

PROYECTO DE FIN DE GRADO EN BIOLOGÍA

**Estudio descriptivo observacional  
retrospectivo desde Mayo de 2012 a Abril de  
2014 en pacientes pediátricos con sospecha  
de enfermedad celíaca en el Área Sanitaria de  
A Coruña**

Departamento de Biología celular y Molecular  
Servicio de Inmunología Hospital Teresa Herrera

***Autor: Juan Carlos Vázquez Ucha***

***Tutoras: Dra. Esther Rodríguez Belmonte***

***Dra. Pilar Sánchez Mozo***



## TRABAJO FIN DE GRADO

Dra. Esther Rodríguez Belmonte y Dra. Pilar Sánchez Mozo autorizan la presentación del trabajo de fin de grado **“Estudio descriptivo observacional retrospectivo desde Mayo de 2012 a Abril de 2014 en pacientes pediátricos con sospecha de enfermedad celíaca en el Área Sanitaria de A Coruña”** presentado por **Juan Carlos Vázquez Ucha** para su defensa ante el tribunal calificador.

En A Coruña, a 22 de Julio de 2014

Fdo.: Dra. Esther Rodríguez Belmonte

Dra. Pilar Sánchez Mozo

## Resumen

La enfermedad celiaca ha ganado gran popularidad en los últimos años estando presente en la humanidad desde hace siglos. El conocimiento de la enfermedad celiaca (EC) ha evolucionado mucho en las últimas décadas, pudiendo saber cómo se produce, qué factores afectan a su aparición y qué síntomas y signos se manifiestan. Esto ha permitido diferenciar varios tipos de EC según el cuadro clínico, así como identificar grupos de riesgo que pueden ser susceptibles a la enfermedad, consiguiendo con la aparición de nuevas pruebas una gran rapidez en el diagnóstico. El objetivo de este trabajo es conocer la incidencia de la EC en individuos pediátricos en el Área Sanitaria de A Coruña, así como obtener diversos datos de la enfermedad en cuanto al sexo, grupos de edad, presentación clínica... que nos acerquen al perfil más común. Los resultados obtenidos muestran una incidencia elevada de la EC en A Coruña, 34,92 casos por cada 100.000 personas-año, siendo la enfermedad más común en mujeres, existiendo diferencias en la presentación clínica atendiendo a la edad, apareciendo síntomas gastrointestinales en niños de temprana edad, y desarrollándose enfermedades asociadas en un pequeño número de pacientes. Aparecen diferencias en la genética de los distintos pacientes, así como en el resultado de las pruebas histológicas, no obstante muchos aspectos de la EC se nos escapan debido al número reducido de casos encontrados así como al reducido tiempo del estudio (2 años) por lo que a pesar de mostrárenos una visión cercana de la enfermedad un conocimiento completo requeriría un esfuerzo mayor.

## Índice

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes históricos.....	1
1.2 Concepto y definición.....	2
1.3 Etiopatogenia.....	2
1.3.1 Factores genéticos.....	4
1.3.2 Factores ambientales.....	5
1.4 Epidemiología.....	6
1.5 Manifestaciones clínicas.....	7
1.6 Formas clínicas.....	7
1.7 Grupos de riesgo.....	9
1.8 Diagnóstico.....	10
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1 Pacientes.....	14
3.2 Variables estudiadas.....	14
3.3 Técnicas empleadas.....	15
3.3.1 Ensayos serológicos.....	15
3.3.2 Ensayos genéticos.....	17
3.3.3 Ensayos histológicos.....	20
3.4 Estudio de la incidencia.....	21
3.5 Análisis estadístico de los datos.....	21
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>5. DISCUSIÓN.....</b>	<b>29</b>
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>7. AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>33</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>34</b>

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes históricos

Hace aproximadamente unos 10.000 años, momento en el que el ser humano comenzó a adoptar el sedentarismo, surgen las primeras siembras y recolecciones de cereales, fundamentalmente de trigo. A partir de este instante comienza a aparecer la condición celíaca en la humanidad (Greco, 1997; Losowsky, 2008; Kasarda, 2013). No obstante, no es hasta el siglo II d.C cuando se describe por primera vez el estado celíaco, al que Areteo de Capadocia hizo referencia para hablar de sujetos desnutridos, con deposiciones abundantes y malolientes (Dowd & Walker-Smith, 1974; Paveley, 1988; Aparicio, 2010). La palabra griega utilizada por Areteo fue *koiliakos*, que originariamente quiere decir “los que sufren del intestino” (Dowd & Walker-Smith, 1974; Aparicio, 2010).

Hubo que esperar varios siglos para la aparición de una descripción completa de la enfermedad celíaca (EC), ésta fue realizada por Samuel Gee en 1888 que además proponía como método para la curación de la enfermedad el establecimiento de una dieta sin cereales (Tommasini *et al.* 2011; Ros Arnal, 2013).

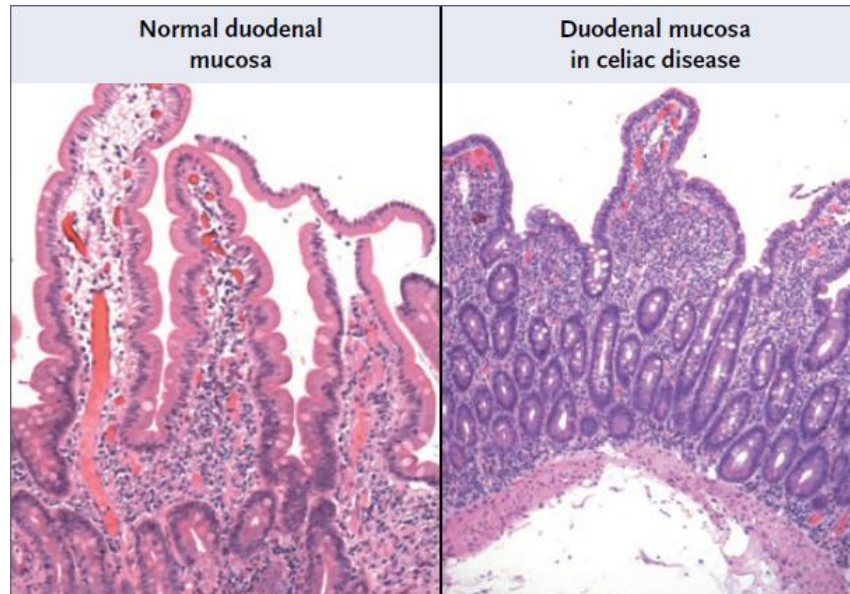
En las primeras décadas del siglo XX diversos autores profundizaron en el análisis de múltiples casos clínicos de la enfermedad, aunque desconocían si ésta presentaba un origen infeccioso, congénito o alérgico (Paveley, 1988; Losowsky, 2008; García Nieto, 2013).

A mediados del siglo XX W. K. Dicke dedujo que el agente causante de la enfermedad era el trigo (junto al centeno y la cebada), para ello se basó en la evolución de la epidemiología de la enfermedad que él mismo observó en sus pacientes pediátricos durante la II Guerra Mundial, donde el carecimiento de alimentos básicos, como el pan, produjo un descenso del número de pacientes que mostraban los síntomas típicos de la EC (Paveley, 1988; van Berge-Henegouwen & Mulder 1993; Losowsky, 2008). Dicke además estableció dietas severas libres de trigo que obtenían un gran resultado en la mejora de pacientes aquejados de la enfermedad (van Berge-Henegouwen & Mulder, 1993). En 1950 Dicke, junto a Weijers y Van de Kamer, demostraron que la malabsorción en pacientes con EC era debida a una fracción del trigo, la fracción gluten; sin embargo, el artículo no fue publicado hasta 1953 debido a la reticencia de algunos científicos americanos a que el gluten fuera realmente el agente causante de la EC (van Berge-Henegouwen & Mulder 1993; García Nieto, 2013; Ros Arnal, 2013). En la misma etapa John Paulley (1954) introduce y generaliza la biopsia intestinal afirmando que “la dificultad de obtener un material satisfactorio postmortem y la posibilidad de cambios autolíticos después de la muerte hace necesaria la obtención de material mediante biopsia para la investigación”, describiendo al mismo tiempo la característica atrofia vellositaria que origina la enfermedad (Paveley, 1988; Aparicio, 2010; García Nieto, 2013). A partir de los años 60-70 y hasta la actualidad, se ha progresado enormemente en el conocimiento de la EC, así como en su etiología, patogenia, inmunopatología, epidemiología y diagnóstico (términos a los que nos referiremos en los siguientes apartados). Todo ello derivado de grandes avances científicos conseguidos en campos como la genética, la inmunología y la medicina (Losowsky, 2008; Tommasini *et al.*, 2011).

## 1.2 Concepto y definición

Actualmente se define la EC como una enteropatía autoinmune que presenta una intolerancia permanente a la fracción proteica del gluten (gliadinas, secalinas y hordeínas). La EC afecta a individuos genéticamente predispuestos mostrando un cuadro clínico variable, presentando generalmente malabsorción y atrofia vellositaria con hiperplasia de las criptas e infiltrado inflamatorio (tanto a nivel del epitelio como de la lámina propia del intestino delgado) (Figura 1) (Alaedini & Green, 2005; Kagnoff, 2007; López-Casado, 2009).

**Figura 1. Mucosa intestinal normal y mucosa intestinal en EC. Tomado de Green & Cellier, 2007.**



## 1.3 Etiopatogenia

Actualmente se considera que la etiopatogenia de la EC es multifactorial, resultado de la interacción del gluten con factores inmunológicos, genéticos y ambientales (Green & Cellier, 2007; Lopez-Casado, 2009; Aparicio, 2010; Ros Arnal, 2013).

La EC es inducida por la ingestión de gluten, presente en el trigo, la cebada y el centeno. El gluten constituye la fracción proteica no soluble en agua de los cereales anteriormente citados, cuya función es proporcionar elasticidad a la harina (Mäki & Collin, 1997; Green & Cellier, 2007). Las proteínas del endosperma del grano de trigo fueron clasificadas en 1924 por Osborne en: albúminas, globulinas, gliadinas, extraíbles en soluciones de alcohol, y gluteninas, extraíbles en ácido acético diluido, estando el gluten constituido por estas dos últimas (Shewry *et al.*, 2002; Chirido, 2011). En el trigo, las gliadinas se subdividen a su vez en fracciones  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\omega$ , mientras que las gluteninas se dividen en proteínas de bajo y alto peso molecular. Las gliadinas pertenecen al grupo de las prolaminas, con gran contenido en prolina, dependiendo del tipo de cereal se habla de distintos tipos de prolaminas (tabla 1) (Greco *et al.*, 1998; van de Wal *et al.*, 1999; Vader *et al.*, 2003; Wieser, 2007; Capilla, 2010; Vallejo-Díez, 2013).

**Tabla 1. Tipos de prolaminas y presencia en trigo, centeno y cebada. Tomado y modificado de Capilla, 2010 y Vallejo-Díez, 2013**

Cereal	Tipo de Prolamina	Contenido (%)
Trigo	Gliadina	69%
Centeno	Secalina	30-50%
Cebada	Hordeína	46-52%

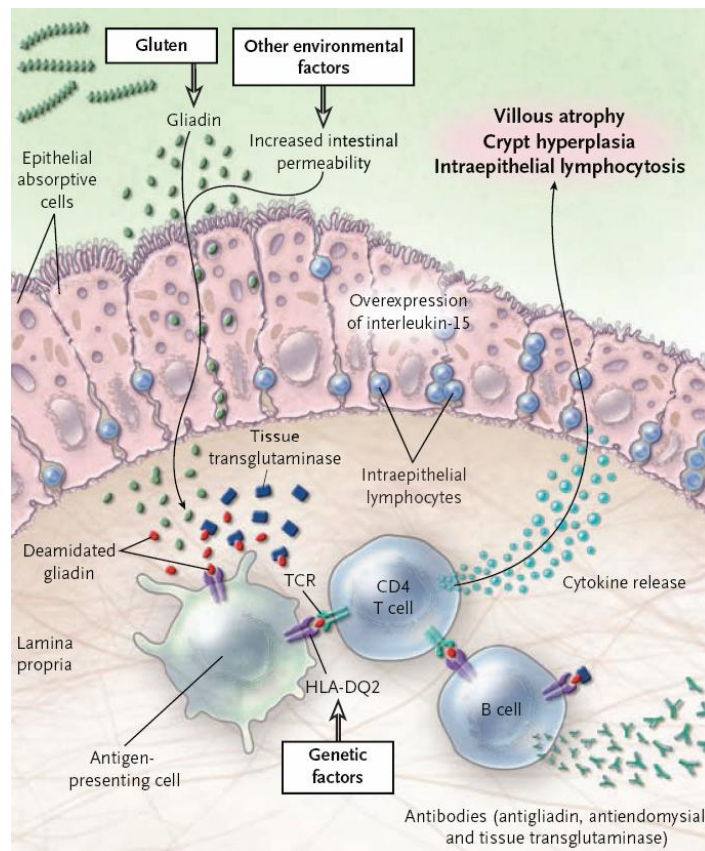
En la ingestión de trigo, el gluten es fraccionado por la acción de las endopeptidasas intestinales. Moléculas no digeridas de gliadina, que presentan un fragmento péptico principal de 33 aminoácidos, son resistentes a la degradación por los ácidos gástricos, pancreáticos, intestinales y por proteasas de la membrana del borde en cepillo del intestino, y por lo tanto permanecen en el lumen intestinal después de la ingestión de gluten (Shan *et al.*, 2002; Green & Cellier, 2007).

Las moléculas de gliadina tienen un efecto tóxico inmediato al entrar en contacto directo con el epitelio intestinal, provocando la liberación por parte de las células del epitelio intestinal de gran cantidad de IL-15 que a su vez induce la expresión del receptor NK-G2D en los linfocitos intraepiteliales (LIEs) y la de su ligando MIC-A en los enterocitos. Esto provoca la formación de un complejo que activa mecanismos de apoptosis en los enterocitos, lo que contribuye a un aumento de la permeabilidad de la pared y al paso de péptidos hacia la lámina propia (Houchins *et al.*, 1991; Green & Jabri, 2003; Green & Cellier, 2007; Heyman & Menard, 2009; Vallejo-Díez, 2013). Actualmente existen otras teorías, además de la formación del complejo (NK-G2D)-(MIC-A), para explicar el mecanismo por el cual los péptidos derivados del gluten llegan a la lámina propia; mientras que Fasano y colaboradores abogan por la existencia (en pacientes con EC) de un aumento en la permeabilidad del epitelio de la pared intestinal debido a una mutación en la zonulina, proteína reguladora de las *tight junctions* o “uniones hendidas” intestinales; otros autores en cambio defienden la implicación del IFN- $\gamma$  en este proceso de internalización (Madara & Stafford, 1989; Bruewer *et al.*, 2003; Schuppan *et al.*, 2009; Ros Arnal, 2013). Además de estas posibles vías paracelulares de paso de gliadina hacia la lámina propia, recientemente se han desarrollado estudios que indican la existencia de una vía transcelular (Matysiak-Budnik, 2008).

Una vez que la gliadina atraviesa el epitelio y llega a la lámina propia, su porción glutamínica es deaminada por una enzima calcio-dependiente denominada transglutaminasa tisular (TGt). Esta deaminación aumenta la afinidad de los productos resultantes por las moléculas HLA (HLA-DQ2 o HLA-DQ8) presentes en las células presentadoras de antígenos, siendo las células dendríticas las más importantes en la lámina propia (Molberg *et al.*, 1998; Molberg *et al.*, 2001; Fleckenstein *et al.*, 2004; Vallejo-Díez, 2013). La gliadina deaminada es presentada por estas células ante los linfocitos T CD4+, estos se activan y mediante la secreción de citocinas proinflamatorias, en especial del IFN  $\gamma$ , promueven la secreción de metaloproteasas de la matriz celular (MMPs) capaces de degradar proteoglicanos y glucoproteínas, por parte de los fibroblastos, degradando la matriz extracelular e incrementando la destrucción de células del epitelio (Mohamed *et al.*, 2006; Green & Cellier, 2007; Pinkas *et al.*, 2007; Schuppan *et al.*, 2009; Ros Arnal, 2013; Vallejo-Díez, 2013). Al mismo tiempo estas células T actúan sobre células B que se diferencian en células plasmáticas capaces de producir anticuerpos frente a la

gliadina, a la transglutaminasa tisular y frente al endomisio (Figura 2) (Molberg *et al.*, 1998; Green & Cellier, 2007; Donat, 2010).

