

PONENCIAS INVITADAS (SESIONES Y MESAS)

IX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedad Celíaca (SEEC)

Bilbao, 19-21 de noviembre de 2024

Conferencia inaugural

TRIGO NO INMUNOGÉNICO

S. Sánchez-León^{1,2}, M. Marín-Sanz¹, M. Gavilán-Camacho¹, M. H. Guzmán-López¹ y F. Barro¹

¹Departamento de Mejora Genética, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Córdoba. ²Departamento de Genética, Universidad de Córdoba.

Durante las últimas décadas, los genes que codifican para las proteínas del gluten se han convertido en un objetivo clave para la ingeniería genética en el desarrollo de trigo apto para la enfermedad celíaca (EC) y otras patologías relacionadas con el consumo de trigo, que afectan entre el 6 y el 12% de la población en países occidentales. En la EC, la respuesta inmune se desencadena por la degradación parcial de las proteínas del gluten, lo que genera péptidos reconocidos por las células presentadoras de抗ígenos y provoca una respuesta inmune de las células T CD4+ (Sollid *et al.*, 2020). Aunque hay muchos epítopos de las proteínas del gluten que son reconocidos por las células T, todos comparten un núcleo central de 9 aminoácidos que interactúan con las moléculas HLA-DQ (Jabri *et al.*, 2014). Las proteínas del gluten comprenden dos familias: las gliadinas (monoméricas) y las gluteninas (poliméricas). Las gliadinas se dividen en tres grupos estructurales según su movilidad en geles de electroforesis: ω -, α/β -, y γ -gliadinas. Las α -gliadinas, en particular, contienen una región rica en epítopos responsables del 90% de la respuesta inmune en la EC (Tye-Din *et al.*, 2010). Esta región, llamada 33-mer, está compuesta por seis copias de tres epítopos DQ2.5 superpuestos, los cuales son clave en la patogénesis de la EC.

Las α -gliadinas, codificadas por una familia de genes con múltiples copias, son las más inmunogénicas, especialmente las del genoma D, que contienen el 33-mer completo (Marín-Sanz *et al.*, 2023). Aunque no todos los genes contienen los seis epítopos del 33-mer, muchos albergan variantes altamente inmunogénicas con entre uno y cinco epítopos (Marín-Sanz *et al.*, 2023). Estas proteínas representan un objetivo atractivo para reducir la inmunogenicidad del trigo, y se han llevado a cabo diferentes enfoques biotecnológicos y de mejora genética. Entre estos, el silenciamiento génico mediante interferencia de ARN (ARNi) ha sido exitoso para

reducir el contenido de gliadinas hasta en un 98% (Gil-Humánes *et al.*, 2010), y se ha demostrado que no provocan respuesta inmune en pacientes celíacos tras consumir pan hecho con harina de estas líneas (Guzmán-López *et al.*, 2021). También se ha utilizado CRISPR/Cas para introducir mutaciones en los genes de α -gliadinas, logrando mutaciones en 35 de los 45 genes y evitando la acumulación de estas proteínas en el grano (Sánchez-León *et al.*, 2018).

Si bien eliminar los genes de α -gliadinas reduce la inmunogenicidad, sería ideal eliminar específicamente las regiones inmunogénicas y reemplazarlas por secuencias no inmunogénicas, conservando la calidad del trigo. En los sistemas CRISPR/Cas, una nucleasa Cas guiada por ARN induce una ruptura de doble cadena, que puede repararse mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) o reparación dirigida por homología (HDR). El uso de sgRNAs emparejados permite escindir fragmentos específicos de ADN y reemplazarlos con plantillas sintéticas, como oligodesoxinucleótidos de doble cadena (dsODNs) (Tsai *et al.*, 2015). En nuestro grupo hemos empleado sgRNAs emparejados para flanquear y eliminar el 33-mer, reemplazándolo con secuencias no inmunogénicas mediante dsODNs y Prime Editing.

Probamos los sistemas Cas9 y Cas12a para la escisión y reemplazo de estas regiones inmunogénicas. Mientras que Cas9 muestra mayor eficiencia en la edición, Cas12a también demostró ser prometedor para futuras aplicaciones.

Agradecimientos: Financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 (PID2022-1421390B-I00 y TED2021-129733B-I00); Unión Europea (“Next Generation EU”/PRTR); Junta de Andalucía (QUAL21_023 IAS); y ‘Conexión TRIGO’ del CSIC.

BIBLIOGRAFÍA

- Gil-Humánes, J., Pistón, F., Tollefson, S., Sollid, L.M., and Barro, F. (2010) Effective shutdown in the expression of celiac disease-related wheat gliadin T-cell epitopes by RNA interference. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 107, 17023-17028.
 Guzmán-López, M.H., Sánchez-León, S., Marín-Sanz, M., Comino, I., Segura, V., Vaquero, L., et al. (2021) Oral Consumption of Bread from an RNAi Wheat Line with Strongly Silenced Gliadins Elicits No Immunogenic Response in a Pilot Study with Celiac Disease Patients. Nutrients, 13, 4548.
 Jabri, B., Chen, X., and Sollid, L.M. (2014) How T cells taste gluten in celiac disease. Nat. Struct. Mol. Biol., 21, 429-431.
 Marín-Sanz, M., Barro, F., and Sánchez-León, S. (2023) Unraveling the celiac disease-related immunogenic complexes in a set of wheat and tritordeum

- genotypes: implications for low-gluten precision breeding in cereal crops. *Front. Plant Sci.*, 14, 1171882.
- Sánchez-León, S., Gil-Humanez, J., Ozuna, C. V., Giménez, M.J., Sousa, C., Voytas, D.F., and Barro, F. (2018) Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.*, 16, 902-910.
- Sollid, L.M., Tye-Din, J.A., Qiao, S.W., Anderson, R.P., Gianfrani, C., and Koning, F. (2020) Update 2020: nomenclature and listing of celiac disease-relevant gluten epitopes recognized by CD4+ T cells. *Immunogenetics*, 72, 85-88.
- Tsai, S.Q., Zheng, Z., Nguyen, N.T., Liebers, M., Topkar, V. V., Thapar, V., et al. (2015) GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat. Biotechnol.*, 33, 187-197.
- Tye-Din, J.A., Stewart, J.A., Dromey, J.A., Beissbarth, T., Van Heel, D.A., Tatham, A., et al. (2010) Comprehensive, quantitative mapping of T cell epitopes in gluten in celiac disease. *Sci. Transl. Med.*, 2, 41ra51-41ra51.

Genética e inmunología

GENÉTICA Y NUTRACÉUTICOS: COMPUESTOS NATURALES COMO ANTIINFLAMATORIOS EN LA ENFERMEDAD CELÍACA

A. Olazagoitia-Garmendia^{1,2}, H. Rojas-Márquez^{1,2}, M.M. Romero³, P. Ruiz⁴, A. Aguirre-Lizaso⁵, M.J. Perugorria³, L. Herrero³, D. Serra³, L. Bujanda⁵ y A. Castellanos-Rubio^{1,2,6,7}

¹Departamento de Genética, Antropología y Fisiología Animal, UPV-EHU. ² Instituto de Investigación Biobizkaia. ³Instituto de Biomedicina, Universidad de Barcelona. ⁴Departamento de Biología Celular, UPV-EHU. ⁵Instituto de Investigación Biogizpuzkoa. ⁶6CIBERDEM. ⁷Ikerbasque, Basque Foundation for Science.

La enfermedad celíaca (EC) es un trastorno crónico, inflamatorio y autoinmune que afecta principalmente al intestino delgado y se desarrolla en personas genéticamente predispuestas tras el consumo de gluten. Actualmente, el único tratamiento eficaz es el cumplimiento de una dieta estricta libre de gluten (DSG) de por vida. Sin embargo, las dificultades para mantener esta dieta pueden generar complicaciones, lo que subraya la necesidad de terapias adicionales. En un estudio reciente de nuestro grupo de investigación, definimos una nueva vía inflamatoria, la vía m6A-XPO1-NFKB, que se activa en pacientes con EC. Observamos que la proteína YTHDF1, que actúa como lectora de modificaciones m6A del ARN, se une selectivamente a la región 5' UTR del ARN mensajero de XPO1, lo que incrementa su traducción y promueve la inflamación en las células intestinales tanto *in vitro* como *in vivo*. Este hallazgo abre la puerta a nuevas opciones terapéuticas dirigidas a las proteínas de la maquinaria m6A, que ya se usan en el tratamiento de otros trastornos. Estudios recientes han identificado el ácido salvianólico (SAC) como un inhibidor selectivo de YTHDF1, con efectos beneficiosos en el tratamiento de defectos asociados con el síndrome del cromosoma X frágil. Nuestro grupo de investigación ha analizado la capacidad de reducir la inflamación intestinal inducida por gluten de dos formas de SAC (Y20 y Y22). Para esto hemos utilizado modelos *in vitro* e *in vivo* de exposición al gluten. Los resultados mostraron que, *in vitro*, las células tratadas con inhibidores de YTHDF1 presentaron una reducción en la inflamación inducida por el gluten. Esto se reflejó en menores niveles de XPO1, NF-kB y IL-8 tanto a nivel de ARN como de proteína. En los estudios *in vivo*, los ratones tratados con gluten y SAC mostraron menores niveles de XPO1, NF-kB y citoquinas homólogas a la IL-8 (Mip2a, Cxcl5 y Cxcl1) en comparación con los ratones expuestos solo a gluten, que presentaban niveles más altos de inflamación intestinal. Además, los ratones tratados con SAC mostraron una ligera recuperación en la relación entre la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas intestinales, lo que sugiere que estos inhibidores podrían ayudar a proteger contra el daño inflamatorio en el intestino. Además, se observó una disminución en la expresión de citoquinas relacionadas con la respuesta Th1 (como IFN- α e IL-21) y

una reducción en la infiltración de linfocitos intraepiteliales en los ratones tratados con SAC, lo que indica una menor infiltración de células inmunitarias característica de la enfermedad celíaca. En cuanto a la toxicidad y los efectos secundarios, no se detectaron efectos adversos en los modelos animales tratados con SAC. No hubo diferencias significativas en el tamaño y peso de los ratones tratados ni en su consumo de dieta o peso de las heces. Además, en los ratones tratados se observaron niveles normales de células calciformes y eosinófilos, que son marcadores de inflamación intestinal. Finalmente, analizamos la capacidad inflamatoria de estos inhibidores utilizando un modelo *ex vivo* de biopsias intestinales de pacientes. Las biopsias intestinales de pacientes recién diagnosticados con EC mostraron una disminución en los niveles de XPO1, NF-kB e IL-8 cuando se incubaron con los inhibidores, lo que respalda la efectividad de estos compuestos en humanos. En conclusión, este estudio sugiere que los inhibidores selectivos de YTHDF1 basados en ácido salvianólico, específicamente Y20 y Y22, pueden reducir la inflamación intestinal inducida por el gluten sin causar efectos adversos. Estos inhibidores podrían no solo ser útiles para el tratamiento de la enfermedad celíaca, sino también en otros trastornos inflamatorios intestinales. Asimismo, investigaciones preliminares con otros compuestos naturales de estructura química parecida al ácido salvianólico sugieren que hay otras sustancias con propiedades similares que podrían combinarse para reducir la inflamación mediada por el gluten en células intestinales e inmunitarias. Aunque se requieren más investigaciones sobre otras vías de la enfermedad celíaca, estos resultados abren nuevas posibilidades para desarrollar estrategias terapéuticas innovadoras en el tratamiento de esta patología.

