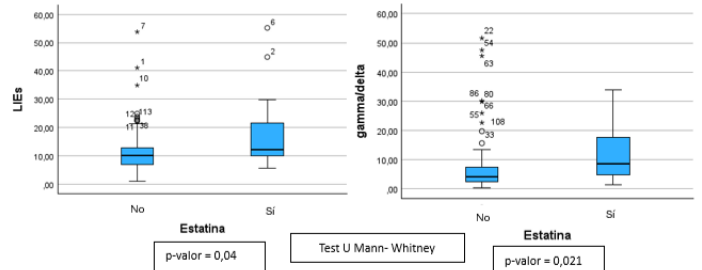
Se trata de un estudio observacional retrospectivo, se estudiaron 116 pacientes a los que se les practicó endoscopias con biopsia de duodeno que mostrase una mucosa sin atrofia de vellosidades y que contasen además con biopsia para citometría de flujo. Se excluyeron pacientes que tuviesen un diagnóstico previo de EC y aquellos que estaban haciendo dieta sin gluten. Se recogen variables clínicas y analíticas de cada paciente y se realizaron estudios de asociación y correlación con los diferentes parámetros del linfograma, concretamente LIEs, linfocitos  $\gamma\delta$  y CD3-.

## RESULTADOS

La edad media de los pacientes fue 44,6 años. La mayoría eran mujeres (76,7%). En el análisis histológico de las biopsias, un 10,3% mostraron linfocitosis duodenal, se excluyeron los casos de atrofia de vellosidades y casi todas las biopsias duodenales eran normales o mostraban una inflamación crónica inespecífica. La antiTG2 fue positiva en sólo un 1,9% de los pacientes. En 71 pacientes se investigó la infección por *H. pylori*, detectándose solo en 10 de ellos (14,1%). Aunque se incluyen solo personas no celíacas, el riesgo genético moderado de presentar EC se daba en el 27,3%; riesgo alto en el 38,2%; o riesgo muy alto en el 12,7% de los 55 pacientes en quienes se investigó.

		LIEs	p	CD3-	P	CD3+ $\gamma\delta$	p
Sexo	Hombres (27)	8,2 (26,3)	0,064	8,8 (34,9)	0,163	5,1 (51,2)	0,145
	Mujeres (89)	10,6 (54,3)		6,5 (33,1)		4,3 (46,8)	
Ara-II	NO (111)	10,3 (54,3)	0,744	7,1 (35,1)	0,886	4,3 (51,4)	0,144
	SÍ (5)	10,5 (24,8)		6,7 (14,6)		9 (16,2)	
Estatinas	NO (104)	10,1 (52,9)	0,04	7,2 (35,1)	0,2	4,2 (51,4)	0,021
	SÍ (12)	12,2 (49,7)		5,7 (14,2)		8,5 (32,5)	
IBP	NO (80)	10,2 (52,9)	0,7	8,6 (35,1)	0,113	4,6 (51,4)	0,725
	SÍ (36)	10,6 (51,7)		6,1 (26,9)		4,2 (33,2)	
Metformina	NO (110)	10,4 (54,3)	0,571	6,9 (35,1)	0,891	4,5 (51,4)	0,803
	SÍ (6)	8,8 (24,8)		6,9 (11,8)		5 (13,1)	
Linfocitosis duodenal	NO (104)	10,1 (52,9)	0,021	7,73 (35,1)	0,042	4,3 (51,4)	0,758
	SÍ (12)	12,9 (48,8)		3 (23,9)		4,9 (6,2)	
Inflamación inespecífica	NO (63)	10,3 (44)	0,439	7,1 (30,1)	0,938	4,3 (50,6)	0,557
	SÍ (53)	10,5 (52,7)		6,7 (34,9)		4,5 (33,7)	
<i>H. pylori</i>	NO (61)	10,1 (5,9)	0,941	6,7 (34,9)	0,914	4 (47,3)	0,895
	SÍ (10)	10,2 (5,9)		6,3 (25,6)		4 (7,9)	
AntiEm	Negativos (64)	10,7 (52,7)	0,736	7,7 (34,5)	0,331	4,7 (50,6)	0,694
	Positivos (1)						
AntiTG2	Negativos (103)	10,5 (54,3)	0,639	6,7 (35,1)	0,149	4,8 (51,4)	0,174
	Positivos (2)	9,2 (0,4)		13,6 (2,7)		2,5 (3)	
Riesgo genético	Muy alto (7)	11,5 (38,9)	0,487	4,6 (10,8)	0,099	2,7 (45,9)	0,583
	Alto (21)	10,9 (19,6)		7,9 (30,1)		5,2 (44,7)	
	Moderado (15)	8,3 (29,8)		5,9 (15,6)		4,8 (32,5)	
	Bajo (5)	14,7 (34,1)		12,4 (25,5)		4,7 (13,9)	
	No alelos de riesgo (7)	9,6 (48,7)		6,2 (13,4)		3,6 (5,3)	