**Figura 2. Patogenia de la enfermedad celíaca. Tomado de Green & Cellier, 2007**



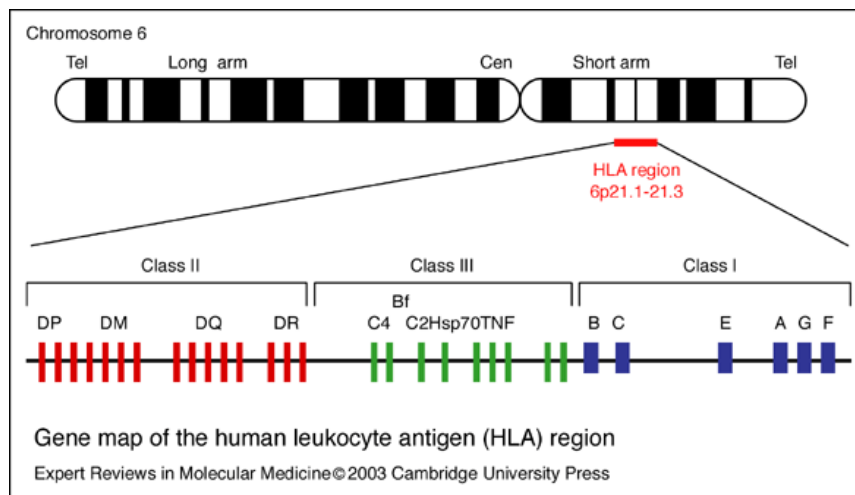
### 1.3.1 Factores genéticos

La influencia genética en la patogénesis de la EC está indicada por su alta incidencia familiar (Green & Cellier, 2007). Una buena muestra de ello es que un familiar de primer grado de un paciente celíaco tiene 20 veces más posibilidades de presentar la enfermedad que el resto de la población. De esta manera la EC afecta a individuos susceptibles, cuya base genética está localizada en una región del cromosoma 6 (6p21.1-21.3) encargada de codificar los antígenos leucocitarios tipo HLA (figura 3). Siendo la asociación de la EC con la región HLA la más fuerte descrita hasta la fecha en una patología (Louka & Sollid, 2003; Rodríguez-Sáez, 2010; Vallejo-Díez, 2013).

Las moléculas del sistema HLA son glicoproteínas de membrana que se expresan en la superficie de todas las células y que tienen por función distinguir lo propio de lo ajeno. Dentro de las 3 clases de HLA existentes (Clase I, II y III) la región que se ve implicada en la EC es la región HLA de clase II. La región codificante de la clase II se asienta en una serie de subregiones, cada una con genes A y B que codifican cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente, las cuales se anclan en la superficie celular formando heterodímeros, distinguiéndose 5 familias o isotipos: HLA DQ, DP, DR, DM y DO. Las familias más estudiadas y conocidas son las producidas por los genes DR, DP y DQ (Choo, 2007; Ros Arnal, 2013).



Figura 3. Mapa génico de la región HLA en humanos. Tomado de Capilla, 2010.



La familia de los genes DR la constituye un solo gen DRA, que codifica una cadena  $\alpha$  invariable, y hasta nueve genes DRB (DRB1-9), que codifican varias cadenas  $\beta$ . La cadena  $\alpha$  y las  $\beta$  se unen, dando así lugar a un heterodímero, por lo que la especificidad antigénica del HLA-DR (DR1 a DR18) depende del polimorfismo de la cadena DR $\beta$ 1 codificada por los alelos DRB1. Los productos de los genes DPA1 y DPB1 se asocian para formar las moléculas DP y los de los genes DQA1 y DQB1 para formar las moléculas DQ, correspondiendo en ambos casos la especificidad antigénica al polimorfismo de la cadena beta, del mismo modo las tres familias génicas presentan pseudogenes adicionales no expresados (Choo, 2007; Ros Arnal, 2013).

En los estudios realizados hasta la fecha los heterodímeros más habituales de la EC han sido el HLA-DQ2 (90-95%), codificado por los alelos DQA1\*05:01 y DQB1\*02:01, asociado generalmente a DR3 o en heterocigotos a DR7/DR5, y en menor proporción el HLA-DQ8 (5-10%), codificado por los alelos DQA1\*03:01 y DQB1\*03:02, asociado en este caso a DR4. Sin embargo muchas personas no aquejadas de la EC son portadoras de estos alelos, de forma que estos marcadores constituyen una condición necesaria pero no suficiente para el desarrollo de la enfermedad. Del mismo modo existe una pequeña proporción de pacientes con EC (5-10%) que no presentan los DQ2 y DQ8. Esto implica la existencia de otros marcadores que todavía se desconocen, probablemente subtipos localizados en el sistema HLA de clase I o genes no-HLA (Green & Cellier, 2007; Díaz de Entresotos *et al.*, 2008; Rodríguez-Saez, 2010). Es un desafío para las próximas décadas ahondar en profundidad en la patogénesis de la EC para conseguir un mapeado más sutil de los genes implicados.

### 1.3.2 Factores ambientales

Un hecho que puede tener importancia en la aparición de la enfermedad es el momento de introducción del gluten en la dieta; se ha observado que la introducción de gluten en individuos genéticamente predispuestos de forma temprana (antes de los 4 meses) o tardía (después de los 7 meses) se asocia a un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (Norris *et al.*, 2005; Ludvigsson *et al.*, 2012). También se cree importante la cantidad total de gluten ingerido a lo largo del primer año de vida (Ivarsson *et al.*, 2000; Vallejo-Díez, 2013).

Por otra parte, la aparición de ciertas infecciones gastrointestinales, como la infección por rotavirus, son de vital importancia en el aumento de las probabilidades de contraer la enfermedad en niños (Stene *et al.*, 2006; Tronccone & Jabri, 2011; Vallejo-Díez, 2013). Mantener el estudio de los factores ambientales puede facilitar el desarrollo de estrategias futuras para la prevención primaria de la enfermedad.

### 1.4 Epidemiología

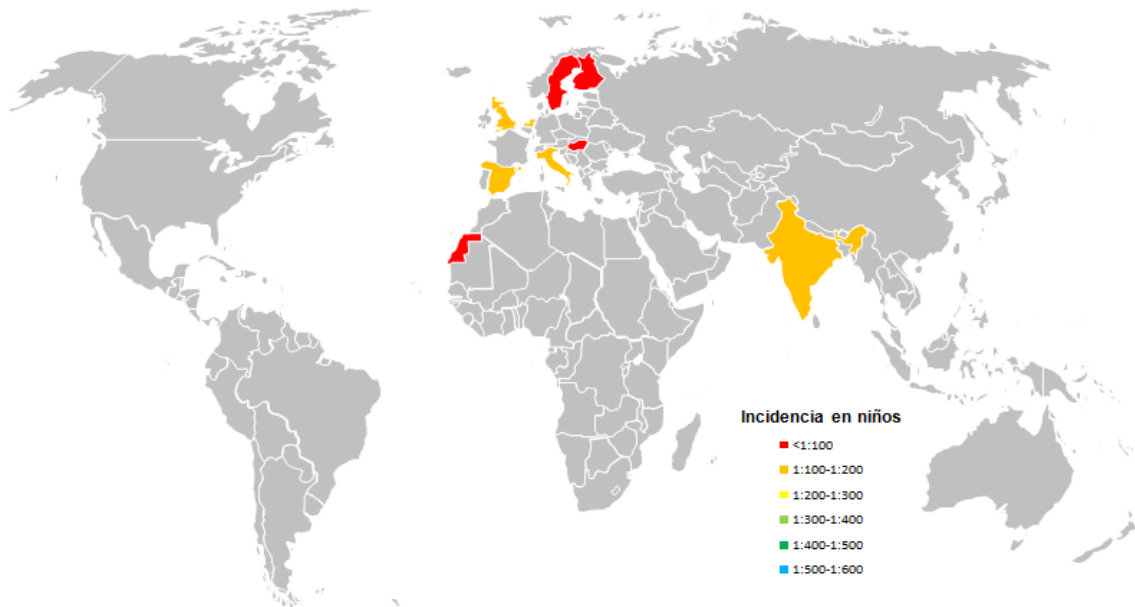
Hasta hace poco más de 20 años se consideraba a la EC como una enfermedad rara. Sin embargo, se ha comprobado que se trata de una enfermedad mucho más común de lo que se creía al principio (Aparicio, 2010; Vallejo-Díez, 2013).

En los últimos años la incidencia de la enfermedad, número de nuevos casos diagnosticados en un periodo de tiempo determinado, ha aumentado considerablemente debido al desarrollo de las pruebas serológicas y a la implantación de planes de diagnóstico temprano de la enfermedad (Cilleruelo-Pascual *et al.*, 2014). En España se ha estimado que la incidencia actual es de 54 nuevos casos por cada 100.000 personas-año (Cilleruelo-Pascual *et al.*, 2014). En otros países europeos, como Suecia, la incidencia se estima en 45 nuevos casos por cada 100.000 personas-año (Olsson *et al.*, 2008), este valor disminuye hasta los 23 nuevos casos por cada 100.00 personas-año en el continente americano (Ludvigsson *et al.*, 2013).

Actualmente se estima que la prevalencia de la EC varía mucho dependiendo del área geográfica, aunque se supone una prevalencia mundial en torno al 1% tanto en niños (Figura 4) como adultos (Kagnoff, 2005; Reilly & Green, 2012). En España hasta este año se habían llevado a cabo 4 estudios epidemiológicos poblacionales, mostrando una prevalencia en niños de entre 1:118 (Castaño *et al.*, 2004) y 1:220 (Cilleruelo *et al.*, 2002), y mostrando en adultos una prevalencia de entre 1:370 (García-Novo *et al.*, 2007) y 1:389 (Riestra *et al.*, 2000). Esto resultaría en un 0,45-0,85% en la población pediátrica española y aproximadamente un 0,26% en la población adulta. Dentro de la Unión Europea se muestran datos muy dispares, desde una prevalencia en Finlandia de 1:99 (Mäki *et al.*, 2003) hasta una prevalencia de 1:270 en Alemania (Kratzer *et al.*, 2013). Un resultado llamativo es la prevalencia de la EC entre la población saharauí 1:18, donde el 40% de la población porta el HLA-DQ2 y en donde se produce un elevado consumo de cereales (Catassi *et al.*, 2001).

Múltiples estudios muestran que la EC es más frecuente en mujeres que en hombres, tanto en individuos pediátricos como adultos (aproximadamente 2:1), esto puede ser debido a factores hormonales o a diferencias en el diagnóstico, aunque no existen todavía resultados concluyentes (Llorente Alonso *et al.*, 2006; Aparicio, 2010; Riestra, 2011).

**Figura 4. Prevalencia mundial en niños de la EC. Realizado a partir de datos recogidos en Riestro, 2011 y Ros Arnal 2012**



## 1.5 Manifestaciones clínicas

Existen diferencias entre niños y adolescentes en la manifestación de la EC (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008; Consejería de Salud y Servicios Sociales de La Rioja, 2011).

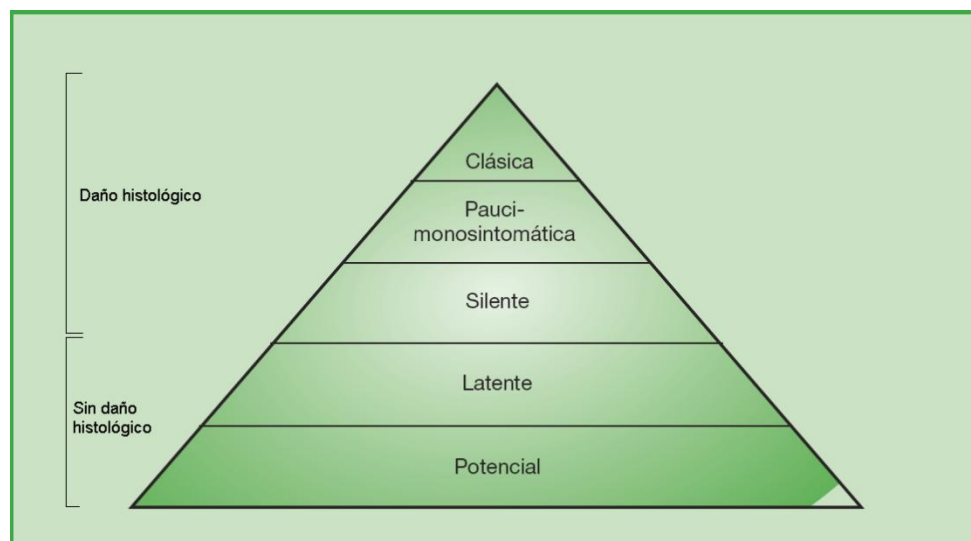
La presentación clínica en niños suele mostrar frecuentemente síntomas digestivos, dolor abdominal y pérdida de peso, siendo los signos más frecuentes malnutrición, distensión abdominal, hipotrofia muscular, retraso pónomo-estatural y anemia ferropénica (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008; Rodrigo, 2008; Polanco, 2013).

En adolescentes la presentación clínica de la EC no suele mostrar síntomas digestivos. La enfermedad en este grupo suele presentarse como una anemia ferropénica no tratable, estreñimiento, dolor abdominal, irregularidades menstruales, cefaleas y hábito intestinal irregular. Los signos que se presentan con mayor frecuencia son la talla baja, aftas orales, hipoplasia del esmalte, distensión abdominal, debilidad muscular, artritis y osteopenia (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008).

## 1.6 Formas clínicas

Las formas clínicas de la EC se suelen representar clásicamente mediante un modelo en iceberg, donde la incidencia de la EC se expresa como el tamaño total del iceberg que depende de la presencia del haplotipo HLA-DQ2/DQ8 y del consumo de gluten (Mäkki & Collin, 1997; Ministerio de Sanidad y consumo, 2008; López-Casado, 2009). Siguiendo este modelo se diferencian varias formas clínicas de presentación (Figura 5 y Tabla 2):

**Figura 5. Formas clínicas de presentación de la EC, representación por el modelo del iceberg. Tomado de Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008**



**Tabla 2. Formas clínicas de presentación de la EC, principales características. Modificado de Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008**

Formas clínicas	Síntomas	Test serológicos	Pruebas genéticas	Biopsia intestinal
<b>Clásica</b>	Intestinales/Extraintestinales	Positivos (*)	Positivas	Positiva
<b>Pauci-monosintomática</b>	Intestinales/Extraintestinales	Positivos (*)	Positivas	Positiva
<b>Silente</b>	Asintomática	Positivos	Positivas	Positiva
<b>Latente</b>	Asintomática	Positivos (*)	Positivas	Normal
<b>Potencial</b>	Asintomática	Negativos (**)	Positivas	Normal

(\*) Tests serológicos positivos, pero a veces negativos (\*\*) Tests serológicos negativos, pero a veces positivos

### Enfermedad celíaca clásica:

En la EC clásica predomina la sintomatología gastrointestinal, derivada de la ingesta de gluten, apareciendo generalmente entre los 8 y 24 meses de edad (Catassi & Fabiani, 1997; Fasano & Catassi, 2005; López-Casado, 2009). Se caracteriza por presentar síntomas de malabsorción grave con diarrea crónica, vómitos, dolor abdominal, esteatorrea, anorexia, retraso del crecimiento o pérdida de peso (Farrell & Kelly, 2002; López-Casado, 2009; Calvo & Marugán, 2011). Todo ello está acompañado de la detección de marcadores serológicos positivos y atrofia vellositaria intestinal grave (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008; Capilla, 2009).

### Enfermedad pauci, monosintomática o subclínica:

Es la forma más común de EC. En la EC pauci o monosintomática pueden presentarse síntomas intestinales y/o extraintestinales, mostrando un espectro histológico variable al igual que el porcentaje de positividad de anticuerpos séricos. Los síntomas más comunes son los síntomas extraintestinales, siendo la anemia ferropénica la manifestación más común, otras manifestaciones son la osteoporosis, déficits vitamínicos, alteración de las transaminasas e

incluso varios trastornos neurológicos como la ataxia o las migrañas (Zelnik *et al.*, 2005; Niederhofer & Pittschieler, 2006; Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008).

### **Enfermedad celíaca silente:**

En la EC silente no se presentan manifestaciones clínicas, no obstante sí se produce daño histológico, mostrando incluso atrofia vellositaria. Estos casos son identificados bien por ser el individuo familiar de celíaco de primer grado o bien por presentar una enfermedad asociada a la EC (Fasano & Catassi, 2001; Ruiz-Díaz & Polanco, 2002; Collin *et al.*, 2002; López-Casado, 2009; Donat, 2010).

### **Enfermedad celíaca latente:**

La EC latente se caracteriza por mostrar un estudio histológico de la mucosa intestinal normal, tomando el individuo gluten en su dieta, pero que en algún momento anterior o posterior ha tenido o va a tener características típicas de la EC (Donat, 2010; Consellería de Sanidade, 2008; Capilla, 2010; Vallejo-Díez, 2013). Son síntomas típicos el estreñimiento, el retraso en la talla, la anemia ferropénica o la infertilidad presentándose unos test serológicos y genéticos positivos (Polanco, 2001; López-Casado, 2009; Vallejo-Díez, 2013).

### **Enfermedad celíaca potencial:**

En la EC potencial no se presentan alteraciones histológicas propias de EC pero sí se muestra algún marcador positivo propio de EC (generalmente marcadores genéticos o un aumento de los LIEs) (Ferguson & Earranz, 1993; Consellería de Sanidade, 2008; Donat, 2010).

## **1.7 Grupos de riesgo**

Se consideran grupos de riesgo los familiares de enfermos celíacos y los pacientes con enfermedades asociadas a enfermedad celíaca (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008; Polanco & Ribes, 2010).

Los familiares de primer grado constituyen un grupo importante de riesgo. Presentan un riesgo moderado en donde la prevalencia de la enfermedad se sitúa entre el 10 y el 20%, siendo entre un 15-30 % DQ2 positivos. De estos familiares aproximadamente la mitad permanecen clínicamente asintomáticos o muestran formas clínicas de expresión leve (Mäki *et al.*, 1991).