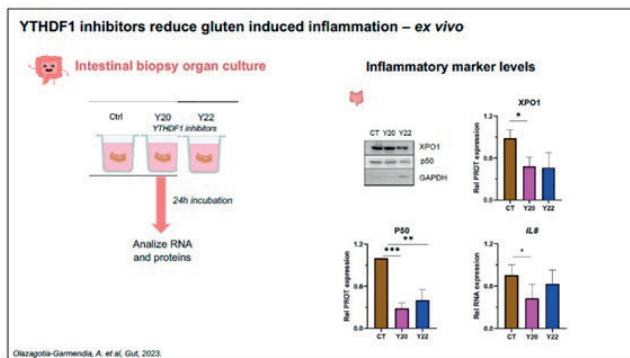


Fig. La inhibición de YTHDF1 reduce la inflamación mediada por el gluten en un modelo *ex vivo*. Representación esquemática de los experimentos *ex vivo* (izquierda) y resultados de los marcadores inflamatorios tras la incubación de biopsias intestinales de individuos celíacos con inhibidores específicos de YTHDF1 (Y20, Y22). Los resultados representan la media y error estándar de la incubación de 5 biopsias.

BIBLIOGRAFÍA

- Olazagoitia-Garmendia A, et al. Gluten-induced RNA methylation changes regulate intestinal inflammation via allele-specific XPO1 translation in epithelial cells. *Gut*. 2022;71:68-77.
- Deng LJ, et al. m6A modification: recent advances, anticancer targeted drug discovery and beyond. *Molecular Cancer* 2022;21:32.
- Zou Z, et al. FMRP phosphorylation modulates neuronal translation through YTHDF1. *Mol Cell*. 2023;83:4304-17.
- Gurtner A, Gonzalez-Perez I, Arnold IC. Intestinal eosinophils, homeostasis and response to bacterial intrusion. *Semin. Immunopathol.* 2021;43:295.

THE IMPACT OF CELIAC DISEASE ON THE EPITHELIAL BARRIER: FROM SINGLE CELL STUDIES TO MODEL SYSTEMS

I. Jonkers

Department of Genetics, University Medical Center Groningen, University of Groningen.

Celiac disease (CeD) is a complex genetic disease, in which genetics and environmental factors interact to cause CeD onset. Genome wide association studies have identified over 40 genetic loci that contribute to CeD risk. However, the role of these loci in disease onset is difficult to decipher, as the genetic variants associated to CeD are primarily located in the non-coding genome, potentially affecting gene expression in a cell type and context specific way¹. Therefore, we aim to investigate CeD specific gene expression and the role of genetics in patient-specific tissues and models.

Although many genes associated with CeD onset appear to play a role in immune cells², we propose that genes in epithelial cells may also contribute to disease onset. Using publicly available single cell RNAseq³ data we identified genes located in CeD-associated loci expressed in epithelial cells. Moreover, we isolated the epithelial lining of small intestinal biopsies of healthy controls, untreated or treated CeD patients to perform RNAseq⁴. We identified many gene expression changes between untreated and treated CeD patients and controls, affecting pathways related to inflammation, cell cycle control, extracellular matrix and nutrient transport and absorptive functions. Moreover, we identified distinct transcriptional heterogeneity in both treated and untreated CeD patients, implying that CeD associated inflammation or recovery are not uniform. Genetics could contribute to this heterogeneity, as we identified 35 expression quantitative trait loci (eQTL), several of which cell type specifically in either immune or epithelial cells⁴.

Single cell RNAseq of small intestinal biopsies of CeD patients and controls further confirmed extensive transcriptional dysregulation, impacting both immune and epithelial cell populations. Here too, pathways associated with nutrient absorption and nutrient uptake were downregulated in epithelial cells, showing that nutrient deficiency in CeD patients is not only caused by fewer epithelial cells due to villous atrophy, but also by downregulation of absorptive and metabolic pathways in enterocytes. Moreover, we identified re-routing of differentiation along the crypt-villus axis towards absorptive cell lineages in CeD patients, possibly to compensate for the overall loss of enterocytes in CeD patients. Lastly, the cell-cell interactions in the small intestinal environment appear altered, with an increase in cytotoxic receptor-ligand interactions between intra-epithelial lymphocytes (IELs) and epithelial cells.

To model these altered gene expression profiles and cell-cell interactions, we have generated physiologically relevant human models. Firstly, to model the small intestinal lining we have created a human induced pluripotent stem cell derived gut-on-chip model, which encompasses all major epithelial cell types, as well as mesenchymal cell populations⁵. In this model, we can mimic the crypt-villus axis growth factor gradient, increasing cellular diversity and maturity. Secondly, we have established an autologous epithelial and IEL co-culture system derived from small intestinal biopsies from CeD patients or controls. Thus far, we have co-cultured CD8+ $\alpha\beta$ intra-epithelial T cells of controls with epithelial organoids from the same individuals, to test the effects of cytokines on the cytotoxic capacity of these cells towards epithelial cells. Intriguingly, a CeD-specific pro-inflammatory cocktail of IL-21, IL-15, IL-2, IL-7 and IFN γ is insufficient to trigger IEL-mediated cell death of epithelial organoids. Thus, we propose that patient-specific receptor-ligand interactions are present in the CeD small intestinal environment to instigate villous atrophies that are missing in controls.

BIBLIOGRAPHY

1. Jonkers IH, Wijmenga C. Context-specific effects of genetic variants associated with autoimmune disease. *Hum Mol Genet*. 2017;26.
2. van der Graaf A, et al. Systematic Prioritization of Candidate Genes in Disease Loci Identifies TRAFD1 as a Master Regulator of IFN γ Signaling in Celiac Disease. *Front Genet*. 2021;11.
3. Elmentait R, et al. Cells of the human intestinal tract mapped across space and time. *Nature*. 2021;597:250.
4. Ramírez-Sánchez AD, et al. Gene expression and eQTL analysis reflect the heterogeneity in the inflammatory status of the duodenal epithelial lining in celiac disease. *bioRxiv*. 2024;doi:10.1101/2024.02.29.582756.
5. Moerkens R, et al. An iPSC-derived small intestine-on-chip with self-organizing epithelial, mesenchymal, and neural cells. *Cell Rep*. 2024;43.

LA INFECCIÓN COMO DESENCADEANTE DE LA ENFERMEDAD CELÍACA ACTIVA

Á. Sanchiz¹, M.I. San Martín¹, S. García¹, F. Fernández-Bañares², H. Martínez-Blanco¹, L. Vaquero³, M.Á. Ferrero¹, C. Núñez⁴, L. Rodríguez-Aparicio¹, S. Vivas³, M. Esteve² y N. Navasa¹

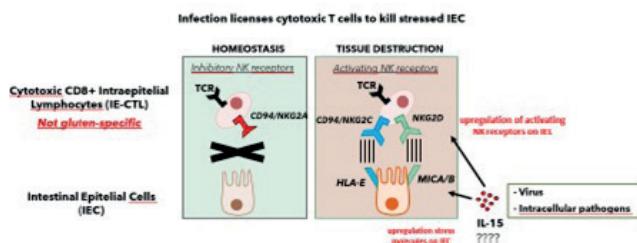
¹Área de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología Molecular de la Universidad de León, León. ²Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitari Mútua de Terrassa, Terrassa. ³Aparato Digestivo, Complejo Asistencial Universitario de León, León. ⁴Laboratorio de Investigación en Genética de Enfermedades Complexas, Hospital Clínico San Carlos, IdISSC, Madrid.

Los pacientes con enfermedad celíaca (EC) desarrollan respuestas inflamatorias mediadas por células T CD4+ y por anticuerpos frente a gluten, así como otros anti-TG2. En la EC activa, además de las características histológicas como linfocitosis intraepitelial e inflamación de la lámina propia (LP), se observa atrofia vellositaria (AV), y, por tanto, destrucción de tejido intestinal, lo que la diferencia de la EC potencial. El daño tisular parece estar íntimamente relacionado con la sobreexpresión en epitelio y LP de IL-15, patrón que difiere entre pacientes con EC activa o potencial¹. Durante la destrucción tisular, IL-15 habilita a las células T CD8+ citotóxicas (CTL) mediante el aumento de la expresión de receptores activadores NKG2D, para que ataquen a las células epiteliales intestinales (IEC) estresadas. Por otra parte, esta citoquina, protege a los tejidos frente a la infección de patógenos intracelulares graves, facilitando la destrucción de las células afectadas². Cabe pensar que una infección persistente con un patógeno intracelular podría inducir la expresión de IL-15 de forma constitutiva en el epitelio intestinal, tal y como ocurre en la EC activa. Con esta premisa, nos propusimos caracterizar el microbioma asociado a la AV a partir de biopsias de más de 100 pacientes con EC potencial y activa, mediante análisis genómico 16S, en busca de posibles agentes infecciosos. Identificamos, por primera vez, la presencia significativa de dos patógenos intracelulares en los pacientes con AV, que están asociadas a procesos inflamatorios en el intestino delgado de humanos. También identificamos bacterias extracelulares, agresivas, de la familia *Neisseriaceae*, ya asociados en otros estudios con la EC activa. Mediante RNAseq, hemos observado una relación importante en pacientes con EC activa entre la expresión de determinados genes asociados a vías de señalización inmunitarias y los microorganismos.

Con el propósito de determinar si la infección con patógenos intracelulares (IP) desencadena AV, hemos empleado un modelo murino NOD/DQ8 que representa la EC potencial, ya que presenta enteropatía moderada inducida por gluten, pero en ausencia total de AV. En primer lugar, se rompe la tolerancia oral al gluten en los ratones y después se causa inflamación moderada mediante la administración de gluten. A continuación, infectamos los ratones con los candidatos microbianos. Nuestros resultados muestran que la infección con IP1 actúa en sinergia con las respuestas inflamatorias del gluten para causar atrofia vellositaria en el intestino delgado de los ratones, observado por tinción H&E de cortes histológicos e inmunohistoquímica. La infección con *Haemophilus* no provoca ningún daño al epitelio intestinal.