Test U Mann-Whitney y Kruskal Wallis



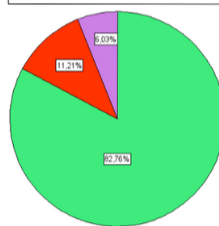
LINFOGRAMA	No ARA-II	Sí ARA-II	p
No compatible con EC	83,8% (93/96)	60% (3/96)	0,105
Compatible con EC activa	9,9% (11/13)	40% (2/13)	
Compatible con EC en remisión	6,3% (7/7)	0% (0/7)	
LINFOGRAMA	No ESTATINAS	Sí ESTATINAS	p
No compatible con EC	86,5% (90/96)	50% (6/96)	0,006
Compatible con EC activa	8,7% (9/13)	33,3% (4/13)	
Compatible con EC en remisión	4,8% (5/7)	16,7% (2/7)	
LINFOGRAMA	No IBP	Sí IBP	p
No compatible con EC	85% (68/96)	77,8% (28/96)	0,457
Compatible con EC activa	8,8% (7/13)	16,7% (6/13)	
Compatible con EC en remisión	6,3% (5/7)	5,6% (2/7)	
LINFOGRAMA	No METFORMINA	Sí METFORMINA	p
No compatible con EC	82,7% (91/96)	83,3% (5/96)	0,759
Compatible con EC activa	10,9% (12/13)	16,7% (1/13)	
Compatible con EC en remisión	6,4% (7/7)	0% (0/7)	

Test Chi-cuadrado

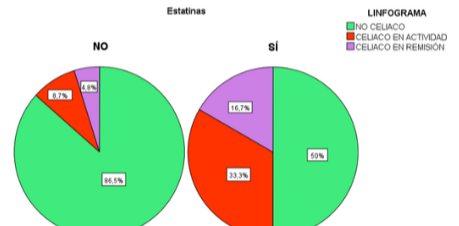
	LIEs		CD3-		CD3+ $\gamma\delta$	
	rho	p	rho	p	rho	p
Edad (años) (116)	0,197	0,034	-0,055	0,558	-0,069	0,464
AntiTG2 (U/ml) (105)	-0,12	0,224	0,022	0,825	0,079	0,421
IgA (mg/dl) (89)	-0,048	0,657	-0,094	0,381	-0,041	0,7
Hb (g/dl) (94)	-0,05	0,632	-0,065	0,536	-0,079	0,451
Leucocitos (célis/ $\mu$ l) (98)	-0,014	0,889	0,106	0,298	-0,069	0,498
Linfocitos (célis/ $\mu$ l) (97)	-0,135	0,186	0,102	0,319	-0,024	0,814
Hierro ( $\mu$ g/dl) (91)	-0,063	0,551	-0,139	0,189	-0,101	0,341
Folatos (ng/ml) (74)	0,104	0,378	0,005	0,967	0,158	0,179

Correlación de Spearman

Clasificación del total de pacientes según linfograma



Clasificación del linfograma según toma o no de estatinas



## CONCLUSIONES

En la interpretación del linfograma duodenal es conveniente tener en cuenta algunos factores que condicionen alteraciones en el número de linfocitos, como el tratamiento con estatinas que se asocia a la elevación de LIEs y linfocitos  $\gamma\delta$ .

## BIBLIOGRAFÍA

- Lebwohl B, Sanders DS, Green PHR. Coeliac disease. The Lancet. 2018 Jan 6;391(10115):70–81.
- Elli L, Branchi F, Tomba C, et al. Diagnosis of gluten related disorders: Celiac disease, wheat allergy and non-celiac gluten sensitivity. World J Gastroenterol. 2015 Jun 21;21(23):7110–9.
- Leonard MM, Sapone A, Catassi C, Fasano A. Celiac Disease and Nonceliac Gluten Sensitivity: A Review. JAMA. 2017 Aug 15;318(7):647–56.