Múltiples estudios han mostrado una clara asociación entre la EC y otras patologías. Estas patologías suelen preceder a la enfermedad, aunque pueden presentarse durante o incluso después de la enfermedad. Los pacientes que las padecen son considerados grupos de riesgo ya que su asociación se produce con una frecuencia superior a la esperada (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008; Polanco & Ribes, 2010). Estas enfermedades se pueden clasificar en tres grandes grupos:

## **Enfermedades autoinmunes:**

En 1999, Ventura y colaboradores demostraron que en pacientes con EC son tres veces más frecuentes los trastornos autoinmunes que en el resto de la población (Calvo & Marugán, 2011; Rodrigo *et al.*, 2013). Estas enfermedades son muy variadas como la diabetes mellitus tipo I, déficit selectivo de IgA o hipotiroidismo (Rodrigo *et al.*, 2013).

## **Trastornos neurológicos y psiquiátricos:**

Aproximadamente el 7% de los pacientes con EC presentan manifestaciones neurológicas, siendo en algunos casos ésta la forma de manifestación clínica; no obstante este porcentaje puede aumentar hasta el 35% en pacientes no tratados (Riestra Menéndez, 2011; Calvo & Marugán, 2011). El trastorno neurológico más común es la polineuropatía periférica, seguido de la ataxia cerebelosa y la epilepsia (Rodrigo *et al.*, 2013).

## **Otras enfermedades asociadas:**

Este último grupo engloba a patologías asociadas a la EC de diversa índole, abarcando desde trastornos metabólicos a genéticos. El trastorno que presenta una mayor asociación es el Síndrome de Down, con una prevalencia de entre el 3-12%, aunque hay autores que hablan de un valor del 16%, lo cual representaría un valor 100 veces mayor que la población general. La mayoría de estos casos están asociados a la presencia de HLA-DQ2 (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008; Calvo & Marugán, 2011; Ros Arnal, 2012).

## **1.8 Diagnóstico**

Hoy en día los criterios diagnósticos de la EC se basan en la sintomatología que presente el paciente, las determinaciones serológicas, los marcadores genéticos y los hallazgos histopatológicos de las biopsias intestinales, todo ello junto a una buena respuesta en una dieta sin gluten, sirviendo todo ello para confirmar la enfermedad en la mayoría de los casos (Rodríguez-Saez, 2010; Vallejo-Díez, 2013; Farré, 2013).

### **Diagnóstico serológico**

Los marcadores serológicos son la primera prueba a realizar cuando existe sospecha de EC, teniendo presente que la obtención de negatividad para los mismos no excluye la existencia de la enfermedad. Las técnicas empleadas para estos análisis son poco invasivas, más rápidas y generalmente más baratas que el resto de las utilizadas para el diagnóstico final de la enfermedad (Capilla, 2010; Vallejo-Díez, 2013).

#### **Anticuerpos antiendomiso (AAEM)**

Los AAEM de clase IgA presentan una alta sensibilidad y especificidad (superior al 95%) (Rostom *et al.*, 2005). En aquellos pacientes donde el recuento sérico total de IgA es bajo se lleva a cabo la determinación de anticuerpos antiendomiso (AAEM) de clase IgG. Esta técnica presenta el mismo fundamento que la anterior aunque no es tan específica. Los AAEM se determinan por Inmunofluorescencia indirecta (IFI), técnica utilizada para determinar anticuerpos cuyo antígeno se desconoce. La IFI es una técnica cualitativa o semicuantitativa

donde se llevan a cabo diluciones sucesivas del suero, realizándose una lectura final al microscopio de fluorescencia (Chorzelski *et al.*, 1984; Garrote, 2011; Farré, 2013).

### **Anticuerpos antitransglutaminasa tisular (ATTG)**

La aparición en 1997 de los ATTG-IgA permitió automatizar las determinaciones (Dieterich *et al.*, 1997; Garrote, 2011), presentan una sensibilidad cercana al 100% y una especificidad entre 89-96% (Rostom *et al.*, 2005; Hill, 2005). Los ATTG-IgA son reconocidos como los marcadores más útiles y actualmente se utilizan en solitario para el cribado de EC (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008). En aquellos pacientes donde el recuento sérico total de IgA es bajo se lleva a cabo la determinación de los anticuerpos antitransglutaminasa tisular (ATTG) de clase IgG. Esta técnica presenta el mismo fundamento que la anterior aunque no es tan específica. La TgT constituye el autoantígeno de la EC, por ello se han desarrollado métodos de enzoinmunoanálisis (ELISA) para la detección de anticuerpos frente a este antígeno. La determinación mediante ELISA presenta la ventaja de que es un método sencillo, barato y evidenciable (Donat, 2010).

### **Determinación sérica de IgA total**

La cuantificación de la IgA total al mismo tiempo que la de ATTG, permite disminuir la cantidad de falsos positivos, ya que los pacientes con EC asocian un déficit selectivo de IgA con mayor frecuencia que la población general. Como acabamos de mencionar, en el caso de déficit de IgA, se solicitan los anticuerpos de clase IgG (Ministerio de Sanidad y Consumo, 2008; López-Casado, 2009).

### **Diagnóstico genético**

La última guía para el diagnóstico de la EC promulgada por la ESPGHAN (European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition) en 2012 recomienda que el tipaje HLA DQ2 y DQ8 se realice mediante el estudio de los 4 alelos de riesgo (HLA-DQB1\*02:01 y \*03:02, y DQA1\*05:01 y \*03:01) por técnicas de biología molecular (PCR) y no por técnicas serológicas.

El genotipo HLA resulta muy útil para llevar a cabo el diagnóstico de EC, pero del mismo modo que ocurre con el análisis serológico, no es excluyente ni determinante (Hadithi *et al.* 2007; Capilla, 2010).

### **Diagnóstico histológico**

A pesar del gran avance que constituyeron el desarrollo de las pruebas diagnósticas serológicas y genéticas, la biopsia duodenal sigue siendo la clave en el diagnóstico de la EC aunque en algunos casos es prescindible. El informe final anatomo-patológico debe incluir los cambios en la arquitectura de las vellosidades y las criptas, así como el número de linfocitos intraepiteliales (LIEs) (Freeman, 2004; Fernández-Salazar, 2011; Vallejo-Díez, 2013).

### **Estudio histológico:**

El resultado del estudio anatomopatológico permite confirmar la existencia de lesiones compatibles con la EC y establecer el estadio de la lesión mediante la Clasificación de Marsh (Marsh, 1992) que categoriza en diferentes grados el daño histológico.

## Estudio Inmunofenotípico de los LIEs

En la EC el número de LIEs se incrementa, sobre todo, en la mucosa del intestino delgado (Cellier *et al.*, 1998; Oberhuber *et al.*, 1998; García-Lagarto, 2011).

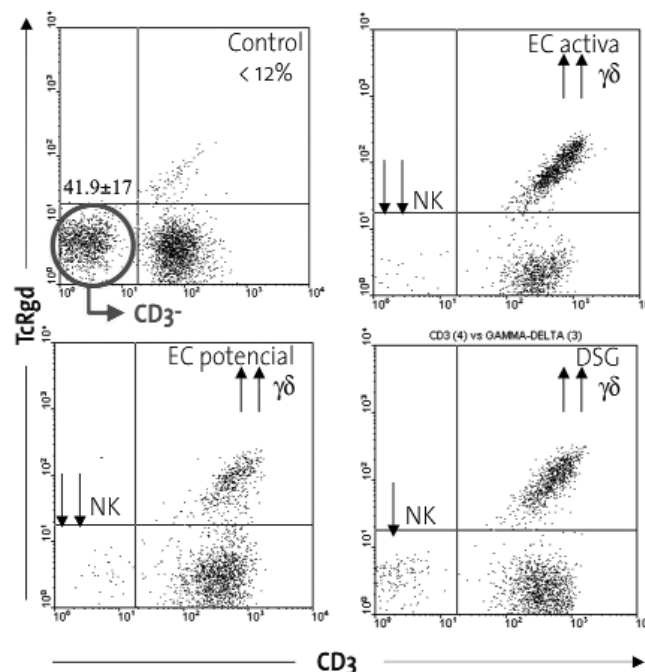
Los LIEs son una subpoblación heterogénea de linfocitos T, los cuales se entremezclan con las células epiteliales del intestino y que presentan un importante papel inmunológico en la respuesta frente a antígenos (García-Lagarto, 2011; Mahadeva *et al.*, 2002; Chott *et al.*, 1992).

En la EC se observan 3 alteraciones relacionadas con los LIEs:

- Aumento del porcentaje total de LIEs. Esto ocurre durante la ingesta de gluten en la dieta, valor que se corrige cuando este se excluye.
- Aumento porcentual, independiente de la dieta, de los LIEs que portan el receptor TCR  $\gamma\delta$ .
- Disminución porcentual, independiente de la dieta, de los LIEs NK-like (figura 6).

Para la cuantificación de los porcentajes de LIEs se utiliza una determinación inmunofenotípica por citometría de flujo, esta prueba tiene las ventajas de ser rápida y barata, para la que sólo se requiere la individualización de las células del epitelio (Eiras-Martinez *et al.*, 2002; Roy-Ariño, 2011).

**Figura 6. Distribución de las poblaciones de LIEs en pacientes celíacos en distintas fases de la enfermedad. Histogramas biparamétricos representativos de las poblaciones LIEs, seleccionados como se muestra en la figura 2. A) Individuo control; B) celíaca activa; C) celíaca latente; D) celíaca sin gluten. Obsérvese que en todas las fases de la enfermedad celíaca se produce un notable aumento de LIE TCR $\gamma\delta$ , así como un acusado descenso de LIE CD3 (pertenecientes a los NK-like). Tomado de Eiras Martinez et al., 2002**

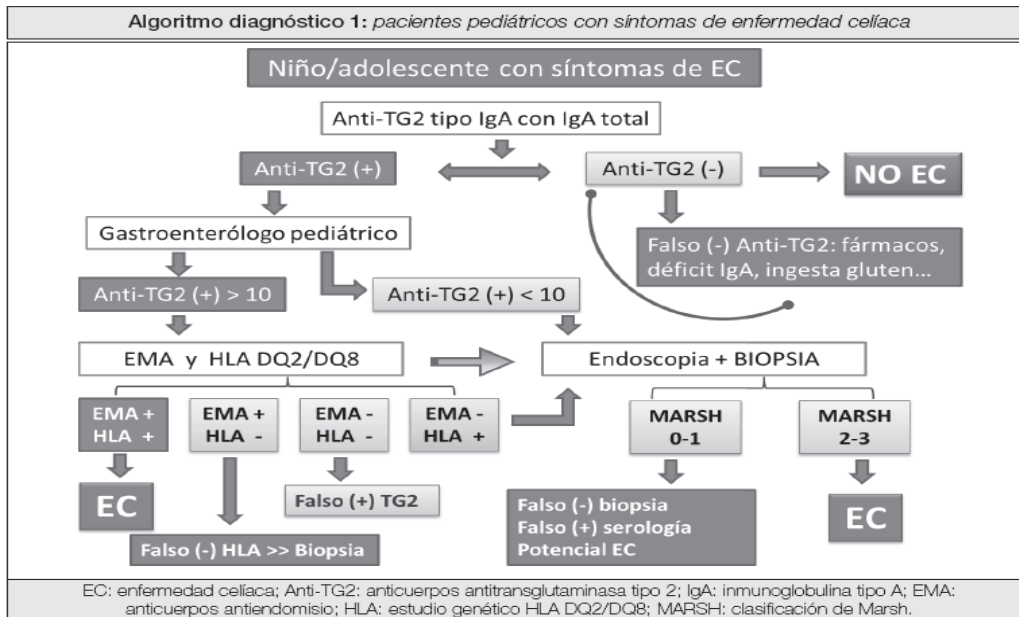




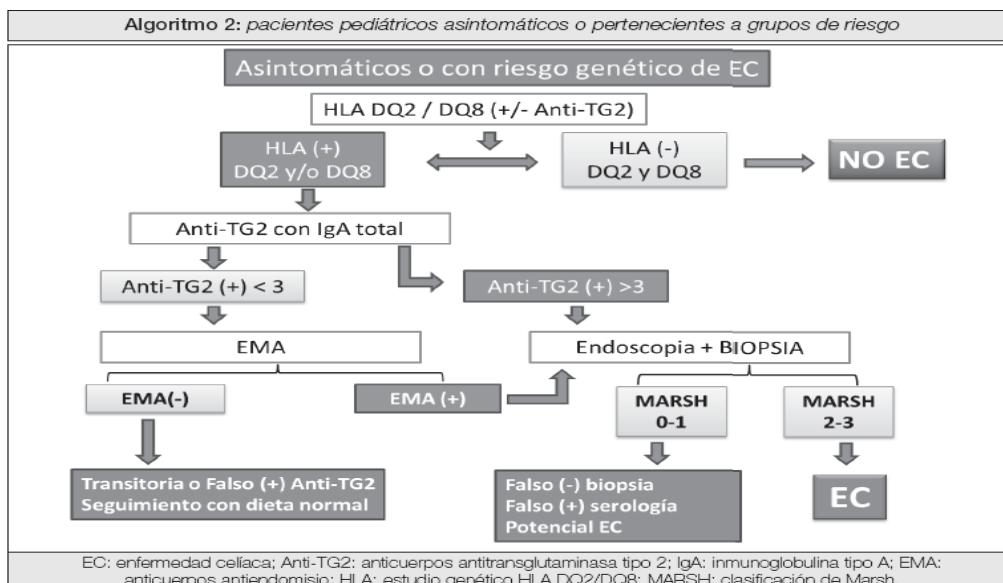
**Algoritmo diagnóstico**

Con el objetivo de establecer una coordinación entre los médicos de atención primaria y las unidades de Gastroenterología para la realización de un diagnóstico de la EC de forma rápida y fiable la ESPGHAN elaboró dos algoritmos diagnósticos diferenciando si los pacientes son niños y adolescentes con síntomas compatibles con EC o si son pacientes pediátricos asintomáticos con riesgo genético (figura 7 y 8) (Consellería de Sanidade, 2008; ESPGHAN, 2012).

**Figura 7. Algoritmo diagnóstico en niños y adolescentes con síntomas sugestivos de EC. Tomado y modificado de ESPGHAN, 2012.**



**Figura 8. Algoritmo diagnóstico en pacientes pediátricos asintomáticos o con riesgo genético de EC. Tomado y modificado de ESPGHAN, 2012.**



## 2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es conocer la incidencia de la EC en individuos pediátricos en el Área Sanitaria de A Coruña, así como obtener diversos datos de la enfermedad en cuanto al sexo, grupos de edad, presentación clínica, síntomas y signos, y enfermedades asociadas que nos acerquen al perfil más común de la enfermedad, comparando los resultados con estudios previos a nivel estatal y mundial. Así como observar los resultados de las pruebas diagnósticas, tanto serológicas, como genéticas e histológicas para poder conocer con más profundidad la EC.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1 Pacientes

Para este estudio se han utilizado datos recopilados entre Mayo de 2012 y Diciembre de 2013 de pacientes con sospecha de presentar EC, y datos obtenidos del análisis de muestras (sangre total, suero y reportes histológicos de biopsias) remitidas al Hospital Teresa Herrera de A Coruña entre Enero y Abril 2014 de pacientes también sospechosos de presentar EC. De esta manera, se ha obtenido un estudio que abarca 24 meses de duración en donde se incluyeron sólo los pacientes pediátricos (de 0 a 15 años) con sospecha de padecer EC debido a la presentación de clínica sugestiva, pertenecer al grupo de riesgo o, aun siendo asintomáticos, presentar una ATTG elevada hallada en un control rutinario.

La búsqueda y selección de casos se realizó examinando los resultados positivos a los test serológicos y a los estudios genéticos, posteriormente se realizó la revisión de los datos clínicos, histológicos y de laboratorio recogidos en la historia clínica y en las bases de datos del Hospital.

### 3.2 Variables estudiadas

Las variables estudiadas han sido:

1. Edad al diagnóstico.
2. Sexo
3. Síntomas y signos clínicos:
  - Disminución de apetito
  - Alteración del hábito intestinal
  - Retraso ponderal
  - Distensión abdominal
  - Déficit de hierro
  - Dolor abdominal
  - Transaminasas altas
  - Alteraciones dentales
  - Otros síntomas o signos
4. Enfermedades asociadas encontradas:
  - Diabetes mellitus
  - Hipotiroidismo
  - Déficit de IgA
5. Existencia de antecedentes familiares, ya sean de primer, segundo grado o ambos
6. Estudios serológicos:
  - ATTG IgA
  - AAEM IgA
  - ATTG IgG
  - AAEM IgG
  - IgA total

7. Tipaje HLA
8. Linfograma LIE
9. Estudio histológico

Se ha clasificado a los pacientes en tres grupos de edad, de 0-2 años, de 2-6 años y de 6 a 15 años, para tener una visión más clara de los resultados. La EC se diagnóstico utilizando los criterios y los algoritmos diagnósticos promulgados por la ESPGHAN (2012). Los pacientes son clasificados según su diagnóstico en sólo tres grupos para facilitar el tratamiento estadístico: pacientes sin EC (con otras patologías), pacientes con EC o pacientes con EC latente.

Atendiendo a la presentación clínica de los síntomas y signos se clasificó a los pacientes en 3 grupos:

1. Sintomatología clásica (EC clásica): diarrea crónica, pérdida peso y dolor abdominal.
2. Sintomatología no clásica (EC atípica): Deficiencia de hierro (bajo nivel de ferritina), baja estatura, dolor abdominal crónico, defectos en el esmalte dental, aftas orales recurrentes, aumento del nivel de las enzimas hepáticas, dermatitis herpetiforme, artritis, epilepsia con calcificaciones cerebrales y retraso de la pubertad.
3. Sin síntomas (en niños pertenecientes al grupo de riesgo) (EC asintomática).