Se han aislado IEC y linfocitos intraepiteliales (IEL) y hemos empleado técnicas de citometría de flujo multiespectral, RT-qPCR y RNAseq para tratar de demostrar que existe una interacción sinérgica entre las respuestas inflamatorias derivadas del gluten y

de la infección, que estresan las células epiteliales del intestino, amplifican la capacidad citotóxica de las CTL (CD8+) y desencadenan, en última instancia, la AV. Nuestros resultados arrojan que la infección con IP1 regula positivamente ligandos de NKG2-activadores de estrés celular en la superficie de los IEC (Qa-1, Rae1 ϵ) e incrementa la expresión génica de los mismos (Mult-1, H60b). Además, hemos podido observar que la infección con IP1 promueve el reclutamiento de IEL citotóxicos durante la enteropatía inducida por gluten, se incrementa el número de CD4-CD8 α +TCR β +NKG2D+ así como el porcentaje de IEL CD45+ TCR $\gamma\delta$ +. La infección, además, estimula la liberación de granzima B intracelular, y promueve la expresión de moléculas citolíticas en el epitelio intestinal. Estas respuestas no se han observado en el control de *Haemophilus*. Aunque aún preliminar, nuestros resultados anticipan que los genes *up-regulados* en los ratones infectados son similares al patrón observado en las biopsias de pacientes con EC activa (genes de respuesta inflamatoria inmunes, estrés celular y activación de linfocitos).



BIBLIOGRAFÍA

1. Abadie V, Jabri B. IL-15: A Central Regulator of Celiac Disease Immunopathology. *Immunol Rev.* 2014;260:221-34.
2. Jabri B, Abadie V. IL-15 Functions as a Danger Signal to Regulate Tissue-Resident T Cells and Tissue Destruction. *Nat Rev Immunol.* 2015;15:771-83.

Alimentos sin gluten

TECNOLOGÍA CRISPR/CAS PARA INCREMENTAR LAS PROPIEDADES NUTRICIONALES Y FUNCIONALES DE ALIMENTOS SIN GLUTEN

M.H. Guzmán-López, S. Sánchez-León, M. Marín-Sanz y F. Barro

Laboratorio de Genómica Funcional, Instituto de Agricultura Sostenible (IAS-CSIC), Córdoba.

Actualmente, adoptar una dieta sin gluten (DSG) de por vida es el único tratamiento disponible para los pacientes celíacos. Sin embargo, adoptar una DSG tiene ciertas desventajas: los productos sin gluten tienen peores propiedades organolépticas, suelen ser menos saludables y más caros que sus análogos con gluten, entre otras (Stevens & Rashid, 2008; Šmidová and Rysová, 2022). Con el fin de mejorar la calidad de vida de estos pacientes, nuestro grupo ha desarrollado líneas de trigo con un menor contenido en gliadinas, la fracción más inmunogénica del gluten, empleando tanto tecnología ARNi como CRISPR/Cas (Barro *et al.*, 2016, Sánchez-León *et al.*, 2018). A pesar de que algunas de las líneas desarrolladas muestran una reducción de hasta el 90% del contenido en gluten, todas presentan más de 20 ppm de gluten por lo que no pueden ser etiquetadas como "sin gluten" bajo la normativa actual (Guzmán-López *et al.*, 2021). Por esta razón, otra alternativa sería mejorar la funcionalidad y calidad de las proteínas de otros cereales como el arroz.

En comparación con el trigo, el arroz es un cereal sin gluten. Sin embargo, esta ausencia de gluten conlleva una calidad harinosa deficiente. Las fracciones proteicas del arroz son similares a las del trigo e incluyen albúminas, globulinas, prolaminas y glutelinas. Sin embargo, su composición proteica es distinta. Por lo tanto, nuestro objetivo fue mejorar la calidad de las semillas de arroz mediante la alteración de la composición de sus proteínas de reserva empleando tecnología CRISPR-Cas9. Para ello, se diseñaron guías de ARN específicos para ambas fracciones proteicas, y se produjeron dos generaciones de líneas editadas. Una vez generadas, estas líneas fueron analizadas para confirmar las ediciones en los genes de proteínas de reserva objetivo mediante secuenciación. Estos análisis de inserciones y delecciones (InDels) confirmaron la edición genética en la mayor parte de estas líneas. Posteriormente, se realizaron análisis proteicos para confirmar que las ediciones en los genes objetivo habían provocado cambios en el perfil proteico de estas líneas. Así, los análisis por SDS-PAGE, Bradford y RP-HPLC permitieron confirmar y cuantificar las alteraciones en su composición proteica. Las líneas editadas mostraron perfiles proteicos diferentes según los ARN guías utilizados, con cambios significativos en las fracciones de proteínas de reserva, incluyendo aumentos en albúminas y globulinas, y variaciones en prolaminas y glutelinas.

En conclusión, la edición de las proteínas de reserva en el arroz podría mejorar su calidad, aumentando su contenido en proteínas con características nutricionales interesantes y haciéndolo una alternativa más adecuada para la producción de alimentos sin gluten.

BIBLIOGRAFÍA

- Barro, F., Iehisa, J. C. M., Giménez, M. J., García-Molina, M. D., Ozuna, C. V., Comino, I., et al. (2016). Targeting of prolamins by RNAi in bread wheat: effectiveness of seven silencing fragment combinations for obtaining lines devoid of coeliac disease epitopes from highly immunogenic gliadins. *Plant Biotechnol. J.* 14, 986-996.
- Guzmán-López, M. H., Sánchez-León, S., Marín-Sanz, M., Comino, I., Segura, V., Vaquero, L., et al. (2021). Oral Consumption of Bread from an RNAi Wheat Line with Strongly Silenced Gliadins Elicits No Immunogenic Response in a Pilot Study with Celiac Disease Patients.
- Sánchez-León, S., Gil-Humanez, J., Ozuna, C. V., Giménez, M. J., Sousa, C., Voytas, D. F., et al. (2018). Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol. J.* 16, 902-910.
- Šmidová, Z., and Rysová, J. (2022). Gluten-Free Bread and Bakery Products Technology. *Foods* 11. doi: 10.3390/foods11030480.
- Stevens, L., and Rashid, M. (2008). Gluten-Free and Regular Foods: A Cost Comparison. *Can. J. Diet. Pract. Res.* 69, 147-150.

DISEÑO Y DIFERENCIACIÓN DE PAN SIN GLUTEN SOSTENIBLE Y NUTRICIONALMENTE MEJORADO

L. Cantero-Ruiz de Eguino¹, V. Navarro^{1,2}, I. Churruca^{1,2}, M. Vázquez-Polo¹, J. Esparta¹, G. Pérez-Junquera¹ y O. Martínez^{1,2}

¹Gluten 3S, Dpto Farmacia y Ciencias de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. ²Instituto de Investigación Sanitaria Bioaraba, Nutrición y Seguridad Alimentaria, Vitoria-Gasteiz.

A pesar de que ha habido un gran avance en la calidad de los productos sin gluten, aún quedan muchos aspectos por mejorar relativos tanto a sus características sensoriales como a su calidad nutricional. Uno de los productos de referencia, por ser básico en la dieta, es el pan sin gluten (PSG). Los PSG comerciales aportan menos proteína y más grasa que sus homólogos con gluten¹. Además, suelen presentar un índice glucémico más alto por el empleo de harina de arroz y almidones. Se ha descrito también falta de concordancia entre la información nutricional trasladada en la etiqueta sobre algunos nutrientes tales como la fibra y las cantidades determinadas mediante análisis. Los panes con gluten presentan,

por lo general, mayor contenido en polifenoles y mejor valoración en aroma y sabor². Varios trabajos apuntan a la textura del PSG como uno de los atributos sensoriales peor valorados. La percepción de los productos sin gluten por parte de las personas obligadas a eliminar el gluten de la dieta es en general negativa, resaltando los déficits sensoriales junto con los altos precios. Por el contrario, la población general, que puede consumir gluten, percibe los alimentos sin gluten como más saludables³. Aún son escasos los estudios que recogen la percepción sensorial afectiva en relación a estos productos de personas celíacas o con restricciones dietéticas de gluten. Es más: únicamente un tercio de los trabajos en relación al PSG incluyen análisis sensorial y en muchas ocasiones se aborda sin describir claramente algunos aspectos metodológicos o utilizando paneles entrenados para estudiar la aceptabilidad del producto propuesto³.

Recientemente han surgido nuevas inquietudes en torno a los productos sin gluten, y particularmente en relación al PSG; principalmente, aspectos relacionados con la sostenibilidad y la funcionalidad. Frente a las complejas formulaciones de los PSG que incluyen aditivos e ingredientes específicos, van surgiendo las alternativas "Clean Label"⁴ a base de subproductos vegetales⁵ o alternativas en las que se estudia la digestibilidad y las propiedades antioxidantes y/o antiinflamatorias del alimento⁶. Además de aspectos nutricionales y/o sensoriales, la accesibilidad y el precio juegan un papel clave en la conformación de la dieta sin gluten⁷. Ambos son aspectos relevantes desde el punto de vista de la sostenibilidad, junto con el impacto medioambiental de los ingredientes utilizados, y pueden ser decisivos en la elección de los productos⁸. No obstante, aún son muy pocos los trabajos sobre productos sin gluten sostenibles.

En nuestro grupo se ha avanzado en una propuesta de PSG a base de bagazo de manzana recogido de la industria sidrera. Se trata de un subproducto vegetal con alto contenido en fibra y que puede llegar a realizar un aporte significativo de micronutrientes. Se han sustituido (por materias primas más cercanas) ingredientes habituales en productos comerciales tales como el psyllium que encarecen notablemente el alimento a la vez que aumenta su impacto. De esta manera, la sostenibilidad constituye el eje vertebrador respecto al que cumplir los demás requisitos (nutricionales, sensoriales). Así, se ha llegado a una formulación con alta aceptabilidad tanto en población celíaca como en población general, con un alto aporte en fibra (> 6%) y que prácticamente duplica el contenido proteico medio de los panes comerciales. La inclusión de bagazo de manzana disminuye el impacto medioambiental y la formulación presenta actividad contra procesos oxidativos. Más allá de la experiencia concreta de este producto, los verdaderamente relevantes es el modelo de diseño, que integra todos los aspectos demandados por los colectivos que son principales destinatarios, así como por la sociedad en general.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguiar EV, Santos FG, Krupa-Kozak U, Capriles VD. Nutritional facts regarding commercially available gluten-free bread worldwide: Recent advances and future challenges. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2023;63(5):693-705.
2. Conte P, Fadda C, Piga A, Collar C. Techno-functional and nutritional performance of commercial breads available in Europe. *Food Sci Technol Int.* 2016;22(7):621-33.
3. Capriles VD, de Aguiar EV, Dos Santos FG, Fernández MEA, de Melo BG, Tagliapietra BL, et al. Current status and future prospects of sensory and consumer research approaches to gluten-free bakery and pasta products. *Food Res Int.* 2023;113389.
4. Montemurro M, Pontonio E, Rizzello CG. Design of a "clean-label" gluten-free bread to meet consumers demand. *Foods.* 2021;10(2):462.
5. Cantero L, Salmerón J, Miranda J, Larretxi I, Fernández-Gil MDP, Bustamante MÁ, et al. Performance of apple pomace for gluten-free bread manufacture: Effect on physicochemical characteristics and nutritional value. *Appl Sci.* 2022;12(12):5934.