El resultado del tipaje HLA se ha tipificado para los alelos HLA DQ, estableciéndose 3 grupos en función del fenotipo DQ2, DQ2/DQ8, DQ8 y dentro del fenotipo más común se han diferenciado los diferentes haplotipos.

Los pacientes que han sido sometidos a biopsia se han dividido en tres grupo: con EC, con EC latente y sin EC (otras patologías) diferenciándose los resultados en histología normal e histología compatible con EC.

### **3.3 Técnicas empleadas**

#### **3.3.1 Ensayos serológicos**

##### **3.3.1.a Anticuerpos antiendomiso de clase IgA**

El estudio de los anticuerpos antiendomiso de clase IgA se ha llevado a cabo utilizando el kit de Biosystems® Anticuerpos anti-endomiso (AAEM) esófago de mono (endomiso). Este kit proporciona los portaobjetos requeridos, portaobjetos con secciones de esófago de mono (endomiso) en cada pocillo (8 pocillos), así como el anticuerpo utilizado, IgA FITC/Evans (Anticuerpos de cabra anti-inmunoglobulinas IgA humanas conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), azul de Evans 0,01 g/L y azida de sodio 0,95 g/L) y también un Mounting Medium o medio de montaje, compuesto de Glicerol al 78%, fosfato de sodio 6 mmol/L, fosfato de potasio 1,6 mmol/L, cloruro de sodio 60 mmol/L y azida de sodio 0,95 g/L.

Esta técnica serológica se fundamenta en que los anticuerpos anti-endomiso (AAEM) de clase IgA del suero del paciente se unen a sus antígenos presentes en una sección del tercio inferior del esófago de mono fijado en un portaobjetos. Una vez producida la unión, los anticuerpos se ponen de manifiesto mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas A

humanas conjugado con fluoresceína, que permite su visualización por microscopía de fluorescencia.

En primer lugar se atemperan los reactivos y las muestras a temperatura ambiente. Se deposita a continuación una gota (50  $\mu$ l.) de la muestra diluida o de los controles en los pocillos del portaobjetos con una pipeta Pasteur, procurando cubrirlos perfectamente y evitando tocar la sección de tejido fijada.

Se incuba el portaobjetos durante 30 minutos a temperatura ambiente (15-30°C). Posteriormente se eliminan las gotas de las muestras inclinando el portaobjetos y golpeándolo ligeramente, evitando mezclar los sueros. Se elimina también el suero remanente en el portaobjetos lavándolo con PBS (10x).

A continuación se lava el portaobjetos sumergiéndolo en una cubeta con PBS durante 5 minutos. Posteriormente se cambia el PBS y se repite el lavado. Una vez terminado el lavado se seca cuidadosamente el portaobjetos utilizando papel secante, teniendo presente que la sección de tejido debe permanecer siempre húmeda.

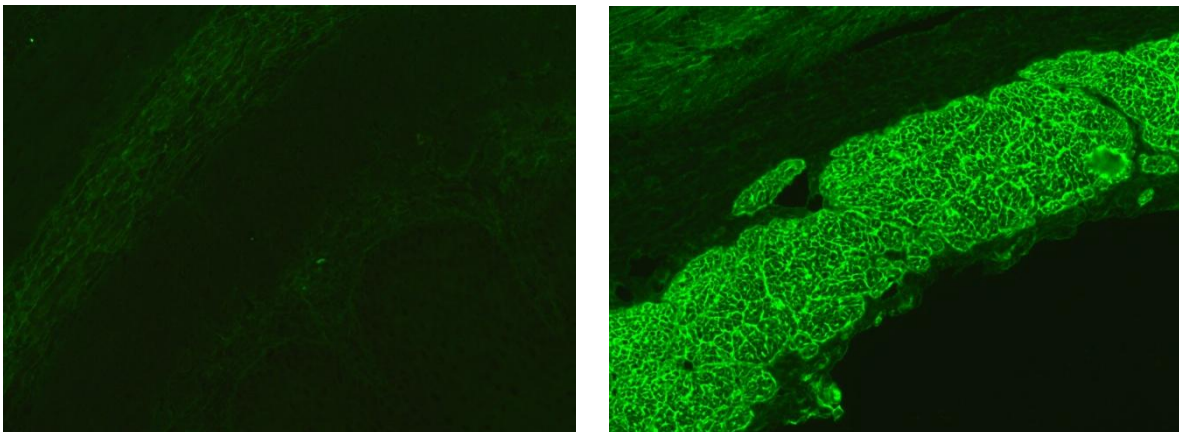
Posteriormente se deposita una gota de Reactivo IgA FITC/Evans en cada pocillo. Colocando a continuación el portaobjetos en una cámara húmeda e incubándolo a temperatura ambiente (15-30°C) durante 30 minutos. Hecho esto el portaobjetos se lava y se seca, de la misma manera que se realizó anteriormente.

Ya por último se depositan varias gotas de Reactivo Mounting Medium sobre el portaobjetos y se coloca un cubreobjetos procurando evitar la formación de burbujas de aire.

El portaobjetos obtenido tras la técnica se examina con un microscopio de fluorescencia EUROstars II (250-400x). Para realizar la lectura del portaobjetos se seleccionan campos de observación de la zona interna de la sección de tejido. Los sueros que presentan fluorescencia tipo reticular en la capa de musculatura lisa más próxima a la mucosa del esófago de mono a la dilución recomendada deberán considerarse positivos (figura 9 derecha). Las muestras positivas son tituladas (se define el título como la dilución mayor que da resultado positivo).

Cuando no se observa ningún marcaje específico descrito, el resultado es negativo para los autoanticuerpos indicados (figura 9 izquierda).

**Figura 9. Muestra negativa (izquierda) y positiva (derecha) de AAEM.**



### **3.3.1.b Anticuerpos antitransglutaminasa tisular de clase IgA**

La determinación cuantitativa de los anticuerpos antitransglutaminasa tisular de clase IgA se lleva a cabo utilizando el kit EliA™ Celikey® IgA de la casa comercial Phadia®. En esta técnica se utiliza la tecnología EliA™, que es un ensayo de inmunofluorescencia que permite determinar autoanticuerpos de forma precisa.

Esta técnica se encuentra completamente automatizada y es llevada a cabo en el aparato UniCAP® 250 de Phadia®. En este analizador se introduce las muestras de suero, conservadas a temperatura ambiente, mediante una gradilla, en el interior del analizador se encuentran unos pocillos individuales de poliestireno, EliA Celikey IgA Wells, recubiertos con antígenos recombinantes de transglutaminasa tisular humana, que se corresponden con los anticuerpos a determinar. Si los anticuerpos (ATTG) están presentes en la muestra del paciente se unen a su antígeno correspondiente. Después de eliminar los anticuerpos no unidos, se añaden anticuerpos marcados con enzima dirigidos contra anticuerpos IgA humanos (EliA™ IgA Conjugate) para formar complejos anticuerpo-conjugado. Tras la incubación, se elimina el conjugado no unido y el complejo unido se incuba con una solución de desarrollo. Finalmente, se para la reacción y se mide la fluorescencia final. A mayor valor de respuesta, mayor presencia de IgA específica en la muestra. Para evaluar los resultados de la prueba, la respuesta de las muestras de los pacientes se compara directamente con las respuestas de los calibradores.

### **3.3.1.c Anticuerpos antitransglutaminasa tisular de clase IgG**

Cuando el recuento total de IgA es inferior a 1 mg/dl se lleva a cabo la determinación cuantitativa de los anticuerpos antitransglutaminasa tisular de clase IgG mediante el kit EliA™ Celikey® IgG de la casa comercial Phadia®. Se trata de una técnica automatizada llevada a cabo en el aparato UniCAP® 250 de Phadia® idéntica a la anterior, con la diferencia de que se utilizan anticuerpos de clase Ig G en vez de clase IgA.

### **3.3.1.d Determinación sérica de IgA total**

La determinación sérica cuantitativa de IgA se lleva a cabo por nefelometría cinética automática, técnica en la que se mide la tasa de incremento de la dispersión de la luz de partículas suspendidas en solución como resultado de complejos formados durante la reacción antígeno-anticuerpo monoclonal.

El analizador utilizado para esta determinación es el sistema nefelométrico IMMAGE® 800 de Beckman Coulter, que permite realizar una medición de IgA en un intervalo de 82 a 453 mg/dl.

## **3.3.2 Ensayos genéticos**

### **3.3.2.a Extracción de DNA**

La extracción de DNA genómico se lleva a cabo a partir de muestras de sangre total recogidas en tubos con EDTA como anticoagulante, utilizando QIAamp DNA blood Mini Kits de la casa comercial Quiagen®.

En primer lugar se toman 20 µl. de proteasa QIAGEN® (o Proteinasa K) en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. A continuación, en el mismo tubo, se añaden 200 µl. de sangre total y 200 µl. de Buffer AL (solución de lisis), mezclándose los 3 componentes en un vórtex durante 15 segundos, obteniéndose así una solución homogénea. Se incuba la muestra 10 min. a 56°C y posteriormente se centrifuga brevemente el tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para eliminar las posibles gotas que se hallen en el interior de la tapa.

A continuación se añaden 200 µl. de etanol (96-100%) a la muestra, y se mezcla de nuevo en un vórtex durante otros 15 s. Después de mezclar, se vuelve a centrifugar brevemente el tubo de microcentrífuga de 1,5 ml para retirar, al igual que en el caso anterior, las gotas formadas en el interior de la tapa.

Posteriormente se aplica cuidadosamente la mezcla obtenida en el paso anterior a una columna de centrifugación QIAamp (en un tubo de recogida de 2 ml) sin mojar el borde. Se cierra la tapa y se centrifuga a 6000 xg (8000 rpm) durante 1 min. Luego se coloca la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de recogida limpio de 2 ml., y se desecha el tubo que contiene el filtrado.

Para el siguiente paso se abre cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp y se añaden 500 µl. de Buffer AW1 sin mojar el borde. Se cierra el tapón y se vuelve centrifugar la muestra a 6.000 xg (8.000 rpm) durante 1 min. Se coloca la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de recogida limpio de 2 ml., y se desecha el tubo de recogida que contiene el filtrado.

Posteriormente se abre cuidadosamente la columna de centrifugación QIAamp y se añaden 500 µl. de Buffer AW2 sin mojar el borde. Se cierra el tapón y se centrifuga la muestra a velocidad alta (20.000 xg, 14 000 rpm) durante 3 min.

Para terminar se coloca la columna de centrifugación QIAamp en un tubo de microcentrífuga limpio de 1,5 ml., y se desecha el tubo de recogida que contiene el filtrado. Con cuidado se abre la columna de centrifugación QIAamp y se añaden 200 µl. de Buffer AE (buffer de elución) o agua destilada. Se Incuba a temperatura ambiente (15-25 °C) durante 1 min, y luego se centrifuga a 6.000 xg (8.000 rpm) durante 1 min.

La comprobación de la calidad del DNA se lleva a cabo mediante una cuantificación del DNA obtenido en un espectrofotómetro NanoDrop® a una longitud de onda de 260 nm. La pureza de la muestra se considera óptima si la relación 260nm/280nm (DNA/proteínas) es cercana a 2. Lo ideal es que la pureza de la muestra sea superior a 1,6.

### **3.3.2.b Tipaje HLA**

La muestra de estudio que se utiliza para el tipaje HLA es el DNA obtenido mediante la técnica anterior y como reactivos se utilizan los incluidos en el kit PROTRANS® Domino System HLA-disease associations Celiac disease.

Tanto los buffer (R e Y) del kit como la estación de trabajo de la PCR han de permanecer a -20°C en el congelador, mientras que la placa de tipaje utilizada de HLA PCR-SSP (para amplificación PCR con primers específicos de secuencia) permanece en la nevera a unos 2-8°C.

Esta placa de tipaje HLA PCR-SSP presenta en cada pocillo uno o más pares de cebadores específicos, ya que contienen el cebador específico del alelo y/o alelos de interés más un par de cebadores control que hibridan con secuencias no alélicas de la muestra. Este par de cebadores control actúa como un control interno de la PCR para comprobar la eficiencia de las amplificaciones de la PCR.

En la estación de trabajo de la PCR se sitúa el Buffer R y el Buffer Y (una vez deshelados), del mismo modo también se coloca la placa de tipaje PCR-SSP.

En primer lugar se procede a preparar la Pre Master Mix (o premezcla maestra) en la estación de trabajo de la PCR. En el tubo de la Pre Master Mix (de 1,5 ml.) para cada muestra de DNA se pipetea 70 µl. de Buffer R, 140 µl. de Buffer Y y 1,6 µl. de polimerasa Taq (muy utilizada en PCR). Este tubo se lleva al vórtex. En el último pocillo de la placa de tipaje PCR-SSP se vierten 10 µl. de la Pre Master Mix que va a funcionar como control negativo. A continuación en el tubo de Pre Master Mix se pipetea 60 µl. de la muestra de DNA y se lleva al vórtex, de manera que ya se obtiene el tubo con la Master Mix (o mezcla maestra).

El en siguiente paso se vierten 10 µl. de la Master Mix en cada uno de los 23 pocillos de la placa de tipaje PCR-SSP, asegurando que no hay gotas de Master Mix en las paredes de los pocillos. Se cierran los pocillos de la placa de tipaje PCR-SSP con tiras de tapas.

A continuación se coloca la placa de tipaje directamente en el termociclador Gene Amp® PCR System 9700 y se introduce el programa para llevar a cabo la PCR (figura 10).

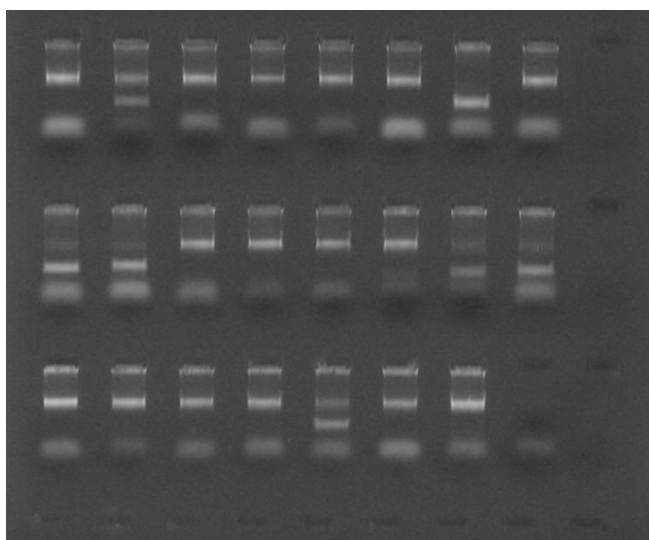
**Figura 10. Programa PCR.**

<b>Protrans SSP Cyclor Program</b>			
Initial denaturation	94°C	2 min	Hold
Denaturation	94°C	15 sec	10 cycles
Annealing and Extension	65°C	60 sec	
Denaturation	94°C	15 sec	20 cycles
Annealing	61°C	50 sec	
Extension	72°C	30 sec	
Hold	4°C	15 min	Hold
<b>Ramp rate 1°C/sec</b>			

El producto de la amplificación de la PCR se visualiza mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñida con bromuro de etidio (dos gotas).

El resultado de la electroforesis (figura 11) se observa en un transiluminador N-90. La comparación de los resultados junto a la tabla de amplificación PROTRANS® incluida en el kit nos permite conocer la posición exacta, la designación, la especificidad de alelo y el tamaño de cada fragmento. Teniendo en cuenta que los pares de cebadores de control interno generan un fragmento de amplificación de 440 pb, y los alelos o grupos de productos de amplificación específicos son <240 pb.

**Figura 11. Tipaje de los loci HLA DQ y DR por PCR-SSP**



### **3.3.3 Ensayos histológicos**

#### **3.3.3.a Estudio histológico**

El estudio anatomopatológico de las biopsias intestinales es realizado por el servicio de anatomía patológica del Hospital.

#### **3.3.3.b Estudio Inmunofenotípico de los linfocitos intraepiteliales (LIEs)**

El intestino es un órgano linfoide primario. El tejido linfoide asociado a la mucosa gastrointestinal, está integrado por dos compartimentos, uno difuso (formado por los LIEs y los linfocitos de la lámina propia-LP) y otro, organizado (compuesto por las placas de Peyer, el apéndice, los ganglios linfáticos mesentéricos y los folículos linfoides del epitelio). Los LIEs están situados entre la membrana basal y la luz intestinal, dispersos entre los enterocitos. Constituyen una población muy heterogénea, predominando, en el intestino delgado la subpoblación de LT con receptor TCR $\alpha\beta$ , seguida de los LIE NK-like, siendo los LT TCR  $\gamma\delta$  minoritarios.

Las biopsias intestinales son remitidas por el servicio de Gastroenterología infantil. La muestra de la biopsia se traspasa a un tubo greiner con 10 ml. de medio de cultivo completo (RPMI 1640 con 10% de suero de ternera fetal y L-glutamina). Estos tubos, previamente preparados, se encuentran almacenados en una nevera a unos 2-5 °C, pasándose a una a estufa a 37°C para que se atemperen minutos antes de comenzar el análisis. Antes de poner la biopsia en el tubo, hay que añadir al tubo greiner 100 microlitros de cada una de las alícuotas congeladas de DTT a 0,1M y EDTA a 0,1M.

Se pone a agitar el tubo greiner con la biopsia durante una hora a 50 rpm en un agitador orbital. Al terminar la incubación se agita en el vortex durante 30 segundos.

Se centrifugan los 10 ml. de medio (sin coger la biopsia) en 2 tubos del citómetro durante 5 minutos a 1500 rpm. Se decanta el sobrenadante, y se resuspenden los linfocitos del



precipitado para a continuación pasarlos a 2 tubos de citómetro (50-100 microlitros de muestra cada uno). En uno de ellos se realiza el marcaje, y el otro tubo se guarda en nevera por si hubiera que repetir el marcaje.

Los anticuerpos monoclonales (5 microlitros de cada uno) empleados en el marcaje son: CD45 PercP (antígeno común leucocitario), CD3 APC, TcR Gamma/Delta PE, CD103 Fitc (Monoclonal Becton Dickinson).

Tras 15 minutos de incubación con los anticuerpos monoclonales se añaden 100 microlitros de PBS, y posteriormente se adquieren en el citómetro FACSCalibur cuatro colores, obteniéndose los valores necesarios. El software utilizado para obtener los gráficos y los resultados es BD CellQuest™ Pro Software.

Se informan los valores del % total de linfocitos intraepiteliales (seleccionados por SSC- Height (que marca la complejidad interna celular) y CD45+), y sobre estos linfocitos se determina el % de linfocitos TCR  $\gamma\delta$  y el % de CD3-, CD103+ (NK-like).

### **3.4 Estudio de la incidencia**

La incidencia se ha calculado como el número de casos positivos por cada 100.000 pacientes pediátricos en el área sanitaria de A Coruña. El número de potenciales pacientes pediátricos se ha obtenido a partir del número de tarjetas sanitarias activas en menores de 15 años del total de las expedidas por el SERGAS en el período estudiado (2012-2014).

### **3.5 Análisis estadístico de los datos**

El estudio estadístico llevado a cabo en este trabajo fue realizado empleando la versión 20.00 del software SPSS para Windows. Mediante esta herramienta se realizaron estudios de homogeneidad entre grupos de edad, sexo y presentación clínica para antecedentes familiares, enfermedades asociadas, biopsias y estudio histológico, En el caso de presentación clínica y síntomas y signos el estudio de homogeneidad se realizó sólo entre grupos de edad y sexo. Estas comparaciones se han llevado a cabo mediante el test no paramétrico Chi-cuadrado de Pearson. Con este mismo software se realizó el estudio estadístico de los valores obtenidos en el análisis de los LIEs. En primer lugar se calcularon medidas descriptivas básicas como la media, mediana, desviación típica, y rangos intercuartílicos Q1 (25%) y Q3 (75%). A continuación, se procedió a estudiar la existencia o no de homogeneidad entre los grupos de pacientes con EC, no EC y EC latente atendiendo a los valores de LIEs, para ello se procedió a la realización de ANOVA. Al requerir ANOVA la existencia de normalidad se decidió utilizar los test de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-Wilk. El resultado de estos test nos condujo a la realización del test no paramétrico de Kruskal-Wallis para observar la presencia o ausencia de diferencias entre los grupos. Por último se examinó la relación existente entre los valores de LIEs y el resultado del análisis anatomopatológico de las biopsias, para ello se utilizó el test de no paramétrico de Mann-Whitney. El estudio del tipaje HLA se resolvió observando las frecuencias de los diferentes fenotipos encontrados. Para todos los estadísticos realizados hemos considerando presencia de significación estadística cuando el p-valor obtenido fue inferior a 0,05.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Diagnóstico

Durante el período temporal que abarca este estudio se han examinado 56 pacientes con sospecha de presentar EC, siendo diagnosticados (según criterios ESPGHAN) un total de 46 nuevos casos de esta enfermedad (3 de ellos con EC latente). Los 10 pacientes que no han sido diagnosticados de EC son sometidos a seguimiento debido a que el 60% forman parte del grupo de riesgo, por presentar alguna patología asociada (como por ejemplo déficit de IgA o déficit de hierro) o tener antecedentes familiares, el 30% presentan sintomatología digestiva y el 10% restante presentan serología positiva.

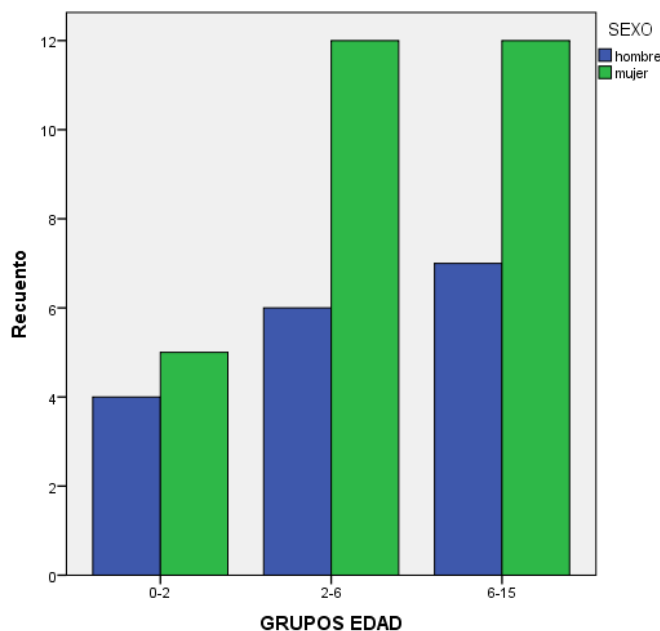
### 4.2 Sexo

Dentro de los pacientes diagnosticados con EC el 63,0% fueron mujeres y el 37,0% hombres, siendo el número total de mujeres de 29 y el de hombres 17, estableciéndose de esta manera un ratio mujer/hombre de 1,71:1.

### 4.3 Grupos de edad

El 19,6% de los diagnósticos se han producido durante los dos primeros años de vida, el 39,1% en niños de 2 a 6 años y el 41,3% en niños de 6 a 15 años, siendo respectivamente el número total de casos en cada grupo del valor de 9, 18 y 19, y apareciendo en todos ellos un mayor número de mujeres que de hombres (Figura 12).

**Figura 12. Número de pacientes diagnosticados por grupo de edad y sexo**

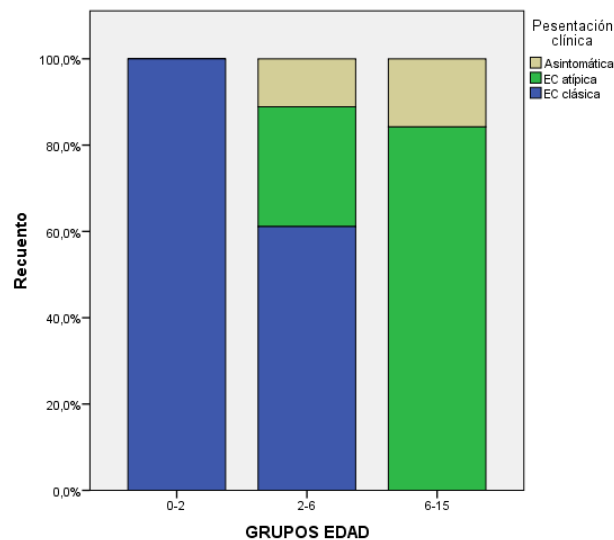


### 4.4 Presentación clínica

Se ha observado que el 43,5% de los pacientes muestran síntomas clásicos, el 45,7% muestran síntomas atípicos y el 10,9% son asintomáticos. Al comparar los tres grupos de diferente

presentación clínica (EC clásica, EC atípica y EC asintomática) con los tres grupos de edad hayamos diferencias significativas ( $p$ -valor= 7,0e-06), no se observan diferencias por sexo. La EC clásica se ha presentado en una mayor proporción en los dos primeros grupos de edad (de 0-2 años y de 2-6 años), mientras que la EC atípica se ha presentado en una mayor proporción en el último grupo de edad (de 6 a 15 años) (figura 13). Es importante reseñar que en el grupo de menor edad la totalidad de diagnosticados presentaban EC clásica mientras que en el grupo de mayor edad no se ha encontrado ningún caso de este tipo.

**Figura 13. Presentación clínica por grupos de edad en pacientes diagnosticados de EC**



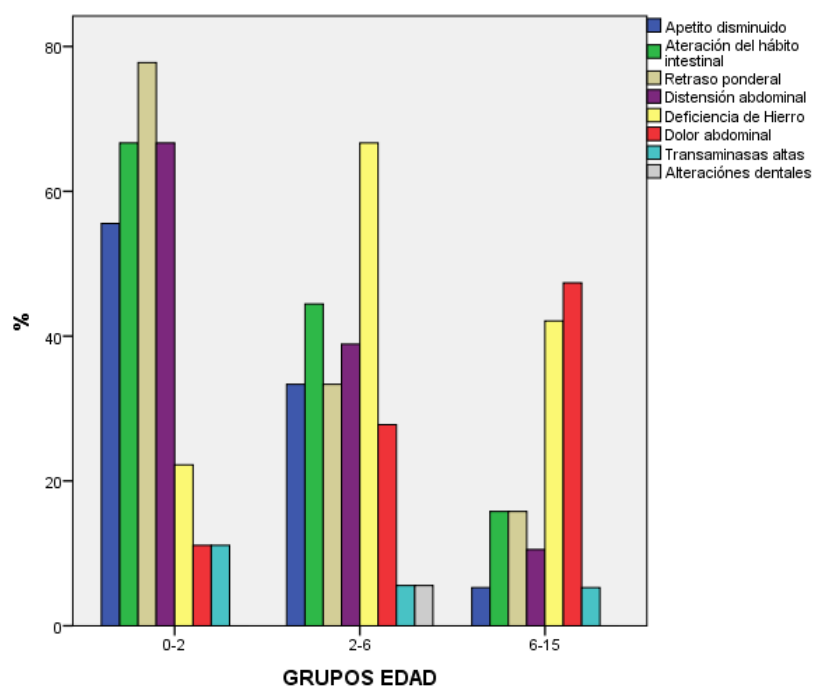
#### 4.5 Antecedentes familiares

Se han presentado antecedentes familiares (de primer, segundo o ambos grados) en el 21,7% de los pacientes, dentro de este grupo el 60% muestra antecedentes familiares de primer grado y el 40% de segundo grado. No se observan diferencias significativas en el estudio comparado con grupos de edad, sexo y presentación clínica.

#### 4.6 Síntomas y signos

Los síntomas y signos que se han encontrado con mayor frecuencia son la deficiencia de hierro (47,8%), la alteración del hábito intestinal (37%) y el retraso pondero-estatural (34,8%). Todos los síntomas y signos han sido estudiados por grupos de edad y sexo, no observándose diferencias significativas entre hombres y mujeres. Realizando el estudio por grupos de edad, se ha observado que la disminución de apetito, la alteración del hábito intestinal, el retraso ponderal, la distensión abdominal y la elevación de las transaminasas son más frecuentes en niños diagnosticados durante los dos primeros años de vida; el déficit de hierro y las alteraciones dentales tienen una mayor frecuencia en los niños de 2 a 6 años y el dolor abdominal y otras alteraciones se presentan sobre todo en los individuos de mayor edad (figura 14). En la tabla 3 se presentan estos resultados por grupos de edad, donde se observa que hay diferencias significativas en los cuatro primeros síntomas, siendo éstos, cuatro de los cinco síntomas más comunes en niños de edad temprana.

**Figura 14. Porcentaje de presentación de signos y síntomas clínicos por grupos de edad**



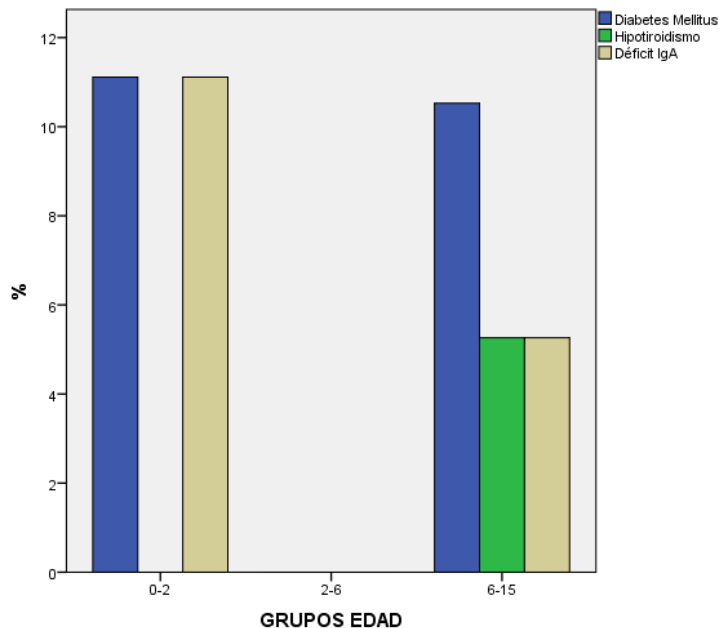
**Tabla 3. Signos y síntomas clínicos por grupos de edad**

Síntomas	0-2 años (%)	2-6 años (%)	6-15 años (%)	p-valor
Disminución de apetito	55,6	33,3	5,3	0,012
Alteración del hábito intestinal	66,7	44,4	15,8	0,024
Retraso ponderal	77,8	33,3	15,8	0,006
Distensión abdominal	66,7	38,9	10,5	0,010
Déficit de hierro	22,2	66,7	42,1	0,075
Dolor abdominal	11,1	27,8	47,4	0,138
Transaminasas altas	11,1	5,6	5,3	0,824
Alteraciones dentales	0	2,2	0	0,452
Otras alteraciones	11,1	0	21,1	0,330

## 4.7 Enfermedades asociadas

Se han encontrado enfermedades asociadas en el 10,9% de los pacientes: diabetes mellitus tipo 1 (6,5%), hipotiroidismo (2,2%) y deficiencia de Ig A (4,3%), viéndose además que la presentación de estas enfermedades es mayor en la primera etapa de vida, salvo el hipotiroidismo (Figura 15). No se observan diferencias significativas en el estudio comparado con grupos de edad, sexo y presentación clínica.

**Figura 15. Enfermedades asociadas por grupos de edad en pacientes diagnosticados de EC**



## 4.8 Serología

Del total de los pacientes diagnosticados con EC, el 81,8 % (44 pacientes) ha presentado un resultado de ATGG de clase IgA superior a 50 mg/dl. De los 32 pacientes a los que se les ha realizado el EMA de clase Ig A el 100% (30 pacientes) ha presentado un EMA positivo, del mismo modo el 100% (2 pacientes) de los pacientes que han presentado un valor total de IgA bajo muestran un valor de ATGG de clase Ig G elevado y un EMA positivo

## 4.9 Estudio histológico e inmunofenotípico de LIEs

Siguiendo el algoritmo de diagnóstico promulgado por la ESPGHAN (2012) se ha requerido la realización de biopsia en el 30,4% (14 pacientes de un total de 46) de los pacientes que presentaron un valor de ATGG elevado, bien de clase Ig A o Ig G. El 78,6% de las biopsias se llevaron a cabo en el grupo de edad de 6 a 15 años, mientras que el 21,4% restante se realizaron en el segundo grupo, de 2 a 6 años. Del mismo modo el 42,9% de las biopsias se han realizado en hombres y el 58,1% restante en mujeres. Estadísticamente no se observan diferencias significativas a la hora de la realización de la biopsia, ni entre grupos de edad ni entre sexo. Por otra parte, al comparar la realización de biopsias con la presentación clínica de la enfermedad (EC clásica, EC atípica y EC asintomática) sí se aprecian diferencias significativas ( $p$ -valor=0,01), habiéndose realizado el 71,4% de las biopsias en pacientes con EC atípica, el 7,1% en pacientes con EC clásica y el 21,5% restante en pacientes con EC asintomática. De los

10 pacientes encuadrados como no celiacos se ha procedido la realización de biopsia a tres de ellos según criterios ESPGHAN, estos pacientes reflejaban otras patologías asociadas a la EC y presentaban AATG positivo pero cuyo valor total era inferior a 10 veces el valor de referencia .

El estudio histológico de las muestras biopseadas refleja atrofia vellositaria en el 78,6% de los pacientes que fueron sometidos a esta técnica. En este aspecto tampoco se observan diferencias significativas ni entre grupos de edad ni entre hombres y mujeres, pero sí, al igual que en la realización de biopsias, entre las diferentes presentaciones clínicas ( $p$ -valor=0,005). El 90,0% de los pacientes con EC atípica presentan atrofia vellositaria, este valor disminuye hasta el 66,7% en pacientes con EC asintomática, mostrando una ausencia de casos en pacientes con EC clásica. Ninguno de los pacientes diagnosticados como no celiacos, y que reflejaban otras patologías, ha presentado una histología compatible con la EC.