6. Vacca M, Pinto D, Annunziato A, Ressa A, Calasso M, Pontonio E, et al. Gluten-free bread enriched with artichoke leaf extract in vitro exerted antioxidant and anti-inflammatory properties. *Antioxidants.* 2023;12(4):845.
7. Kókai ZL, Remijnse W, Takács J, Veresné Bálint M. Considering a more sustainable gluten-free diet? Gluten-free cereals in European dietary practice. *Discov Sustain.* 2024;5(1):232.
8. Sae-Eaw A, Wongsaichia S, Giacalone D, Narueharadhol P, Ketkaew C. Conceptualizing a Gluten-Free Instant Noodle Prototype Using Environmental Sustainability Aspects: A Cross-National Qualitative Study on Thai and Danish Consumers. *Foods.* 2022;11(16):2437.

Mesa redonda: Alimentos sin gluten

EVALUACIÓN DEL RIESGO EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZAS SIN GLUTEN

M.P. Fernández-Gil, S. Matías-Ibáñez, L. Cantero-Ruiz de Eguino, J. Esparta, O. Martínez, J. Miranda, E. Simón y M.Á. Bustamante

Gluten 3S, Dpto Farmacia y Ciencias de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.

La cerveza se considera una de las bebidas frías que más se consumen en España, y la más consumida fuera del hogar. El hecho de que los establecimientos de hostelería sean los espacios de consumo más habituales, señala un consumo que frecuentemente se realiza en compañía de amigos, familia, compañeros de trabajo, etc. Por este motivo, en un contexto de enfermedad crónica, uno de los retos del colectivo celíaco y sensible al gluten, es la normalización y socialización de las actividades de la vida diaria y las del ocio. En este sentido, la posibilidad de tomar cerveza, entre otras bebidas, puede favorecer alcanzar este reto, siempre que se garantice también la seguridad alimentaria del producto que se está consumiendo.

Con el objetivo de hacer el consumo de la cerveza más inclusivo, el mercado ha experimentado en los últimos años un aumento de la oferta de cervezas sin gluten, y a nivel mundial se espera un incremento del 13,7% en el periodo 2022-2028¹.

Tradicionalmente, la cerveza se ha elaborado a partir de granos de cebada malteados u otro tipo de cereales que contienen gluten (trigo, centeno y avena) a través de un proceso de fermentación alcohólica que posteriormente se completa con la adición de lúpulo que aporta sabor amargo característico y que participa también en la conservación del producto final.

Como las materias primas habituales contienen gluten, se trata de un producto no apto para la población celíaca o sensible al gluten. Por este motivo, a lo largo del tiempo se han utilizado diversas estrategias para elaborar una cerveza sin la presencia de las prolaminas tóxicas². Y son las materias primas utilizadas las que determinan, en gran medida, la seguridad alimentaria de la cerveza sin gluten, que debe tener un contenido en gluten inferior a 20 mg/L.

Desde muy antiguo son conocidas las elaboraciones de cerveza sin gluten a partir de cereales que no contienen esta proteína, como el arroz, mijo, sorgo y teff, a partir de pseudocereales, como trigo sarraceno, quinoa o amaranto u otras materias primas vegetales, como patatas, calabaza, frutos secos y otras fuentes de azúcar fermentable³. Estas cervezas naturalmente libres de gluten, también denominadas las *Gluten-free beer*, son la opción propuesta por la FDA americana para la oferta de cervezas sin gluten. No obstante, las características organolépticas de estas cervezas se alejan bastante del sabor y aroma de la cerveza tradicional.

Una segunda estrategia es la elaboración de cerveza a partir de cereales con gluten de variedades con una menor inmunotoxicidad. Algunos investigadores han señalado que la variedad, la cosecha, e

incluso el proceso de malteado pueden influir en la cantidad de epítopos inmunogénicos⁴. También se han propuesto técnicas de modificación genética para conseguir variedades con menor cantidad de gluten, o incluso, sin gluten⁵.

Otra estrategia es la inclusión de diferentes etapas a lo largo del proceso de fabricación de la cerveza que favorezcan la eliminación del gluten, como puede ser la filtración o decantación y procesos de centrifugación que favorecen la precipitación de las hordeínas. Tradicionalmente se han utilizado para la eliminación de la turbidez y el abrillantado de la cerveza, pero se ha comprobado que también pueden contribuir a una menor presencia de gluten⁶.

En la actualidad, la estrategia más utilizada en Europa es la elaboración de cerveza mediante el uso de enzimas peptidasas microbianas o endopeptidasas de cereal⁷. La cerveza se elabora a partir de cebada y otros cereales con o sin gluten, conservando así las características organolépticas del producto convencional. La adición de enzimas peptidasas hidrolizan el gluten en pequeños fragmentos que, teóricamente, son demasiado pequeños para resultar tóxicos para este colectivo de pacientes. En la literatura científica estas cervezas se denominan *Gluten-removed beer*.

En la evaluación de la seguridad alimentaria de las cervezas sin gluten es imprescindible el análisis del contenido de esta proteína. Para las matrices alimentarias que han sido tratadas con enzimas proteolíticos, o cuando han sido fermentadas, como es el caso de la cerveza, se recomienda el uso de ELISA competitivo, que requiere un solo epítopo para la unión al anticuerpo. El ELISA competitivo basado en el anticuerpo R5, que reconoce la secuencia de aminoácidos QQPFP, ha sido validado en estudios interlaboratorio, teniendo también el reconocimiento de la AOAC (método 2015.05) y la AACC (método 38-55.01). También se han desarrollado otros métodos ELISA competitivos de segunda generación basados en anticuerpos que reaccionan frente a péptidos inmunoreactivos dominantes que participan en la respuesta biológica de la enfermedad celíaca. Por ejemplo, se han utilizado los anticuerpos monoclonales G12 y A1. Ambos reaccionan contra el péptido 33-mer tóxico de la α 2-gliadina. Además, reconocen otros péptidos procedentes de la cebada, trigo, centeno y variedades de avena que presentan inmunogenicidad frente a células T procedentes de personas celíacas. Otro anticuerpo propuesto detecta un epítopo de la α 20-gliadina que estimula las células T, validado para la detección en cerveza, entre otros alimentos⁸. Una limitación de la técnica ELISA competitivo es que los anticuerpos podrían reconocer fragmentos de los péptidos inmunogénicos pero que debido a su pequeño tamaño hayan perdido la capacidad para producir inmunogenicidad, sobreestimando el contenido de gluten.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mordor Intelligence, 2024 [Internet: <https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/gluten-free-beer-market>].
2. Bustamante MA, Simón E, En Arranz E, Fernández-Bañares F, Rosell CM, Rodrigo L, Peña AS, eds. Omnia Science; 2015. p. 645-73.
3. Zannini E, et al. Annu Rev Food Sci Technol. 2012;3:227-34.
4. Taylor JP, et al. J. Inst. Brew. 2016;122:243-50.
5. Gil-Humanez J, et al. PLoS ONE. 9(3): e90898.
6. Taylor JP. PhD Thesis, University College Cork, 2016.
7. Pedroso C, et al. Innov Food Sci Emerg Technol. 2024;95.
8. Panda R, Garber EAE. Front. Nutr. 2019;6:97.

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ALTA SENSIBILIDAD PARA LA DETECCIÓN DE PÉPTIDOS INMUNOGÉNICOS DEL GLUTEN EN CERVEZA MEDIANTE LFIA

V. Segura, M.Á. Siglez, Á. Ruiz-Carnicer, I. Martín-Cabrejas, M. van der Hofstadt-Rovira, E. Mellado, I. Comino y C. Sousa
Universidad de Sevilla.

La cerveza, una de las bebidas más consumidas en el mundo desde la antigüedad, se elabora principalmente con cebada (u otros cereales), agua, lúpulo y levadura. No obstante, cuando se emplean granos que contienen gluten, como el trigo y la cebada, estos ingredientes pueden representar un riesgo para la salud de las personas con enfermedad celíaca (EC) (Cao *et al.*, 2020). La concentración de gluten varía significativamente a lo largo de las distintas etapas del proceso de elaboración como el malteado, macerado, clarificación, fermentación y filtración (Watson *et al.*, 2019). En el producto final, las proteínas del gluten se encuentran hidrolizadas, generando péptidos que persisten en la cerveza. La diversidad en la secuencia, abundancia relativa y extensión de los péptidos resultantes es prácticamente ilimitada, lo que convierte su detección y evaluación en un desafío significativo (Comino *et al.*, 2013; Picariello *et al.*, 2015).

Los métodos actuales para la cuantificación del gluten están diseñados para detectar solo gluten intacto, lo que limita su efectividad en productos hidrolizados como la cerveza y complica la interpretación de los resultados. Este hecho plantea un desafío importante a la hora de evaluar la seguridad de las cervezas con bajo contenido de gluten (Fiedler *et al.*, 2019), ya que la inmunogenicidad real podría subestimarse o no detectarse. La limitada capacidad de estos métodos para reconocer algunos de los principales péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) incrementa este riesgo, especialmente en productos hidrolizados, donde dichos péptidos están más biodisponibles. Además, estudios previos utilizando técnicas como ELISA, LFIA, HPLC y espectrometría de masas han detectado GIP en cervezas etiquetadas con < 20 ppm de gluten, un nivel considerado seguro para pacientes con EC (Real *et al.*, 2014; Fiedler *et al.*, 2018).

Con estos antecedentes, se ha desarrollado un método utilizando anticuerpos monoclonales G12/A1, capaces de detectar GIP en cervezas mediante la técnica LFIA, con un límite de detección (LOD) de 0,5 mg/kg (fig.). En este estudio realizado con 107 muestras de cerveza etiquetadas como "sin gluten" o "bajo contenido en gluten", el 65,4% contenía cereales con gluten, mientras que el 16,8% presentaba una mezcla de cereales con y sin gluten según el etiquetado. Aunque el 71% de las cervezas presentaron niveles de gluten por debajo del LOD de 0,5 mg/kg, el 29% mostraron niveles detectables, a pesar de estar etiquetadas como libres o bajas en gluten. Además, el 6,5% de las cervezas contenían más de 20 mg/kg de gluten, superando el límite establecido por el Codex Alimentarius y considerándose inseguras para los pacientes con EC. Cabe destacar que, de las muestras con gluten detectable, el 74,2% indicaban en su etiqueta la presencia de cereales con gluten.

El método G12/A1 permitió identificar 15 muestras adicionales con presencia de gluten que no fueron detectadas mediante ELISA competitivo R5, subrayando su mayor sensibilidad y precisión en la detección de GIP. Aunque el ELISA competitivo R5 está validado como el método estándar para la detección de gluten, presenta limitaciones en bebidas fermentadas como la cerveza, donde los productos de degradación del gluten no siempre son detectados con la misma eficiencia. En contraste, el nuevo método ha demostrado ser más fiable en la identificación de GIP, ofreciendo ventajas significativas sobre el ELISA en muestras de bebidas fermentadas (Segura *et al.*, 2022).



Fig. Método analítico desarrollado para el análisis de gluten en muestras de cerveza mediante la técnica de LFIA. GIP, péptidos inmunogénicos del gluten; LFIA, lateral Flow immunoassay.