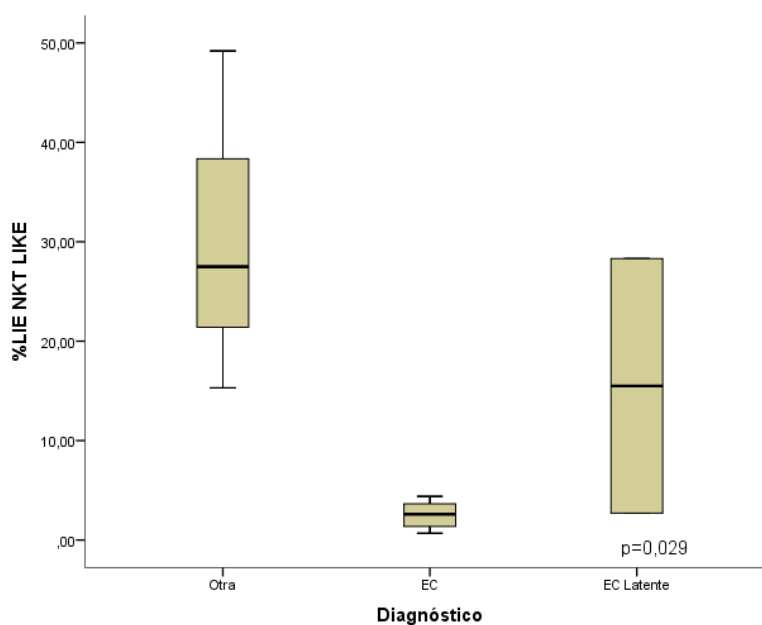
Al realizar el estudio de los linfocitos intraepiteliales (LIEs) hemos obtenido el % de LIEs totales, el % de LIEs TCR- $\gamma\delta$  y el % de LIEs NK-like para cada paciente. Con estos valores hemos calculado medidas descriptivas básicas como la media, mediana, desviación típica, y rangos intercuartílicos Q1 (25%) y Q3 (75%) (Tabla 4).

Al proceder a la realización del análisis ANOVA se obtiene mediante la utilización del test de Kolmogorov-Smirnov que el % de LIEs NK-like no muestra una distribución normal ( $p$ -valor=0,002), con un test más potente, como el de Shapiro-Wilk, la conclusión obtenida es la misma ( $p$ -valor=0,015). Debido a ello se decide realizar la comparación entre los pacientes con EC, EC latente y sin EC (que reflejan otras patologías) que fueron sometidos a un estudio de LIEs mediante el test de Kruskal-Wallis, test no paramétrico que nos permite conocer si tres o más grupos presentan diferencias sin necesidad de que exista normalidad y homocedasticidad. Mediante este test sólo se han obtenido diferencias significativas en el % LIEs NK-like ( $p$ -valor=0,029), donde los pacientes con EC han obtenido recuentos más bajos. Si observamos visualmente los resultados (figura 16) vemos como en pacientes diagnosticados con EC el % de LIEs NK-like es menor que en los otros dos grupos.

**Tabla 4. Medidas descriptivas básicas en estudio de LIEs en pacientes sospechosos de EC**

Diagnóstico		%LIE NK-LIKE	%LIE TCR-GD	%LIE TOTALES
<b>EC</b>	<b>N</b>	11	11	11
	<b>Media</b>	2,46	25,85	13,73
	<b>Mediana</b>	2,59	24,40	14,70
	<b>Desviación típica</b>	1,32	12,95	5,13
	<b>Q1</b>	0,69	10,40	3,92
	<b>Q3</b>	4,39	47,18	9,10
<b>EC LATENTE</b>	<b>N</b>	2	2	2
	<b>Media</b>	15,50	22,80	7,45
	<b>Mediana</b>	15,50	22,80	7,45
	<b>Desviación típica</b>	18,10	26,87	2,33
	<b>Q1</b>	2,70	3,80	5,80
	<b>Q3</b>	28,30	41,80	9,10
<b>NO EC (otras patologías)</b>	<b>N</b>	3	3	3
	<b>Media</b>	30,66	9,03	6,23
	<b>Mediana</b>	27,50	8,70	5,60
	<b>Desviación típica</b>	17,17	5,70	2,31
	<b>Q1</b>	15,30	3,50	4,30
	<b>Q3</b>	49,20	14,90	8,80

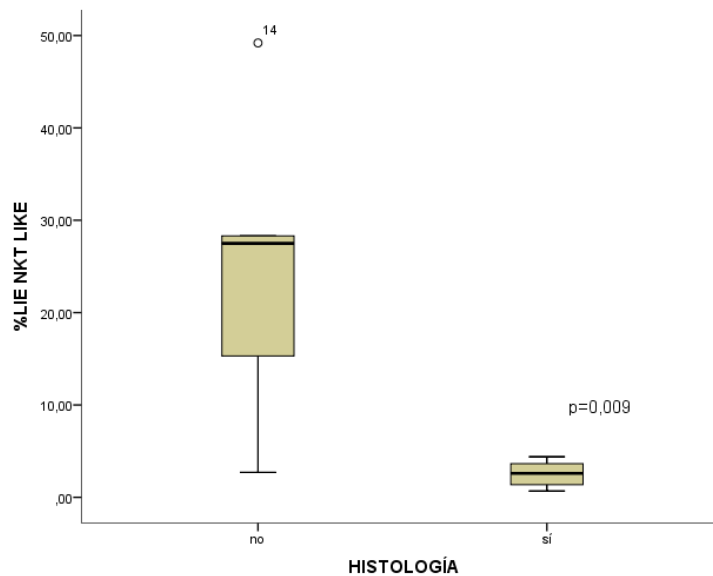
**Figura 16. % LIEs NK-like para los grupos sin EC (otras patologías), con EC y con EC latente**



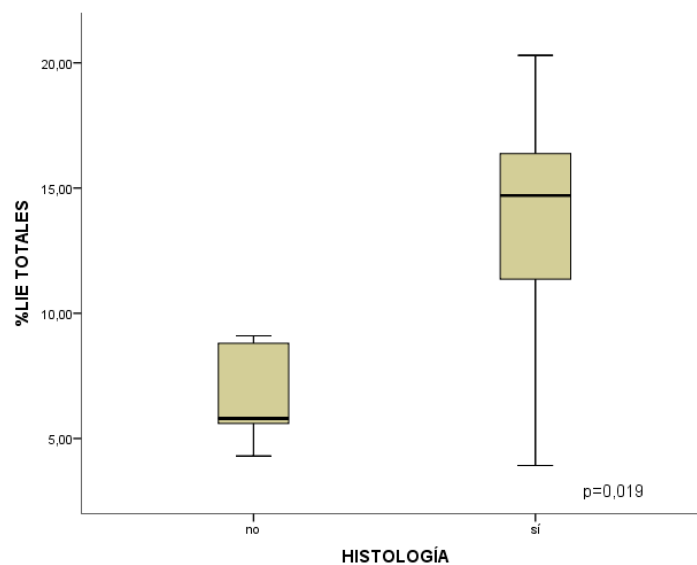
Tomando en cuenta los valores de referencia utilizados por el hospital observamos que la totalidad de los pacientes con EC presentan una elevación de los LIEs TCR- $\gamma\delta$  por encima de los valores normales (5-10%) y una disminución de los LIEs NK-like por debajo de los valores normales (35-45%), mientras que un 63,63% de los pacientes con EC presentan un % total de LIEs por encima de los valores normales (5-15%).

Se han comparado mediante el test no paramétrico de Mann-Whitney, los resultados obtenidos del estudio de los LIEs con los resultados del análisis anatomopatológico de la muestra biopsiada observándose que los valores del % total de LIEs y el % de LIEs NK-like son significativos, (p-valor=0,019 y p-valor=0,09) (figura 17 y 18) de manera que existen diferencias significativas entre los pacientes que presentan una histología compatible con EC y los pacientes que presentan una histología normal para el % total de LIEs y el % de LIEs NK-like.

**Figura 17. % LIEs NK-like para pacientes con histología compatible y no compatible con EC.**



**Figura 18. % LIEs totales para pacientes con histología compatible y no compatible con EC.**

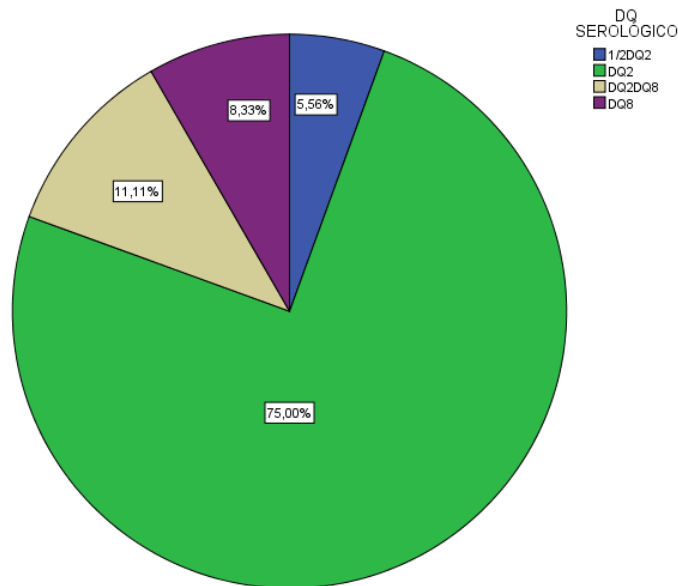




## 4.10 Tipaje HLA

El tipaje HLA se ha llevado a cabo en el 78,3% del total de pacientes (36 pacientes de los 46 totales). De estos 36 pacientes el 75% muestra un fenotipo DQ2, el 11,11% DQ2/DQ8, el 8,33% DQ8 y el 5,5% final ½ DQ2. Siendo de esta forma el 83,33% DQ2 positivos. Dentro del fenotipo DQ2 diferenciamos los siguientes haplotipos: 33,3% DR3-DQ2/DR3-DQ2, el 22,2% DR3-DQ2/-, el 22,2% DR3-DQ2/DR7-DQ2 y el 14,8% DR7-DQ2/DR5.

Figura 19. DQ serológico en pacientes diagnosticados de EC



## 4.11 Incidencia de la EC

En el período en el que se ha llevado a cabo el estudio, el número medio de niños menores de 15 años en el Área Sanitaria de A Coruña fue de 65.856 (valor obtenido del número de tarjetas sanitarias activas entre 2012-2014). Durante los 24 meses de estudio se han diagnosticado un total de 46 nuevos casos de EC, por tanto la incidencia global estimada es de 34,92 casos por cada 100.000 personas-año.

## 5. DISCUSIÓN

Este constituye el primer estudio sobre nuevos diagnósticos de EC en niños en el Área Sanitaria de A Coruña.

En cuanto a la distribución por género se observa que la EC ha sido diagnosticada en una mayor proporción de mujeres que hombres, ratio 1,71:1. A pesar de que estadísticamente no se aprecian diferencias significativas, este valor es muy semejante al de otros estudios realizados en España que hablan de un ratio de 1,52:1 (Cilleruelo-Pascual *et al.*, 2014) o 1,9:1 (Díaz de Entresotos *et al.*, 2007), existiendo estudios que muestran valores algo más elevados en torno al 3:1 (Aparicio, 2010). En Europa aparecen valores algo más diversos, como por ejemplo 3,33:1 en Italia (Ciacci *et al.*, 1995), 2:1 en Suecia (Ivarsson *et al.*, 2003) o 1,52:1 en Turquía (Kuloglu *et al.*, 2009), a pesar de que los ratios varían, en la práctica totalidad de los

estudios llevados a cabo hasta la fecha a nivel mundial se observa, igual que en este caso, una mayor aparición de la enfermedad en mujeres que hombres.

En nuestro estudio la mayoría de los diagnósticos (41,3%) se llevó a cabo en el grupo de mayor edad, de 6 a 15 años. Aunque no hayan aparecido diferencias significativas en el diagnóstico para los diferentes grupos de edad, este hecho coincide con estudios recientes en donde la enfermedad se diagnosticó preferentemente a edades mayores de 6 años (Telega *et al.*, 2008; McGowan *et al.*, 2009; Savilathi *et al.*, 2010).

A lo largo de los 2 años de estudio se observó que la mayoría de los pacientes que han sido diagnosticados muestran una sintomatología atípica de la enfermedad (EC atípica) (45,7%) mientras que los pacientes con una sintomatología típica (EC clásica) aparecen en un porcentaje ligeramente menor (43,5%). La mayor aparición de sintomatología atípica coincide con la mayoría de estudios recientes que muestran un descenso en la aparición de síntomas típicos en los últimos años, situándose este porcentaje entre el 15-45% de nuevos casos de EC diagnosticados (Ravikumara *et al.*, 2006; Garampazzi *et al.*, 2007; McGowan *et al.*, 2009). No obstante, otros estudios hablan de un mayor porcentaje de diagnósticos de EC clásica que de EC atípica (Donat, 2010; White *et al.*, 2012; Cilleruelo-Pascual *et al.*, 2014). La aparición de formas asintomáticas de la EC se sitúa en todos los estudios como la forma de presentación menos común, aunque con porcentaje mayores que el que hemos observado nosotros (16-28% vs. 10,9%) una posible explicación de esto es el exhaustivo estudio de síntomas teóricamente menores realizado en nuestro caso (Ravikumara *et al.*, 2006; Garampazzi *et al.*, 2007; McGowan *et al.*, 2009; Cilleruelo-Pascual *et al.*, 2014).

A pesar del menor número de diagnósticos de EC clásica que de EC atípica se ha observado que este tipo de EC aparece predominantemente a edades tempranas, en nuestro estudio este valor es del 100% en niños de 0-2 años y sobrepasa el 50% en niños de 2-6 años. Múltiples estudios reflejan la elevada proporción de la EC clásica en niños de temprana edad, McGowan y colaboradores (2009) afirmaron que el 67% de los casos de EC por debajo de los 3 años se da con sintomatología típica, otros autores también afirman que la EC clásica sobrepasa el 60% en esta edad (Farre *et al.*, 2002; Kuloglu *et al.*, 2009; Dinler *et al.*, 2009), estos valores probablemente sean debidos a la persistencia del gluten en la dieta.

De los síntomas estudiados la deficiencia de hierro es el que ha aparecido en una mayor proporción (47,8%), estudios previos ya indican a la ferropenia o déficit de hierro como el síntoma más común en pacientes pediátricos con EC (Jones *et al.*, 2006; Aparicio, 2010). Se cree que este hecho puede estar ligado, además de a la falta de nutrientes, a la interacción de factores locales y sistémicos (Aparicio, 2010). La mayoría de los síntomas examinados se presentan en una mayor proporción en niños de 0-2 años que en los otros dos grupos de edad (cinco de los nueve síntomas son más frecuentes en el primer grupo de edad), exceptuando el déficit de hierro, el dolor abdominal, alteraciones dentales y otras alteraciones. Los síntomas que aparecen mayoritariamente en los niños de 0-2 años son síntomas encuadrados en la definición de EC clásica, EC que, como acabamos de ver, aparece predominantemente en este grupo de edad. Como ya se comentó en la introducción, en la EC clásica predominan los síntomas gastrointestinales derivados de la ingesta de gluten, considerando síntomas gastrointestinales a los síntomas estudiados tales como apetito disminuido, alteración del

hábito intestinal, distensión abdominal y en consecuencia retraso ponderal. Por tanto de los síntomas que se encuentran en mayor proporción en niños de edad temprana sólo la elevación de las transaminasas no se considera un síntoma gastrointestinal. El resto de síntomas: déficit de hierro, alteraciones dentales, otras alteraciones, junto a la ya mencionada elevación de transaminasas, se consideran síntomas encuadrados dentro de la EC atípica. De esta manera el dolor abdominal sería el único síntoma gastrointestinal que no se presenta mayoritariamente a edad temprana. No obstante un estudio reciente llevado a cabo por Savilathi y colaboradores (2010) muestra que el dolor abdominal, aún siendo un síntoma gastrointestinal, se encuentra mayoritariamente en los pacientes pediátricos de edad más avanzada, del mismo modo otro estudio llevado a cabo por Rodrigo y colaboradores (2006) muestra que la elevación de transaminasas o hipertransaminasemia aparece mayoritariamente a edades tempranas. Por tanto los resultados obtenidos concuerdan con la presentación clínica más común de la enfermedad distinguiendo los niños menores de dos años, donde la EC clásica es la EC que se presenta mayoritariamente, y a los niños mayores de dos años, donde la EC atípica es la EC que se presenta en la mayoría de los casos.

En nuestro estudio hemos encontrado que el 21,7% de los pacientes con EC muestran antecedentes familiares, cifra muy similar a la publicada en otros estudios. Aparicio (2010) habla de un 20% de pacientes con antecedentes familiares, refiriendo que un 50% presenta antecedentes familiares de primer grado y un 28,3% de segundo grado, Cilleruelo y colaboradores (2014) también reflejan un resultado similar ya que el 19,4% muestran antecedentes de primer o segundo grado. La mayoría de los estudios sólo hacen referencia a antecedentes familiares de primer grado, obteniéndose diferentes frecuencias que varían desde un 4,55% (Fasano *et al.*, 2005) hasta un 17,7% (Biagi *et al.*, 2008), situándose nuestro valor obtenido dentro de este rango, 13,02%.

Se han observado enfermedades asociadas en el 10,9% de los casos, teniendo en cuenta que en nuestro estudio sólo han aparecido tres enfermedades asociadas (siendo dos autoinmunes: diabetes mellitus tipo 1 e hipotiroidismo) que según la bibliografía consultada son las más comunes en casos de EC. Según Ventura y colaboradores (1999) las enfermedades autoinmunes se encuentran en el 14% de los niños celiacos, siendo la diabetes mellitus tipo 1 la enfermedad más común. Neuhausen y colaboradores (2008) obtuvieron un resultado similar (13,2%), aumentando el porcentaje hasta el 19% según Aparicio (2010). Dentro de las dos enfermedades autoinmunes estudiadas la que se ha encontrado en una mayor proporción ha sido la diabetes mellitus tipo 1 (6,5%), valor ligeramente superior a los estudios realizados hasta la fecha que hablan de un 2,5-5% (Baptista *et al.*, 2005; Gazit *et al.*, 2008). La segunda enfermedad asociada en frecuencia ha sido el déficit de IgA (4,3%), siendo este valor ligeramente superior a otros estudios (Cataldo *et al.*, 2006). El hecho de que aparezcan enfermedades autoinmunes con mayor frecuencia en pacientes diagnosticados de EC que en el resto de la población podría deberse a factores genéticos comunes entre ambas enfermedades (Hemminki *et al.*, 2010).