Los resultados obtenidos subrayan la necesidad urgente de implementar métodos específicos de detección de GIP en cervezas con bajo contenido de gluten, con el objetivo de mejorar la seguridad para la población celíaca. Las técnicas convencionales pueden no ser suficientes para detectar adecuadamente los GIP que pueden desencadenar una respuesta inmunológica en estos pacientes. En este contexto, la incorporación de dos anticuerpos monoclonales dirigidos a epítopos claves reconocidos por las células T en la EC podría ofrecer una evaluación más precisa y fiable sobre la seguridad de estos productos. Estos resultados respaldan la adopción de este método innovador en la industria cervecera, así como la revisión de la legislación vigente sobre alimentos etiquetados como libres de gluten. Tal revisión garantizaría una mayor protección para este colectivo vulnerable, asegurando que los productos disponibles en el mercado realmente cumplen con los estándares de seguridad necesarios.

BIBLIOGRAFÍA

- Cao, W., Baumert, J. L., & Downs, M. L. (2020). Compositional and immunogenic evaluation of fractionated wheat beers using mass spectrometry. *Food Chemistry*, 333, 127379.
- Comino, I., Real, A., Moreno, M. de L., Montes, R., Cebolla, A., & Sousa, C. (2013). Immunological determination of gliadin 33-mer equivalent peptides in beers as a specific and practical analytical method to assess safety for celiac patients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 933-943.
- Fiedler, K. L., Cao, W., Zhang, L., Nasiemiec, M., Bedford, B., Yin, L., Smith, N., Arbuckle, M., Lopez-Hernandez, A., & Jackson, L. S. (2019). Detection of gluten in a pilot-scale barley-based beer produced with and without a prolyl endopeptidase enzyme. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 36(8), 1151-1162.
- Fiedler, K. L., Panda, R., & Croley, T. R. (2018). Analysis of gluten in a wheat-gluten-incurred sorghum beer brewed in the presence of proline endopeptidase by LC/MS/MS. *Analytical Chemistry*, 90(3), 2111-2118.
- Picariello, G., Mamone, G., Cutignano, A., Fontana, A., Zurlo, L., Addeo, F., & Ferranti, P. (2015). Proteomics, peptidomics, and immunogenic potential of wheat beer (Weissbier). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(13), 3579-3586.
- Real, A., Comino, I., Moreno, M. de L., López-Casado, M. Á., Lorite, P., Torres, M. I., Cebolla, Á., & Sousa, C. (2014). Identification and in vitro reactivity of celiac immunoactive peptides in an apparent gluten-free beer. *PLoS ONE*, 9(6), e100917.
- Segura, V., Siglez, M. Á., Ruiz-Carnicer, Á., Martín-Cabrejas, I., van der Hofstadt, M., Mellado, E., Comino, I., & Sousa, C. (2022). A highly sensitive method for the detection of hydrolyzed gluten in beer samples using LFIA. *Foods*, 12(1), 160.
- Watson, H., Decloedt, A., Vanderputten, D., & Van Landschoot, A. (2018). Variation in gluten protein and peptide concentrations in Belgian barley malt beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 124, 148-157.

SITUACIÓN DE LAS PERSONAS CELÍACAS FRENTE AL CONSUMO DE CERVEZAS

M. van der Hofstadt-Rovira

Asociación de Sociedades de Celíacos de Europa.

Introducción: AOECS tiene como objetivo fomentar la confianza en el etiquetado de los productos sin gluten evitando al mismo tiempo miedos innecesarios entre el colectivo de pacientes, garantizando que las cervezas sin gluten y otros productos hidrolizados sean seguros para los consumidores celíacos. La evidencia científica actual y la legislación de la UE (Reglamento UE 1169/2011, Reglamento UE 828/2014) respaldan la autorización y el etiquetado de las cervezas elaboradas con cebada u otros cereales como productos sin gluten. Además, la Comisión del Codex (Norma Codex

118-1979) considera que los productos hidrolizados sin gluten son seguros para el consumo por parte de personas celíacas. En consecuencia, AOECS apoya la verificación de la producción de cerveza y el etiquetado del producto final dentro de su sistema de licencia europeo, "espiga barrada" para las cervezas que cumplen con menos de 20 mg/kg de gluten. Sin embargo, AOECS también reconoce las limitaciones e incertidumbres de los métodos analíticos y reconoce la necesidad de seguir investigando para mejorar la detección de gluten en alimentos fermentados e hidrolizados.

Material y métodos: A través de una revisión bibliográfica abordando la situación desde diferentes puntos de vista, desde cómo se produce la cerveza sin gluten (utilizando cereales sin gluten o descomponiendo el gluten en cereales que contienen gluten (como la cebada) a través de una fermentación prolongada y un tratamiento enzimático, creando fragmentos de gluten más pequeños que son difíciles de detectar). Así como la revisión de la literatura sobre los métodos científicos disponibles actualmente. En particular el ELISA competitivo R5, que es la norma actual recomendada por el Codex Alimentarius para detectar el gluten en productos hidrolizados y las limitaciones del mismo ya que puede que no siempre cuantifique con precisión los fragmentos de gluten. Por este motivo se ha revisado la literatura disponible sobre métodos alternativos, como la cromatografía líquida-espectrometría de masas o inmunoensayos de flujo lateral, que son más sensibles, pero cuyo uso aún no está validado, ni resultan ampliamente accesibles para la industria debido a su elevado coste y complejidad. Hasta las implicaciones clínicas que tiene el consumo de este tipo de productos para la salud de los pacientes celíacos, quienes a pesar de tener una buena adherencia a la dieta sin gluten se encuentran permanentemente expuestos a este.

Conclusiones: Aunque tiene limitaciones e incertidumbres, la AOECS sigue respaldando el ELISA competitivo R5 para las pruebas de cerveza sin gluten dentro de su sistema de licencias, pero fomenta la investigación continua de métodos mejorados. Seguimos vigilantes, abogando por una normativa basada en la evidencia y apoyando a los pacientes celíacos para que tomen decisiones informadas sobre los productos sin gluten que consumen.

BIBLIOGRAFÍA

- Watson HG, Decloedt AI, Vanderputten D, Van Landschoot A. Variation in Gluten Protein and Peptide Concentrations in Belgian Barley Malt Beers: Variation in Gluten Protein and Peptide Concentrations in Belgian Beers. *J Inst Brew*. 2018;124:148-57.
- Scherf KA, Wieser H, Koehler P. Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. *Food Res Int*. 2018;110:62-72.
- Watson HG, Vanderputten D, Van Landschoot A, Decloedt AI. Applicability of different brewhouse technologies and gluten-minimization treatments for the production of gluten-free (barley) malt beers: Pilot- to industrial-scale. *J Food Engineering*. 2019;245:33-42.
- Fernández-Gil MP, Simon E, Gibert A, Miranda J, Roger Alcoba E, Martínez O, et al. Gluten Assessment in Beers: Comparison by Different Commercial ELISA Kits and Evaluation of NIR Analysis as a Complementary Technique. *Foods*. 2021;10:1170.
- Cebolla Á, Moreno ML, Coto L, Sousa C. Gluten Immunogenic Peptides as Standard for the Evaluation of Potential Harmful Prolamin Content in Food and Human Specimen. *Nutrients* 2018;10:2.
- Liao YS, Kuo JH, Chen BL, et al. Development and Validation of the Detection Method for Wheat and Barley Glutens Using Mass Spectrometry in Processed Foods. *Food Anal Methods*. 2017;10:2839-47.
- Yu JM, Lee JH, Park J-D, Choi Y-S, Sung J-M, Jang HW. Analyzing Gluten Content in Various Food Products Using Different Types of ELISA Test Kits. *Foods*. 2021;10:108.
- Segura V, Siglez MÁ, Ruiz-Carnicer Á, Martín-Cabrejas I, van der Hofstadt M, Mellado E, et al. A Highly Sensitive Method for the Detection of Hydrolyzed Gluten in Beer Samples Using LFIA. *Foods*. 2023;12:160.

Seguimiento de una dieta sin gluten

DIETA SIN GLUTEN PARA PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ENFERMEDAD CELÍACA: DOCUMENTO DE POSICIÓN DE LA ESPGHAN

P. Crespo-Escobar, V. Luque, E.M. Hård Af Segerstad, T. Koltai, L. Norsa, E. Román, A. Vreugdenhil, R. Fueyo-Díaz y C. Ribes-Koninckx

Hospital Recoletas Campo Grande. Valladolid.

Introducción: La dieta sin gluten (DSG) es esencial en el tratamiento de la celiaquía, ya que es la única opción terapéutica que existe para tratarla. Sin embargo, llevarla a cabo es un gran desafío y se requiere de mucha educación nutricional para asegurar que se hace correctamente. Para ello, es importante que los profesionales sanitarios conozcan todos los aspectos relacionados con la dieta, puntos críticos, principales deficiencias nutricionales que pueden desencadenar, y asegurar que la alimentación no solo es segura sino también saludable. A pesar de esto, no existía un documento de posicionamiento de expertos basado en la evidencia donde se dieran recomendaciones específicas sobre qué aspectos son importantes explicar y abordar con los pacientes en consulta sobre la dieta tras el diagnóstico de celiaquía.

Material y métodos: Revisión sistemática en diferentes bases de datos y una revisión por pares de los artículos. Las recomendaciones prácticas del documento se realizaron en base a la evidencia científica encontrada o a la experiencia clínica de los expertos cuando no se consideró suficiente evidencia descrita en la literatura.

Resultados: De 2.228 artículos encontrados, 75 cumplieron criterios de inclusión. En base a los resultados, se establecen diferentes recomendaciones sobre la DSG en diferentes áreas: definición exacta de qué es la dieta sin gluten, regulación del término “sin gluten”, alimentos considerados “naturalmente sin gluten”, consumo de avena, lectura correcta de etiquetado nutricional, contaminación cruzada dentro y fuera de casa, seguridad de los medicamentos, cosmética y suplementos nutricionales, dieta sin gluten

saludable, riesgos de deficiencias nutricionales y cómo abordarlos, recomendaciones sobre cómo empezar una dieta sin gluten tras el diagnóstico, cómo hacerlo paso a paso y cómo abordar los factores que interfieren en una correcta adherencia a la dieta sin gluten. En la tabla, se resumen algunos de los más destacados desde el punto de vista práctico.

Conclusiones: Aunque la evidencia científica que aborda diversos aspectos de la DSG es en general baja, especialmente en la población pediátrica, en este documento se proporcionan, por primera vez, consejos prácticos y recomendaciones, dirigidas a los profesionales sanitarios, para abordar y mejorar la adherencia a una dieta sin gluten saludable.

BIBLIOGRAFÍA

Luque V, Crespo-Escobar P, Hård Af Segerstad EM, Koltai T, Norsa L, Roman E, et al. Gluten-free diet for pediatric patients with coeliac disease: A position paper from the ESPGHAN gastroenterology committee, special interest group in coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2024;78(4):973-95.

INTERVENCIÓN CON NIÑOS/AS CELÍACOS/AS DURANTE EL PRIMER AÑO TRAS EL DIAGNÓSTICO: ASESORAMIENTO NUTRICIONAL, BIOMARCADORES Y CALIDAD DE VIDA

G. Perez-Junkera, I. Larretxi, V. Navarro, I. Churruca, M. Vázquez-Polo, E. Simón, N. Arnedo y A. Lasa

GLUTEN3S, Área de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.

La celiaquía, un trastorno autoinmune inducido por la ingestión de gluten, afecta aproximadamente al 1,4% de la población (Diamanti *et al.*, 2014). El gluten daña las vellosidades del intestino delgado, produciendo síntomas gastrointestinales como dolor abdominal, hinchazón y la consiguiente disminución de absorción de nutrientes, provocando una desestabilización del estado nutricional. Además, el gluten puede desencadenar síntomas extraintestinales.

Tabla

Topic	Recomendación
Consumo de avena no contaminada (etiquetada “sin gluten”)	Puede consumirse en cantidades de hasta 20-25 g/día en la población pediátrica
Etiquetado de los productos sin gluten	Recomendar a los pacientes que elijan principalmente productos que etiquetados “sin gluten”. Los productos sin estas declaraciones representan un riesgo de seguridad desconocido para el paciente.
Contaminación cruzada	En casa, los puntos críticos son: 1) almacenaje de productos sin gluten (siempre en recipientes separados y etiquetados); 2) higiene durante el cocinado (utensilios siempre limpios, es suficiente limpiarlos con agua, y asegurar que no hay migas de gluten dispersas); 3) cocinando pasta (la pasta con y sin gluten se cocinan separadas); 4) tostadora, la última evidencia dice que se puede compartir y usar con pan con y sin gluten; 5) freidora de aire (no mezclar alimentos con y sin gluten, y limpiarla bien después de usarla); 6) vigilar mucho los alimentos untados (quesos, mantequilla, etc.), y evitar usar el mismo cuchillo para extender en un pan con y sin gluten.
Riesgos nutricionales	Los principales riesgos nutricionales son: bajo consumo de fibra, magnesio, calcio, vitamina D y de hierro, y alto consumo de azúcar y grasas de baja calidad.
Dieta sin gluten saludable	Para que una dieta sin gluten sea saludable, tiene que seguir las mismas recomendaciones de consumo de alimentación saludable que la población general, pero sustituyendo los cereales integrales con gluten por los cereales integrales sin gluten. Consumir a diario: 3 porciones de fruta, 2 de verduras, 6 de cereales y derivados sin gluten, 2 de lácteos y derivados, 2 de proteínas de calidad, grasas de calidad y 1 porción de frutos secos. Consumir semanalmente: carne, pescado huevo y legumbres. Evitar el consumo de embutidos muy grasos, bollería y alimentos ultraprocesados.

tinales como asma o dermatitis, pero también trastornos mentales como depresión o ansiedad (Sainsbury *et al.*, 2013, Castillo *et al.*, 2015). Algunos autores indican que las personas que padecen celiaquía a veces se sienten incomprendidas por la sociedad, principalmente debido al desconocimiento de la enfermedad y de la dieta sin gluten (DSG) (Simpson *et al.*, 2011). Por ello, el tratamiento y seguimiento de personas con enfermedad celíaca (EC) debería abordarse en primer lugar desde una perspectiva clínica con el seguimiento de la sintomatología y la adherencia dietética. El avance en el conocimiento de nuevos marcadores bioquímicos no invasivos podría aportar valiosa información que ayudará en la identificación de transgresiones a la dieta (Singh *et al.*, 2019). Por otro lado, es fundamental abordarlo también desde la perspectiva nutricional, para la consecución del equilibrio dietético, y por último desde la perspectiva psicosocial, prestando especial atención a la calidad de vida e integración de estas personas en la sociedad.

El objetivo del presente estudio ha sido mejorar la calidad de vida de las personas con EC en edad pediátrica a través de una intervención dietética educativa a lo largo del primer año de tratamiento.

Para ello se ha contado con la colaboración de las Unidades de Gastroenterología Pediátrica de seis hospitales (Hospital Universitario de Cruces, Donostia, Álava, Mendaro, Alto Deba y Zumárraga) y la Asociación de Celíacos y Sensibles al Gluten de Madrid que han participado como nodos reclutadores. Se han reclutado tanto niños/as como adolescentes (3-14 años) con diagnóstico de EC confirmado y la recogida de datos se ha realizado en tres tiempos: en el momento del diagnóstico, a los tres meses y a los doce meses. En cada visita se han recogido datos antropométricos, datos bioquímicos, y a través de cuestionarios, información acerca de la historia dietética, datos relativos a la sintomatología, a la adherencia a la dieta y a la calidad de vida. Estos datos han sido analizados por el personal del equipo GLUTEN3S a través del software *Gluten3S Diet*, y tras su análisis se ha emitido un informe personalizado a cada participante sobre su estado nutricional y calidad de la dieta con recomendaciones de mejora. Además, se han tomado muestras sanguíneas, de orina y de heces en las tres visitas para la determinación de biomarcadores indicativos de transgresiones en la DSG.

Tras cada visita se ha llevado a cabo una intervención de educación nutricional en torno al gluten y a la EC mediante 3 reuniones:

- *Intervención en el primer mes:* se ha definido el concepto de “gluten”, “EC”, y se han dado pautas a seguir para conseguir una DSG segura y nutricionalmente equilibrada.
- *Intervención en el cuarto mes:* se ha hecho hincapié en la seguridad de la dieta, en concreto en formas de evitar la contaminación cruzada y explicaciones sobre el etiquetado.
- *Intervención en el decimotercer mes:* se han expuesto los datos obtenidos en el estudio.

En la presente intervención, los resultados han sido positivos, ya que la ingesta de alimentos frescos aumentó tras un año de la intervención y la ingesta de los grupos de alimentos menos nutritivos, como los productos ultraprocesados, disminuyó. Además, han mejorado la sintomatología, tanto intestinal como extraintestinal. Sin embargo, no se observaron cambios en los resultados de la calidad de vida de los participantes, siendo negativos desde el diagnóstico hasta el final de la intervención. En la actualidad, se está trabajando en la cuantificación de biomarcadores. Se prevé disponer de estos resultados en un futuro próximo.

Se ha observado que el asesoramiento personalizado, la educación nutricional y el seguimiento continuado de los niños y niñas con EC realizado por dietistas-nutricionistas son factores cruciales para conseguir resultados positivos en el equilibrio dietético y sintomatología de la EC. No obstante, se requiere de un mayor esfuerzo para mejorar la calidad de vida de esta población. Por esta razón, se podrían implementar estrategias sociales para aumentar el

conocimiento de la EC en la sociedad general, y así mejorar la inclusión social de las personas con EC.

BIBLIOGRAFÍA

- Diamanti, A., Capriati, T., Basso, M., Panetta, F., Laurora, V., Bellucci, F., et al. (2014). Celiac Disease and Overweight in Children: An Update. [Review]. *Nutrients*, 6(1), 207-220.
- Sainsbury, K., Mullan, B., & Sharpe, L. (2013). Reduced quality of life in coeliac disease is more strongly associated with depression than gastrointestinal symptoms. *Journal of Psychosomatic Research*, 75(2), 135-141.
- Castillo, N. E., Vanga, R. R., Theethira, T. G., Rubio-Tapia, A., Murray, J. A., Villafuerte, J., et al. (2015). Prevalence of Abnormal Liver Function Tests in Celiac Disease and the Effect of a Gluten-Free Diet in the US Population. *American Journal of Gastroenterology*, 110(8), 1216-1222.
- Simpson, S.; Lebwohl, B.; Lewis, S.K.; Tennyson, C.A.; Sanders, D.S.; Green, P.H. Awareness of gluten-related disorders: A survey of the general public, chefs and patients. *e-SPEN Eur. E-J. Clin. Nutr Metab.* 2011, 6, e227-e231.
- Singh, A., Pramanik, A., Acharya, P., & Makharla, G. K. (2019). Non-Invasive Biomarkers for Celiac Disease. *Journal of Clinical Medicine*, 8(6), 885.

MÁS ALLÁ DEL GLUTEN. OTROS COMPONENTES DE LA DIETA CAUSANTES DE SINTOMATOLOGÍA

J. Miranda^{1,3}, S. Matías-Ibáñez¹, M.Á. Bustamante², M.P. Fernández-Gil², I. Larretxi^{1,3}, A. Lasa^{1,3} e I. Churruca^{1,3}

¹Grupo de investigación GLUTEN3S, Dpto de Farmacia y Ciencias de los alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea. ²Laboratorio de Análisis de Gluten UPV/EHU. ³Instituto de Investigación Sanitaria Bioaraba, Nutrición y Seguridad Alimentaria, Vitoria-Gasteiz.

Desde que se identificó el gluten como el factor desencadenante, la dieta sin gluten (DSG) ha sido el pilar del tratamiento para personas con enfermedad celíaca (EC). Aunque la mayoría de pacientes experimenta una mejoría en los síntomas al adoptar la DSG, hasta un 30% continúa presentando síntomas y/o inflamación intestinal persistente¹. En este sentido, es importante tener en cuenta que el porcentaje de adherencia efectiva a la DSG varía entre el 40% y el 90%, que existe un riesgo de contaminación accidental con gluten, pero también que abre la puerta a que otras moléculas puedan jugar un papel en la presencia de síntomas.

Además de los pacientes con EC, la DSG se emplea en otras patologías como en el tratamiento de la ataxia por gluten, la dermatitis herpetiforme, la enfermedad inflamatoria intestinal, el síndrome del intestino irritable, así como en casos de sensibilidad al gluten no celíaca (SGNC)². Esta última se caracteriza por síntomas intestinales y extraintestinales tras la ingestión de gluten en personas que no presentan EC ni alergia al trigo.

En los últimos años se han realizado diferentes investigaciones en personas con EC-SGNC, sobre si otros componentes de DSG pueden ser también responsables en parte de los efectos observados. De este modo, se ha propuesto que componentes de los alimentos como los oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y polioles fermentables conocidos como FODMAP, los inhibidores de amilasa-tripsina (ATIs) y aminoácidos biógenos, como la histamina, pueden actuar como activadores de estas enfermedades y podrían contribuir a la subsistencia de síntomas gastrointestinales y extraintestinales.

El término FODMAP hace referencia a un grupo de cinco subgrupos de hidratos de carbono de absorción deficiente y fermentación rápida que se cree que causan síntomas gastrointestinales. Estas moléculas se encuentran en una gran variedad de alimentos de consumo habitual, como frutas, verduras, legumbres, cereales, productos lácteos y derivados, edulcorantes y miel. Un caso relevante es el de los fructanos, un tipo de FODMAP que en personas con SGNC puede provocar más síntomas incluso que el propio gluten⁴. De hecho, la comunidad científica europea ha comenzado a

pedir el etiquetado específico en alimentos con bajo contenido en FODMAP, como ya ocurre en países como Australia.

ATI son un grupo de proteínas que están presentes en las semillas de todos los cereales (incluidos el trigo, la cebada, el centeno, el maíz, el mijo y el arroz) y se han implicado en reacciones adversas a la exposición al trigo, como la alergia respiratoria y alimentaria, y en respuestas intestinales asociadas con la EC-SGNC⁴.