La realización de biopsia ha sido necesaria sobre todo en pacientes con EC atípica (71,4%), mientras que en los pacientes con EC clásica el número de biopsias fue mucho menor (7,1%), el porcentaje restante se llevo a cabo en pacientes asintomáticos, siendo estas diferencias significativas. La gran diferencia ocasionada es resultado de los criterios ESPGHAN y de la

relativamente sencilla observación y detección por parte de los facultativos de los síntomas típicos de la enfermedad que aparecen en la EC clásica, permitiendo confirmar el diagnóstico sin necesidad de llevar a cabo una técnica tan invasiva como la biopsia.

A partir de las biopsias se ha observado que la atrofia vellositaria se produce sobre todo en pacientes con EC atípica (90,0%) mientras que en los pacientes con EC clásica la totalidad de las biopsias son normales.

En el estudio de LIEs, y a pesar de que estadísticamente sólo existen diferencias significativas entre los pacientes con EC, sin EC (otras patologías) y con EC latente en el % de LIEs NK-like, vemos como los valores de las medias varían ampliamente entre unos pacientes y otros. Los resultados obtenidos son consecuentes con la bibliografía, de manera que en aquellos pacientes con EC se obtienen elevados valores para % LIEs totales y % LIEs  $\gamma\delta$ , y valores disminuidos para el % de LIEs NK-like, viendo como los pacientes con EC latente muestran resultados intermedios.

El estudio comparado entre los LIEs y la observación anatomopatológica muestra que existen diferencias entre el % LIEs totales y % LIEs NK-like respecto a una histología normal o una histología compatible con EC. Este resultado concuerda con lo esperable, ya que en un tejido no dañado el % total de LIEs será menor que en un tejido atrofiado, manteniéndose los otros dos parámetros dentro de la normalidad. De esta manera el linfograma de los pacientes con histología positiva presentan las alteraciones características de la EC.

En cuanto al resultado del tipaje HLA, el fenotipo DQ2 es el que ha mostrado una frecuencia mayor (75%), este valor es algo inferior a otros estudios realizados (Hernández-Charro *et al.*, 2008; Donat *et al.*, 2009). Cilleruelo-Pascual y colaboradores (2014), que elaboraron el estudio más completo realizado hasta la fecha en España, el 88,3% de los pacientes fueron DQ2, el 8,4% DQ2/DQ8, el 2,3% DQ8 y 1% otros. Al comparar estos valores con los obtenidos en nuestro trabajo vemos que los valores para DQ2 son ligeramente inferiores, ganando una mayor frecuencia el DQ8.

Dentro del fenotipo DQ2 la forma más habitual es la homocigótica (DR3-DQ2/DR3-DQ2), seguida de las formas DR3-DQ2/DR7-DQ2 y DR3-DQ2/-. Las dos primeras formas, consideradas de alto riesgo (Ros Arnal *et al.*, 2007), se suelen encontrar en frecuencia similar (Ploski *et al.*, 1993; van Heel, 2005), mientras que en nuestro estudio difieren ligeramente, esto puede ser debido a diferencias en el origen étnico de las poblaciones, lo que estaría relacionado con los genotipos de la población general.

Respecto a la incidencia, en nuestro estudio hemos determinado una incidencia de 34,92 casos por cada 100.000 personas-año. Estos valores son relativamente inferiores a los 44 casos por cada 100.000 personas-año en Suecia, incidencia mayor registrada hasta 2014 (Olsson *et al.*, 2008), o a los datos recién publicados en España de 54 casos por cada 100.000 personas-año. No obstante, esta cifra es considerablemente elevada en comparación con otros estudios, como por ejemplo el llevado a cabo en EE.UU, que establece una incidencia de 17,4 casos por cada 100.000 personas-año (Ludvigsson *et al.*, 2012), o el llevado a cabo en el Reino Unido, que establece una incidencia de 19,1 casos por cada 100.000 personas-año (West *et al.*, 2014).

Por tanto, la incidencia en el Área Sanitaria de A Coruña es mayor que en otros lugares del mundo, pero ligeramente inferior a la media española.

### 6. CONCLUSIONES

De este trabajo podemos establecer las siguientes conclusiones:

- La EC ha aparecido en mayor proporción en mujeres que hombres, 1,71:1.
- Se obtiene un mayor número de diagnósticos de EC en individuos de mayor edad.
- Atendiendo a la edad se presenta un tipo u otro de enfermedad, apareciendo en una gran proporción la EC clásica en individuos de edad temprana y EC atípica en individuos de edad mayor.
- Casi la cuarta parte de los enfermos presentan antecedentes familiares (21,7%).
- El síntoma más frecuente ha sido la deficiencia de hierro (47,8%). Los síntomas que se presentan varían dependiendo del grupo de edad, resultado de la clase de EC mayoritaria a cada edad.
- El 10,9% de los pacientes presenta una enfermedad asociada, siendo predominante la diabetes mellitus tipo 1.
- El 30,4% de los pacientes fueron sometidos a biopsia, realizándose predominantemente en los individuos de mayor edad, obteniéndose diferencias en la realización de la biopsia atendiendo al tipo de EC.
- El 78,6% de los pacientes estudiados muestran atrofia vellositaria, ascendiendo este valor hasta el 90,9% en los enfermos celíacos.
- Estadísticamente existen diferencias entre el % de LIEs NK-like para pacientes con EC, EC silente y no EC (otras patologías), no obstante el resto de porcentajes también difieren.
- Existen diferencias significativas entre los pacientes que presentan una histología compatible con EC y los pacientes que presentan una histología normal para el % total de LIEs y el % de LIEs NK-like, el % de LIEs  $\gamma\delta$  también difiere.
- Las tres cuartas partes de los pacientes presentan DQ2, siendo el DR3-DQ2/DR3-DQ2 el haplotipo más abundante.
- Se ha obtenido una incidencia de 34,92 casos de EC por cada 100.000 personas-año, valor bastante elevado.

### 7. AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a la Dra. Esther Rodríguez Belmonte y a la Dra. Pilar Sánchez Mozo el haber decidido dirigir este estudio a pesar de la gran carga de trabajo que tienen cada día y el poco tiempo del que disponen, sin su tutela este trabajo no hubiera sido posible. También me gustaría agradecer al Dr. Javier Cid Fernández el haberme mostrado los ensayos vistos en este estudio, así como a las técnicas de laboratorio del Servicio de Inmunología del Hospital Teresa Herrera su paciencia y ayuda prestada. Especialmente quiero agradecer a la Dra. Silvina Torio Gómez su enorme esfuerzo, dedicación, cercanía y tiempo dedicado a este trabajo desinteresadamente, sin duda la propia existencia del mismo depende de ella. Para finalizar quiero agradecer al Servicio de Bioquímica del Hospital Teresa Herrera, en especial al Dr. Javier Peteiro Cartelle, su orientación y consejo a la hora de realizar este trabajo.

### 8. REFERENCIAS

1. ALAEDINI, A., GREEN, PHR. Narrative review: celiac disease: understanding a complex autoimmune disorder. *Annals of Internal Medicine*. 2005, 142: 289-298.
2. APARICIO, F. *Características de la mucosa intestinal en la enfermedad celíaca, con especial referencia a las células madre del adulto y amplificadoras*. Tesis doctoral. Universidad de La Laguna, 2010.
3. BAPTISTA, ML., KODA, YKL., MITSUNORI, R., NISHIHARA, MSC., IOSHII, SO. Prevalence of Celiac Disease in Brazilian Children and Adolescents with Type 1 Diabetes Mellitus. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 2005, 41(5): 621-624.
4. BIAGI, F., CAMPANELLA, J., BIANCHI, PI., ZANELLATI, G., CAPRIGLIONE, I., KLERSY, C., CORAZZA, GR. The incidence of coeliac disease in adult first degree relatives. *Digestive and Liver Disease*. 2008, 40(2): 97-100
5. BRUEWER, M., LUEGERING, A., KUCHARZIK, T., PARKOS, CA., MADARA, JL., HOPKINS, AM. Proinflammatory cytokines disrupt epithelial barrier function by apoptosis-independent mechanisms. *J Immunol*. 2003, 171(11):6164-72.
6. CALVO, C., MARUGÁN, JM. Clínica de la enfermedad celíaca en niños. En Arranz E y Garrote JA, editores. *Enfermedad celíaca. Introducción al conocimiento actual de la enfermedad celíaca*. Madrid, España: Ergon; 2011. P. 33-46.
7. CAPILLA, A. *Análisis genético y funcional de genes no HLA asociados a la Enfermedad Celíaca*. Tesis doctoral. Universitat de València, 2010.
8. CASTAÑO, L., BLARDUNI, E., ORTIZ, L., NÚÑEZ, J., BILBAO, JR., RICA, I., MARTUL, P., VITORIA, JC. Prospective population screening for celiac disease: High prevalence in the first 3 years of life. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2004, 39: 80-84.
9. CATALDO, F., MONTALTO, G. Celiac disease in the developing countries: A new and challenging public health problem. *World J Gastroenterol*. 2007, 13(15): 2153-2159.
10. CATASSI, C., FABIANI, E. The spectrum of celiac disease in children. *Baillieres clinical gastroenterology*. 1997, 11(3): 485-507.
11. CATASSI, C., MACIS, MD., RATSCH, IM, DE VIRGILJIS, S., CUCCA, F. The distribution of DQ genes in the Saharawi population provides only a partial explanation for the high celiac disease prevalence. *Tissue antigens*. 2001, 58(06): 402-406.
12. CELLIER, C., CERVONI, JP., LEBORGNE, M., MARTEAU, P., LAUDI, B., et al. Gluten free diet induces regression of T-cell activation in the rectal mucosa of patients with celiac disease. *American Journal Of Gastroenterology*. 1998, 93: 1527-1530.

13. CHIRDO, F. Proteínas tóxicas de los cereales. En Arranz E y Garrote JA, editores. *Enfermedad celíaca. Introducción al conocimiento actual de la enfermedad celíaca*. Madrid, España: Ergon; 2011. P. 157-170.
14. CHOO, SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Medical Journal*. 2007; 48(1):11-23.
15. CHORZELSKI, TP., BEUTNER, EH., SULEJ, J., TCHORZEWSKA, H., JABLONSKA, S., KUMAR, V., KAPUSCINSKA, A. Ig A anti-endomysium antibody a new immunological marker of dermatitis herpetiformis and celiac disease. *British Journal of Dermatology*. 1984, 111(4): 395-402
16. CHOTT, A., DRAGOSICS, B., RADASZKIEWICZ, T. Peripheral T-cell lymphomas of the intestine. *American Journal of Pathology*. 1992, 141(6): 1361-1371.
17. CIACCI, C., CIRILLO, M., SOLLAZZO, R., SAVINO, G., SABBATINI, F., MAZZACCA, G. Gender and clinical presentation in adult celiac disease. *Scand J Gastroenterol*. 1995, 30(11): 1077-1081.
18. CICARELLI, G., DELLA ROCA, G., AMBONI, M., CIACCI, C., MAZZACCA, G., FILLA, A., BARONE, P. Clinical and neurological abnormalities in adult celiac disease. *Neurological Sciences*. 2003, 24(5): 311-317.
19. CILLERUELO, MA., ROMÁN, E., JIMÉNEZ, J., RIVERO, MA., BARRIO, J., CASTAÑO, A., CAMPELO, O., FERNÁNDEZ, A. Enfermedad celíaca silente: explorando el iceberg en población escolar. *Anales de pediatría*. 2002, 57(04): 321-326.
20. CILLERUELO-PASCUAL, ML., ROMAN-RIECHMANN, E., SANCHEZ-VALVERDE, F., DONAT, E., MANUEL-RAMOS, J., MARTÍN-ORTE, E., LÓPEZ, MJ., GARCÍA-NOVO, D., GARCÍA, S., PAVÓN, P., MARTÍN, M., et al. A Spanish National Registry of Celiac Disease: Incidence and Clinical Presentation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014, [Epub ahead of print].
21. COLLIN, P., KAUKINEN, K., VÄLIMÄKI, M., SALMI, J. Endocrinological disorders and celiac disease. 2002, 23(4): 464-483.
22. CONSEJERÍA DE SALUD Y SERVICIOS SOCIALES DE LA RIOJA. Diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. 2011
23. CONSELLERÍA DE SANIDADE. Estado actual da enfermidade celíaca. Guía de diagnóstico e tratamento de atención primaria e especializada. 2008.
24. DÍAZ DE ENTRESOTOS, L., DE LA RUBIA, L., LÓPEZ, M., RUÍZ, C., SÁNCHEZ, P., FERNÁNDEZ, P. Estudio de la enfermedad celíaca en la población pediátrica de Cantabria y sus familiares de primer grado. *Gastroenterología y Hepatología*. 2008, 31(2): 53-58.
25. DIETERICH, W., EHNIS, T., BAUER, M., DONNER, P., VOLTA, U., RIECKEN, EO., SCHUPPAN, D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nature Medicine*. 1997, 3(7): 797-801.

26. DINLER, G., ATALAY, E., KALAYCI, AG. Celiac disease in 87 children with typical and atypical symptoms in Black Sea region of Turkey. *World J Pediatr.* 2009, 5(4): 282-286.
27. DONAT, E. *Análisis genético de la enfermedad celíaca*. Tesis doctoral. Universitat de València, 2010.
28. DOWD, B., WALKER-SMITH, J. Samuel Gee, Aretaeus, and The Coeliac Affection. *British Medical Journal.* 1974, 2(5909): 45-47.
29. EIRAS-MARTINEZ, P., CAMARERO-SALCES, C., LEÓN-PRIERTO, F., ROLDÁN-SANTIAGO, E., ASENSIO-VEGAS, A., BARAGAÑO-GONZÁLEZ, M., SÁNCHEZ-MUÑOS, L., BOOTELLO-GIL, A., ROY-ARIÑO, G. Linfocitos intraepiteliales en la enfermedad celíaca. *Anales españoles de pediatría.* 56(3): 224-232.
30. ESPGHAN. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition.* 2012, 54(1): 136-160.
31. FARRÉ, C. Utilidad de la serología en el cribado, diagnóstico y seguimiento de pacientes con enfermedad celíaca. En Rodrigo L y Peña AS, editores. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. Barcelona, España: OmniaScience; 2013. p.151-170.
32. FARRELL, R.J., KELLY, CP. Celiac sprue. *New England Journal of Medicine.* 2002, 346(3): 180-188.
33. FASANO, A., CATASSI, C. Coeliac disease in children. *Best practice & research in clinical gastroenterology.* 2005, 19(3): 467-478.
34. FASANO, A., CATASSI, C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: An evolving spectrum. *Gastroenterology.* 2001, 120(3): 636-651.
35. FERGUSON, A., EARRANZ, E. Clinical and pathological spectrum of celiac disease- reply. *Gut.* 34(12): 1741-1741.
36. FERNÁNDEZ-SALAZAR, L. Endoscopia y otros procedimientos diagnósticos. En Arranz E y Garrote JA, editores. *Enfermedad celíaca. Introducción al conocimiento actual de la enfermedad celíaca*. Madrid, España: Ergon; 2011. P. 129-142.
37. FLECKENSTEIN, B., QIAO, S., LARSEN, MR., JUNG, G., ROEPSTORFF, P., SOLLID, LM. Molecular characterization of covalent complexes between tissue transglutaminase and gliadin peptides. *The Journal of biological chemistry.* 2004, 279(17): 17607- 17616.
38. FREEMAN, HJ. Adult celiac disease and the severe "flat" small bowel biopsy lesion. *Digestive Diseases and Sciences.* 2004, 49(4): 535-545.
39. GARAMPAZZI, A., RAPA, A., MURA, S., CAPELLI, A., VALORI, A., BOLDORINI, R., ODERDA, G. Clinical pattern of celiac disease is still changing. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2007, 45(5): 611-614