La histamina es una amina biogénica que se forma como resultado de la descarboxilación del aminoácido histidina. En los alimentos, la cantidad de histamina varía en función de diversos factores, tales como el proceso de fabricación, la higiene de las materias primas, la composición microbiana y la duración de la fermentación. Se ha sugerido que aproximadamente la mitad de las personas celíacas que no presentan mejoras con una DSG podrían ser sensibles a la histamina. Considerando que, además de por enzimas endógenas, la cantidad de histamina en la dieta puede influir en dicha sensibilidad, sería recomendable realizar una evaluación de la DSG en relación con el contenido de esta amina biogénica⁵.

Otras investigaciones señalan que existen moléculas, como el arsénico, el níquel, el zinc e incluso contaminantes orgánicos persistentes, que podrían estar asociadas a síntomas en personas que siguen una DSG.

BIBLIOGRAFÍA

- Penny HA, Baggus EMR, Rej A, Snowden JA, Sanders DS. Non-Responsive Coeliac Disease: A Comprehensive Review from the NHS England National Centre for Refractory Coeliac Disease. *Nutrients*. 2020;12(1):216.
- Aljada B, Zohni A, El-Matary W. The Gluten-Free Diet for Celiac Disease and Beyond. *Nutrients*. 2021;13(11):3993.
- Skodje GI, Sarna VK, Minelle IH, Rolfsen KL, Muir JG, Gibson PR, et al. Fructan, Rather Than Gluten, Induces Symptoms in Patients With Self-Reported Non-Celiac Gluten Sensitivity. *Gastroenterology*. 2018;154(3):529-39.e2.
- Schuppan D, Pickert G, Ashfaq-Khan M, Zevallos V. Non-celiac wheat sensitivity: differential diagnosis, triggers and implications. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2015;29(3):469-76.
- Schnedl WJ, Mangge H, Schenk M, Enko D. Non-responsive celiac disease may coincide with additional food intolerance/malabsorption, including histamine intolerance. *Med Hypotheses*. 2021;146:110404.

Diagnóstico

LINFOGRAMA INTRAEPITELIAL EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD CELÍACA EN NIÑOS Y ADULTOS: DATOS Y RELEVANCIA

G. Roy, R. Pariente y C. García-Hoz

Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Madrid.

Introducción: Cada individuo con enfermedad celíaca (EC) desarrolla una respuesta inmune propia e individual frente al gluten, condicionada por su base genética y modulada por factores ambientales intercurrentes. La enteropatía inmunomediada resultante es un proceso dinámico que engloba una respuesta gluten-específica mediada por linfocitos T CD4 y que culmina con la destrucción citotóxica innata de los enterocitos por parte de los linfocitos intraepiteliales (LIEs), dando lugar a un amplio espectro de formas clínicas, en ocasiones de difícil identificación. El análisis de los LIEs mediante citometría de flujo (linfograma)¹ se perfila como una herramienta discriminativa en el diagnóstico de las diversas formas EC.

Objetivos: Ratificar la utilidad del linfoGRAMA IEL en población adulta y pediátrica como herramienta diagnóstica y como biomarcador de la dinámica del proceso celíaco.

Métodos: Estudio retrospectivo^{2,3} que incluye 768 pacientes adultos (217 EC activa, 195 en dieta sin gluten (DSG), 15 EC poten-

cial y 411 controles no celíacos) y 1.164 pediátricos (602 EC activa, 92 DSG, 24 EC potenciales y 470 controles no celíacos).

Resultados: Se define un perfil de linfoGRAMA celíaco completo ($\uparrow \text{TCR}\gamma\delta \geq 14-15$ junto con $\downarrow \text{sCD}3^- \leq 4-6\%$) fuertemente asociado ($> 80\%$) con formas activas de EC y una probabilidad diagnóstica de EC del 95% en adultos y 100% en niños. El resto de pacientes presentan linfoGRAMAS parciales ($\uparrow \text{TCR}\gamma\delta \geq 14-15$ aislado o $\downarrow \text{sCD}3^- \leq 4-6\%$ aislado) con una menor certeza diagnóstica. En DSG, un 45% de los pacientes adultos y un 30% de los pediátricos aún mantienen como marcador un linfoGRAMA celíaco altamente discriminativo, pero el grupo mayoritario presenta linfoGRAMAS parciales que, aunque preservando la elevación característica de los $\uparrow \text{TCR}\gamma\delta$ LIEs, se acompañan de una elevación en la densidad de los $\downarrow \text{sCD}3^-$ LIEs, marcador de recuperación mucosa. En estos casos la certeza diagnóstica cae de forma drástica (LR+ 5-6).

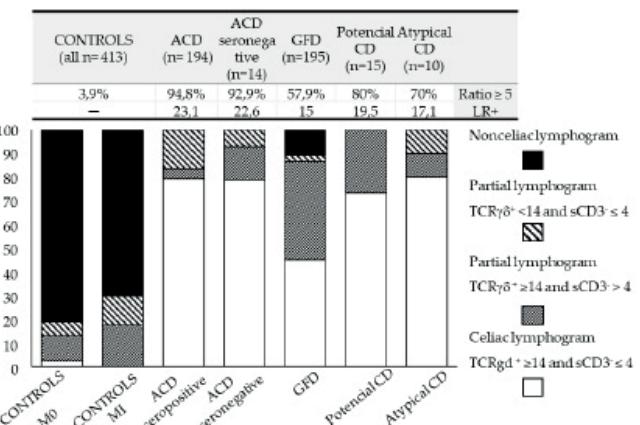


Fig. Distribución de los diferentes perfiles de linfoGRAMAS en los distintos grupos celíacos y controles de la cohorte de adultos. En la parte superior de la figura se muestra el porcentaje de pacientes en cada grupo que cumplen el requisito de una ratio $\text{TCR}\gamma\delta/\text{sCD}3^- \geq 5$ y la precisión diagnóstica calculada (LR+) para cada uno. ACD: enfermedad celíaca activa; CD: enfermedad celíaca; GFD: dieta sin gluten; LR+: razón de verosimilitud².

En la última década numerosos grupos ya han reportado la utilidad y precisión del linfoGRAMA en la práctica clínica⁴. Desde 2018, se ha incluido en la guía nacional para el diagnóstico precoz de la EC⁵. Basándonos en nuestra experiencia, proponemos las siguientes recomendaciones:

- Saber si un paciente ingiere gluten es fundamental a la hora de interpretar los perfiles de un linfoGRAMA parcial en el diagnóstico inicial de EC: $\uparrow \text{TCR}\gamma\delta \geq 14$ y $\downarrow \text{sCD}3^- > 4\%$ en un paciente que ingiere gluten prácticamente excluye una forma activa de EC o introduce la opción de una forma potencial de EC, pero no descarta otras patologías. Mientras que si el paciente está en DSG es indicador de un buen seguimiento de la dieta.
- Los puntos de corte elegidos son arbitrarios y dependen de las prioridades de los facultativos clínicos, favoreciendo la especificidad o la sensibilidad, por lo que es importante ser consciente de que cuanto mayor sea la especificidad mejor será el poder discriminatorio.
- La cuantificación de la ratio $\text{TCR}\gamma\delta/\text{sCD}3^- \geq 5$ es un buen índice discriminativo para descartar o sospechar una forma activa de EC.
- El linfoGRAMA es una técnica sencilla, rápida y precisa, pero requiere experiencia en inmunología de mucosas para interpretar, y analizar con más detalle, los profundos cambios fenotípicos y/o numéricos en el compartimento dinámico LIE.

Conclusiones

- El linfoGRAMA celíaco es una huella “casi patognomónica” del proceso inmunopatológico subyacente, guiado por la ingesta de gluten, pero no es totalmente específica.

- Un aumento de TCR $\gamma\delta$ LIEs es el biomarcador inmunológico característico de la enteropatía celíaca en la mayoría de sus formas.
- La densidad de sCD3 $^-$ LIEs es un sensor de la integridad de la mucosa celíaca, prácticamente desaparecen en las formas activas de EC e inician un ascenso en la mucosa en curación.
- Un linfograma celíaco completo tiene una elevada precisión diagnóstica (LR+ 36,2).
- Un linfograma no celíaco prácticamente excluye la EC activa.
- Cuando está clínicamente indicada una biopsia diagnóstica o de seguimiento, el linfograma aporta especificidad a los hallazgos histológicos y aumenta la eficacia de todo el proceso diagnóstico, minimizando los errores y/o retrasos en el diagnóstico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nunez C, Carrasco A, Corzo M, Pariente R, Esteve M, Roy G. Flow cytometric analysis of duodenal intraepithelial lymphocytes (celiac lymphogram): A diagnostic test for celiac disease. *Methods Cell Biol.* 2023;179:143-55.
2. García-Hoz C, Crespo L, Pariente R, De Andrés A, Rodríguez-Ramos R, Roy G. Intraepithelial Lymphogram in the Diagnosis of Celiac Disease in Adult Patients: A Validation Cohort. *Nutrients.* 2024;16(8):1117.
3. Camarero C, De Andres A, Garcia-Hoz C, Roldan B, Muriel A, Leon F, et al. Assessment of Duodenal Intraepithelial Lymphocyte Composition (Lymphogram) for Accurate and Prompt Diagnosis of Celiac Disease in Pediatric Patients. *Clinical and Translational Gastroenterology.* 2021;12(11):e00426.
4. Fernandez-Banares F, Carrasco A, Martin A, Esteve M. Systematic Review and Meta-Analysis: Accuracy of Both Gamma Delta $^+$ Intraepithelial Lymphocytes and Coeliac Lymphogram Evaluated by Flow Cytometry for Coeliac Disease Diagnosis. *Nutrients.* 2019;11(9).
5. Grupo de trabajo del Protocolo para el diagnóstico precoz de la enfermedad celíaca. En: Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Islas Canarias, España: Servicio de Evaluación del Servicio Canario de la Salud (SESCS) (2018).

APROXIMACIONES INMUNOLÓGICAS COMO ALTERNATIVAS A LA PROVOCACIÓN LARGA EN EL DIAGNÓSTICO EN DIETA SIN GLUTEN

S. Gómez-Aguillilla¹, S. Farrais², N. López-Palacios³, C. Senosiain⁴, B. Arau^{5,6}, Á. Ruiz-Carnicer⁷, E. Tristán⁵, R. Barberas^{8,9}, M. Garranzo-Asensio⁸, J. Infante-Menéndez¹, G. Roy¹⁰, C. Sousa⁷ y C. Núñez^{1,11}

¹Laboratorio de Investigación en Genética de enfermedades complejas, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid.

²Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, Madrid. ³Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid. ⁴Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid. ⁵Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitari Mútua Terrassa, Terrassa. ⁶Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBERehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid. ⁷Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla. ⁸Unidad de Proteómica Funcional, Programa de Enfermedades crónicas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. ⁹CIBER Frailty and Healthy Aging, Madrid. ¹⁰Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, IRYCIS, Madrid. ¹¹Redes de Investigación Cooperativa Orientada a Resultados en Salud (RICORS), Madrid.