40. GARCÍA-LAGARTO, E. Diagnóstico histopatológico. En Arranz E y Garrote JA, editores. *Enfermedad celíaca. Introducción al conocimiento actual de la enfermedad celíaca*. Madrid, España: Ergon; 2011. P. 91-102.
41. GARCÍA NIETO, VM. Historia de la enfermedad celíaca. En Rodrigo L y Peña AS, editores. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. Barcelona, España: OmniaScience; 2013. p.45-59.
42. GARCÍA-NOVO, MD., GARFIA, C., ACUÑA-QUIRÓS, MD., ASENSIO, J., ZANCADA, G., BARRIO-GUTIERREZ, S., MANZANARES, J., SOLÍS-HERRUZO, JA. Prevalence of celiac disease in apparently healthy blood donors in the Autonomous Community of Madrid. *Revista española de enfermedades digestivas*. 2007, 99(6): 337-342.
43. GARROTE, JA. Pruebas de laboratorio. Serología. Marcadores genéticos de riesgo. En Arranz E y Garrote JA, editores. *Enfermedad celíaca. Introducción al conocimiento actual de la enfermedad celíaca*. Madrid, España: Ergon; 2011. P. 103-118.
44. GAZIT, V., TASHER, D., HANUKOGLU, A., LANDAU, Z., BEN-YEHUDA, Y., SOMEKH, E., DALAL, L. Atopy in Children and Adolescents with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *Allergy and Clinical Immunology*. 2008, 9:354-359.
45. GRECO, L. From the Neolithic Revolution to Gluten Intolerance: Benefits and Problems Associated with the Cultivation of Wheat. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 1997, 24: 14-17.
46. GRECO, L., CORAZZA, G., BABRON, MC., CLOT, F., FULCHIGNONI-LATAUD, MC., SELVAGGIA, P., ZAVATTARI, P., BOUGUERRA, F., DIB, C., TOSI, R., TRONCONE, R., VENTURA, A., MANTAVONI, W., MAGAZZU, G., GATTI, R., LAZZARI, R., GIUNTA, A., PERRI, F., IACONO, G., CARDI, DE VIRGILIIS, S., CATALDO, F., DE ANGELIS, G., MUSUMECI, S., FERRARI, R., BALLI, F., BARDELLA, MT., VOLTA, U., CATASSI, C., TORRE, G., ELIAOU, JF., SERRE, JL., CLERGET-DARPOUX, F. Genome search in celiac disease. *American Society of Human Genetics*. 1998, 62: 669-675.
47. GREEN, PHR., CELLIER, C. Celiac Disease. *The New England Journal of Medicine*. 2007, 357: 1731-1743.
48. GREEN, PHR., JABRI, B. Coeliac Disease. *The Lancet*. 2003, 362: 383-391.
49. HADITHI, M., VON BLOMBERG, BM., CRUSIUS, JB., BLOEMENA, E., KOSTENSE, PJ., MEIJER, JW., MULDER, CJ., STEHOUWER, CD., PEÑA, AS. Accuracy of serologic tests and HLA-DQ typing for diagnosing celiac disease. *Annals of Internal Medicine*. 2007, 147(5): 294-302.
50. HEMMINKI, K., LI, X., SUNDQUIST, J., SUNQUIST, K. The epidemiology of Graves' disease: Evidence of a genetic and an environmental contribution. *Journal of Autoimmunity*. 2010, 34(3): 307-313.
51. HERNANDEZ-CHARRO, B., DONAT, E., MINER, I., ARANBURU, E., SANCHEZ-VALVERDE, F., RAMOS-ARROYO, MA. Modifying effect of HLA haplotypes located trans to

- DQB1\*02-DRB1\*03 in celiac patients of Southern Europe. *Tissue Antigens*. 2008, 71(3): 213-218.
52. HEYMAN, M., MENARD, S. Pathways of gliadin transport in Celiac Disease. *Annals of New York Academy of Sciences*. 2009, 1165: 274-278.
53. HILL, ID. What are the sensitivity and specificity of serologic celiac disease? Do sensitivity and specificity vary in populations?. *Gastroenterology*. 2005, 128(4): 25-32.
54. HOUCHINS, JP., YABE, T., MCSHERRY, C., BACH, FH. DNA Sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 1991, 173: 1017-1020.
55. IVARSSON, A., HERNELL, O., STENLUND, H., PERSSON, A. Breast-feeding protects against celiac disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2002, 75: 914-921.
56. IVARSSON, A., PERSSON, LA., NYSTRÖM, L., ASCHER, H., CAVELL, B., DANIELSSON, L., DANNAEUS, A., LINDBERG, T., LINDQUIST, B., STENHAMMAR, L., HERNELL, O. Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatrica*. 2000, 89: 165-171.
57. JONER, RB., ROBINS, GG., HOWDLE, PD. Advances in celiac disease. *Current Opinion in Gastroenterology*. 2006, 22(2): 117-123.
58. KAGNOFF, MF. Celiac disease: pathogenesis of a model immunogenetic disease. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007, 117(1): 41-49.
59. KAGNOFF, MF. Overview and pathogenesis of celiac disease. *Gastroenterology*. 2005, 128: 510-518.
60. KASARDA, DD. Can an Increase in Celiac Disease Be Attributed to an Increase in the Gluten Content of Wheat as a Consequence of Wheat Breeding?. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013, 61: 1155-1159
61. KRATZER, W., KIBELE, M., AKINLI, A., PORZNER, M., BOEHM, BO., KOENIG, W., OEZTUERK, S., MASON, RA., MAO, R., HAENLE, MH. Prevalence of celiac disease in Germany: A prospective follow-up study. *World Journal of Gastroenterology*. 2013, 19(17): 2612-2620.
62. KULOGLU, Z., KIRSAGLIOGLU, C., GIRGIN, N. Celiac Disease: Presentation of 109 Children. *Yonsei Med J*. 2009, 50(5):617-623
63. LLORENTE-ALONSO, MJ., FERNÁNDEZ-ACEÑERO, MJ., SEBASTIÁN, M. Gluten intolerance: Sex- and age-related features. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology*. 2006, 20(11): 719-722.
64. LÓPEZ-CASADO, MA. *Mecanismos de tolerancia inmune en la enfermedad celíaca. Relevancia clínica*. Tesis doctoral. Universidad de Granada, 2009.
65. LOSOWSKY, MS. A history of coeliac disease. *Digestive Diseases*. 2008, 26:112–120.

66. LOUKA, AS., SOLLID, LM. HLA in coeliac disease: Unravelling the complex genetics of a complex disorder. *Tissue Antigens*. 2003, 61:105–117.
67. LUDVIGSSON JF., FASANO, A. Timing of introduction of gluten and celiac disease risk. *Ann Nutr Metab*. 2012, 60:22-9.
68. MADARA, JL., STAFFORD. Interferon-gamma directly affects barrier function of cultured intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest*. 1989, 83(2):724-7.
69. MAHADEVA, S., WYATT, JS., HOWDE PD. Is a raised intraepithelial lymphocyte count with normal duodenal villous architecture clinically relevant?. *Journal of Clinical Pathology*. 2002, 55: 393-395.
70. MÄKI, M., COLLIN, P. Coeliac disease. *Lancet*. 1997, 349: 1755-1759.
71. MÄKI, M., HOLM, K., LIPANEN, V., HALLSTROM, O., VIANDER, M., COLLIN, P., SAVILAHTI, E., KOSKIMIES, S. Serological markers and HLA genes among healthy 1<sup>st</sup>-degree relatives of patients with celiac-disease. 1991, 338(8779): 1350-1353.
72. MÄKI, M., MUSTALAHTI, K., KOKKONEN, J., KULMALA, P., HAAPALAHTI, M., KARTTUNEN, T., ILONEN, J., LAURILA, K., DAHLBOM, I., HANSSON, T., HÖPFL, P., KNIP, M. *New England Journal of Medicine*. 2003, 348: 2517-2524.
73. MARSH, MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*. 1992, 102: 330-54.
74. MATYSIAK-BUDNIK, T., MOURA, IC., ARCOS-FAJARDO, M., LEBRETON, M., MENARD, S., CANDALTH, C. Secretory IgA mediates retrotranscytosis of intact gliadin peptides via the transferrin receptor in celiac disease. *J Exp Med*. 2008; 205(1):143-54.
75. MC GOWAN, K., CASTIGLIONE, DA., DECKER, J. The Changing Face of Childhood Celiac Disease in North America: Impact of Serological Testing. *Pediatrics*. 2009, 124(6):1572 - 1578.
76. MINISTERIO DE SANIDAD Y CONSUMO. Diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. 2008.
77. MOHAMED, BH., FEIGHERY, C., KELLY, J., COATES, C., O'SHEA, U., BARNER, L., ABUZAKOUK, M. Increased protein expression of matrix metalloproteinases -1, -3, and -9 and TIMP-1 in patients with gluten-sensitive enteropathy. *Digestive diseases and Sciences*. 2006, 51: 1862-1868.
78. MOLBERG, O., MCADAM, SN., KORNER, R., QUARSTEN, H., KRISTIANSEN, C., MADSEN, L., FUGGER, L., SCOTT, H., NOREN, O., ROEPSTORFF, P., LUNDIN, KEA., SJOSTROM, H., SOLLID, LM. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nature Medicine*. 1998, 4(6): 713-717.

79. MOLBERG, O., MCADAM, S., LUNDIN, KEA., KRISTIANSEN, C., ARENTZ-HANSEN, H., KETT,K., SOLLID, LM. T cells from celiac disease lesions recognize gliadin epitopes deamidated in situ by endogenous tissue transglutaminase. *European Journal of Immunology*. 2001, 31(5): 1317-1323.
80. NEUNAUSEN, SL., STEELE, L., RYAN, S., MOUSAVI, M., PINTO, M., OSANN, KE., FLODMAN, P., ZONE, JJ. Co- occurrence of celiac disease and other autoimmune diseases in celiac and their first-degree relatives. *Journal of autoimmunity*. 2008, 31(2): 160-165.
81. NIEDERHOFER, H., PITTSCHIELER, K. A preliminary investigation of ADHD symptoms in persons with celiac disease. *Journal of Attention Disorders*. 2006, 10(2): 200-204.
82. NORRIS, JM., BARRIGA, K., HOFFERNBERG, EJ., TAKI,I., MIAO, D., HAAS, JE., EMERY, LM., SOKOL, RJ., ERLICH, HA., EISENBARTH, GS., REWERS, LM. Risk of celiac disease autoimmunity and timing of gluten introduction in the diet of infants at increased risk of disease. *The Journal of the American Medical Association*. 2005, 293(19): 2343-2351.
83. OBERHUBER, G., BODINGBAUER, M., MOSBERGER, I., STOTTLE, M., VOGELSONG, H. High proportion of granzyme B-positive (activated) intraepithelial and lamina propia lymphocytes in lymphocytic gastritis. *American Jorunal Surgicak Pathology*. 1998, 22: 450-8.
84. OLSSON, C., HERNELL, O., HÖRNELL, A., LÖNNBERG, G., IVARSSON, A. Difference in celiac risk between Swedish birth cohorts suggests an opportunity for primary prevention. *Pediatrics*. 2008, 122(3): 528-534.
85. PAULLEY, JW. Observations on the aetiology of Idiopathic Steatorrhea; jejunal and lymph-node biopsies. *British Medical Journal*. 1954, 2(4900):1318-1321
86. PAVELEY, WF. From Aretaeus to Crosby: a history of celiac disease. *British Medical Journal*. 1988, 297:1646-1649.
87. PINKAS, DM., STROP, P., BRUNGER, AT., KHOSLA, C. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. *PLOS Biology*. 2007, 5(12): 2788:2796.
88. ROY-ARIÑO, G. Inmunofenotipaje por citometría de flujo: el linfograma intraepitelial. En Arranz E y Garrote JA, editores. *Enfermedad celíaca. Introducción al conocimiento actual de la enfermedad celíaca*. Madrid, España: Ergon; 2011. P. 119-128.
89. RUÍZ-DÍAZ, A., POLANCO, I. Exposición al gluten y aparición de enfermedades autoinmunes en la enfermedad celíaca. *Pediatrিকা*. 2002, 22(9): 311-319.
90. PLOSKI, R., EK, J., THORSBY, E., SOLLID, LM. On the HLA-DQ( $\alpha$ 1\*0501,  $\beta$ 1\*0201)-associated susceptibility in celiac disease: A possible gene dosage effect of *DQB1\*0201*. *Tissue antigens*. 1993, 41(4): 173-177.

91. POLANCO, I. Enfermedad celíaca en la infancia. En Rodrigo L y Peña AS, editores. *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. Barcelona, España: OmniaScience; 2013. p. 219-232.
92. POLANCO, I. Clinical relevance of villous atrophy. *Pediatric allergy and immunology*. 2001, 12: 47-50.
93. POLANCO, I., RIBES, C. Enfermedad celíaca. *Protocolos diagnóstico-terapéuticos de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica SEGHNP-AEP*. 2010, 1: 37-46.
94. RAVIKUMARA, M., TUTHILL, DP., JENKINS, HR. The changing clinical presentation of celiac disease. *Arch Dis Child*. 2006, 91(12):969-971
95. REILLY, NR., GREEN, PH. Epidemiology and clinical presentations of celiac disease. *Seminars in immunopathology*. 2012, 34: 473-478.
96. Riestra, S. Epidemiología de la enfermedad celíaca. En Arranz E y Garrote JA, editores. *Enfermedad celíaca. Introducción al conocimiento actual de la enfermedad celíaca*. Madrid, España: Ergon; 2011. P. 25-32.
97. Riestra, S., FERNÁNDEZ, E., RODRIGO, L., GARCÍA, S., OCIO, G. Prevalence of Coeliac disease in the general population of northern Spain. Strategies of serologic screening. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2000, 35(4): 398-402.
98. RODRIGO, L., BLANCO, I., BOBES, J., DE SERRES, FJ. Clinical impact of a gluten-free diet on health-related quality of life in seven fibromyalgia syndrome patients with associated celiac disease. *BMC Gastroenterology*. 2013, 13: 157-157.
99. RODRIGO, L. Celiac disease. *World J Gastroenterol*. 2006, 12(41):6585-6593.
100. RODRIGO, L. La enfermedad celíaca en el adulto. *Libro blanco de la enfermedad celíaca*. Madrid, España: ICM; 2008. p.29-40.
101. ROS ARNAL, I. *Influencia de los genotipos del HLA en la forma fenotípica de presentación de la enfermedad celíaca*. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza, 2012.
102. ROSS, MH., WOJCIECH, P. *Histología: Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana; 2012.
103. ROSTOM, A., DUBÉ, C., CRANNEY, A., SALOOJEE, SYR., GARRITTY, C., SAMPSON, M., ZHANG, L., YAZDI, F., MAMALADZE, V., PAN, I., MACNEIL, J., MACK, D., PATEL, D., MOTHER, D. The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology*. 2005, 128(4): 31-46.
104. RODRÍGUEZ-SÁEZ, L. Enfermedad celíaca. *Información terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 2010, 34: 49-59.
105. SAVILATHI, E., KOLHO, KL., WESTERHOLM-ORMIO, M., VERKASALO, M. Clinics of coeliac disease in children in the 2000s. *Acta Paediatrica*. 2010, 99(7): 1026-1030.

106. SHAN, L., MOLBERG, Ø., PARROT, I., HAUSCH, F., FILIZ, F., GRAY, GM., SOLLID, LM., KHOSLA, C. Structural basis for gluten intolerance in Celiac Sprue. *Science*. 2002, 297: 2275-2279.
107. SCHUPPAN, D., JUNKER, Y., BARISANI, D. Celiac Disease: from pathogenesis to novel therapies. *Gastroenterology*. 2009, 137(6): 1912-1933.
108. SHEWRY, PR., BEAUDOIN, F., JENKINS, J., GRIFFITHS-JONES, S., MILLS, EN. Plant protein families and their relationships to food allergy. *Biochem Soc Trans*. 2002, 30(6):906-10.
109. SOLLID, LM. Breast milk against celiac disease. *Gut*. 2002, 51: 767:768.
110. STENE, LA., HONEYMAN, MA., HOFFENBERG, EJ., HAAS, JE., SOKOL, RJ., EMERY, L., TAKI, I., NORRIS, JM., EIRLICH, HA., EISENBARTH, GS., REWERS, M. Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: A longitudinal study. *The American Journal of Gastroenterology*. 2006, 101: 2333-2340.
111. TELEGA, G., BENNET, TR. WERLIN, S. Emerging new clinical patterns in the presentation of celiac disease. *Arch Pediatr Aloces Med*. 2008;162(2):164-8
112. TOMMASINI, A., NOT, A., VENTURA, A. Ages of celiac disease: From changing environment to improved diagnostics. *World Journal of Gastroenterology*. 2011, 17(32): 3665-3671.
113. TRONCONE, R., JABRI, B. Coeliac disease and gluten sensitivity. *Journal of Internal Medicine*. 2011, 269: 582-590.
114. VADER, W., STEPNIAK, D., KOOY, Y., MEARIN, L., THOMPSON, A., VAN ROOD, JJ. The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003, 100(21): 12390-12395.
115. VAN BERGE-HENEGOUWEN, GP., MULDER, CJ. Pioneer in the gluten free diet: Willem-Karel Dicke 1905-1962, over 50 years of gluten free diet. *Gut*. 1993, 34(11):1473-5.
116. VAN HEEL, DA., FRANKE, L., HUNT, KA., GWILLIAM, R., ZHERNAKOVA, A., INOUYE, M., WAPENAAR, MC., BARNARDO, MCN., BETHEL, G., HOLMES, GKT., et al. A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring *IL2* and *IL21*. *Nature Genetics*. 2007, 39: 827-829
117. VAN DE WAL, Y., KOOY, YMC., VAN VEELLEN, P., VADER, W., AUGUST, SA., DRIJFHOUT, JW., PEÑA, SA., KONING, F. Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *European Journal of Immunology*. 1999, 29: 3133-3139.
118. VALLEJO-DÍEZ, S. Degradación específica del gluten por la mucosa intestinal de los pacientes celíacos: posible papel en la patogenia y en el diagnóstico de la enfermedad. Tesis doctoral. Universidad de Valladolid. 2013.

119. VENTURA, A., MAGAZZU, G., GRECO, L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology*, 1999, 117(2): 297-303.
120. WEST, J., FLEMING, KM., TATA, LT., CARGD, TR., CROOKS, CJ. Incidence and Prevalence of Celiac Disease and Dermatitis Herpetiformis in the UK Over Two Decades: Population-Based Study. *Am J Gastroenterol*. 2014, 109: 757-768.
121. WIESER, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol*. 2007, 24(2):115-9.
122. ZELNIK, N., PACTH, A., OBEID, R., LERNER, A. Range of neurologic disorders in patients with celiac disease. *Pediatrics*. 2004, 113(6): 1672-1676.