El diagnóstico de la enfermedad celíaca (EC) en adultos en dieta sin gluten (DSG) requiere, según las guías actuales, la reintroducción del gluten en la dieta (provocación) durante un periodo de al menos 6-8 semanas, lo que supone diversas limitaciones.

En los últimos años, han surgido distintas aproximaciones diagnósticas que evitan la reintroducción del gluten o la limitan a una o tres dosis. Entre las más prometedoras, se encuentran el linfograma intraepitelial, el análisis de linfocitos T CD8 $^+$ de migración intestinal en sangre periférica y el estudio de los niveles de IL-2 en suero/plasma¹⁻⁵. Para que estos enfoques sean incluidos en las guías clínicas, es necesario comparar su eficacia diagnóstica y considerar su facilidad de implementación en la práctica clínica.

Con este objetivo, se realizó un estudio prospectivo cuasiexperimental multicéntrico que incluyó a 16 pacientes con EC previamente diagnosticada (atrofia seropositiva) y un grupo de 15 individuos sin EC (9 controles sanos), en los que se evaluaron dichas metodologías. Todos los participantes seguían una DSG desde al menos el mes antes del comienzo del estudio, y llevaron a cabo una provocación con gluten de 3 días. Previamente a la inclusión en el estudio se determinó la correcta adherencia a la DSG mediante el análisis de péptidos inmunogénicos del gluten (GIP) en heces y orina. A los participantes se les realizó una endoscopia digestiva alta en la cual se obtuvo una biopsia duodenal para determinar el linfograma intraepitelial por citometría de flujo. Además, se les extrajo sangre periférica (muestra basal), tras lo cual tomaron la primera dosis de gluten. Cuatro horas después, se llevó a cabo una nueva extracción (muestra post-4 h). El consumo de gluten se repitió los dos días siguientes (días 2 y 3), para luego reanudar la DSG. Finalmente, se realizó una extracción de sangre 6 días después de la primera dosis de gluten (muestra post-6d). Las muestras de sangre basal y post-4 h se utilizaron para cuantificar los niveles de IL-2. Asimismo, las muestras basal y post-6d se emplearon en el análisis de células T CD8 $^+$ de migración intestinal por citometría de flujo. Los 9 controles sanos siguieron el esquema descrito sin la realización de la endoscopia y determinación del linfograma intraepitelial.

El estudio de la IL-2 mostró una sensibilidad y especificidad del 84,6% y 83,3%, respectivamente. En comparación, el análisis de las células T CD8 $^+$ de migración intestinal mostró una sensibilidad y especificidad más altas, con valores del 92,3% y 100%, respectivamente. El porcentaje de linfocitos intraepiteliales (LIEs) TCR $\gamma\delta$ $^+ \geq 14\%$ presentó una sensibilidad del 92,3%. Al considerar el linfograma intraepitelial completo definido como TCR $\gamma\delta$ $^+ \geq 14\%$ y CD3 $^- < 10\%$, la sensibilidad fue del 69,2%, al tratarse de pacientes en DSG.

Al considerar los tres pacientes con EC que dieron positivos para GIP en heces, dos presentaron resultados negativos para IL-2, y uno de ellos también para las células CD8 $^+$. Los tres mostraron un linfograma intraepitelial compatible con el perfil celíaco.

Nuestros resultados sugieren que los tres métodos evaluados presentan elevada eficacia para el diagnóstico de EC en adultos en DSG. No obstante, el análisis de los niveles de IL-2 requiere un equipo especializado de escasa disponibilidad y un procesamiento más minucioso en comparación con las otras dos pruebas, cuyo principal requisito es un citómetro de flujo, un equipo presente en la mayoría de los hospitales. Así, tanto el porcentaje de LIEs TCR $\gamma\delta$ $^+$ en mucosa duodenal como el ensayo de células T CD8 $^+$ en sangre se presentan como pruebas de fácil implementación en la práctica clínica que permiten diagnosticar la EC en individuos en DSG, sin necesidad de reintroducir gluten durante varias semanas. El análisis de LIEs TCR $\gamma\delta$ $^+$ no requiere consumir gluten ni se ve afectado por la falta de adherencia a la DSG, aunque implica realizar una prueba invasiva. Por tanto, la elección de una u otra prueba dependerá de las características individuales de cada paciente.

Agradecimientos: Financiado por Ministerio de Ciencia e Innovación (DI-17-096274); Agencia Estatal de Investigación y RETOS (RTC2019-006806-1); e Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) (PI21/00271).

BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández-Bañares F, López-Palacios N, Corzo M, Arau B, Rubio M, Fernandez-Prieto M, et al. Activated gut-homing CD8(+) T cells for coeliac disease diagnosis on a gluten-free diet. *BMC Med.* 2021;19:237.
2. García-Hoz C, Crespo L, Pariente R, De Andres A, Rodriguez-Ramos R, Roy G. Intraepithelial Lymphogram in the Diagnosis of Celiac Disease in Adult Patients: A Validation Cohort. *Nutrients.* 2024;16.
3. Leonard MM, Sylvester JA, Leffler D, Fasano A, Kelly CP, Lewis SK, et al. Evaluating Responses to Gluten Challenge: A Randomized, Double-Blind, 2-Dose Gluten Challenge Trial. *Gastroenterology.* 2021;160:720-33 e8.
4. Martín-Cardona A, Carrasco A, Arau B, Vidal J, Tristan E, Ferrer C, et al. Gammadelta+ T-Cells Is a Useful Biomarker for the Differential Diagnosis between Celiac Disease and Non-Celiac Gluten Sensitivity in Patients under Gluten Free Diet. *Nutrients.* 2024;16.
5. Tye-Din JA, Daveson AJM, Ee HC, Goel G, MacDougall J, Acaster S, et al. Elevated serum interleukin-2 after gluten correlates with symptoms and is a potential diagnostic biomarker for coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;50:901-10.

Epidemiología**EVOLUCIÓN DE LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD CELÍACA EN ESPAÑA**

M. Esteve^{1,2}, E. Sudrià-Lopez³, B. Arau^{1,2}, A. Martín-Cardona^{1,2}
e I. Villar-Balboa³

¹Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Universitari Mútua de Terrassa, Terrassa. ²Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Madrid.

³Fundació per la Recerca Mútua de Terrassa, Terrassa. ⁴Centro de Atención Primaria Florida Sud, Institut Català de la Salut, L'Hospitalet de Llobregat.

El conocimiento de la epidemiología de la enfermedad celíaca (EC) y su evolución es fundamental para planificar políticas sanitarias. Además, la investigación de factores asociados a cambios de prevalencia es útil para identificar potenciales desencadenantes y aplicar políticas de prevención.

En los últimos 30 años se han publicado en España 7 estudios epidemiológicos que han mostrado prevalencias de EC entre 0,26 al 3%. Estas grandes diferencias detectadas, tanto en España, como en la mayor parte de países del mundo, pueden atribuirse en buena parte a sesgos de inclusión.

Un metaanálisis de prevalencia de EC reportó una seroprevalencia global de 1,4% (0,7% comprobada por biopsia). Este metaanálisis¹ y otro más reciente de incidencia de EC² mostraron un aumento de ambas a lo largo del tiempo, revelando valores más altos en niños que en adultos y más altos en mujeres que en hombres. Este progresivo incremento de la prevalencia e incidencia se ha sugerido también en un metaanálisis más reciente de población pediátrica en Europa³. Sin embargo, los propios autores remarcan las grandes limitaciones de estos estudios que utilizan diferentes metodologías y que son en gran medida responsables de la variabilidad en la prevalencia (de 0,10% a 3,03%). En este sentido, en una enfermedad que afecta más a mujeres que hombres, y más a niños que adultos, no realizar ajustes de la prevalencia por edad y sexo ocasiona diferencias importantes que no pueden atribuirse a una zona geográfica o a un período de tiempo determinado. Además, la mayoría de metaanálisis evalúan de forma conjunta dos tipos principales de estudios: (1) basados en historias clínicas de pacientes clínicamente diagnosticados y (2) basados en detección serológica de EC no diagnosticada, que más se ajustan a la prevalencia real de la EC. Sin embargo, es muy interesante conocer si en un mismo país existen diferencias entre la EC detectada por cribado masivo y la EC clínicamente diagnosticada. Si la diferencia entre ambas es muy grande, indicaría un

infradiagnóstico de la enfermedad y la necesidad de realizar campañas de búsqueda activa de casos.

Para ilustrar la importancia de la metodología en la interpretación de la prevalencia, el estudio que muestra la seroprevalencia más alta en Europa en el actual milenio (3,03%, Granada 2009-2014⁴), incluyó 198 niños, un tamaño de muestra muy pequeño para una enfermedad con una prevalencia relativamente baja. No se menciona cómo se llevó a cabo la inclusión, ni el entorno de reclutamiento, y además, los síntomas que presentaban los niños evaluados, indican que se trata de un estudio de búsqueda activa de casos, más que un estudio de prevalencia poblacional. Otro estudio incluido en el metaanálisis pediátrico europeo (Madrid 2004-2005)⁵, determinó HLA-DQ2 en sangre de cordón umbilical a 1291 recién nacidos. Posteriormente, evaluaron serológicamente a los 2-3 años de vida, 255 niños de los 362 con HLA-DQ2+ e identificaron 15 pacientes con EC, asumiendo una prevalencia poblacional del 1,1% (15/1.291 niños).

Queda mucho por hacer para saber si existen fluctuaciones reales en la prevalencia de la EC y la única forma de tener información fiable es disponer de datos recogidos de idéntica forma a lo largo de los años. En este sentido nuestro grupo dispone de resultados de tres estudios de prevalencia serológica de la población general realizados en los últimos 20 años, con la misma metodología. En las tres cohortes se utilizó el mismo anticuerpo para detección serológica, la misma zona geográfica y tipo de población y la inclusión de casos consecutivos se ajustó por edad y sexo a la población de referencia. Se observó que entre los años 2004-2007⁶ y 2020-24 (datos personales no publicados) la prevalencia global (1-80 años) se mantuvo alrededor de 0,5%, mientras que la prevalencia en niños < de 5 años se redujo a la mitad desde 2004-2007 (2,36%) a 2013-19 (1,25%)⁷ y se ha mantenido en valores similares entre 2020-24.

Disponemos también de datos pendientes de publicación de prevalencia poblacional de EC clínicamente diagnosticada en L'Hospitalet de Llobregat (Barcelona) entre los años 2005-2019. Sobre una población de 269.382 habitantes, la prevalencia fue de 0,19%, con diferencias entre adultos (0,17%) y niños (0,31%). Los casos se identificaron a través de la historia clínica electrónica con el código ICD-10-CM, K90.0, con validación caso a caso. La identificación de EC a través de la codificación ICD-10-CM en los registros electrónicos de distintos países, con sistemas sanitarios similares, puede ser una forma de disponer de datos globales evolutivos de la EC. En nuestro país, la brecha detectada entre los casos diagnosticados y los reales obliga a realizar políticas activas de detección.

BIBLIOGRAFÍA

1. Singh P, Arora A, Strand TA, Leffler DA, Catassi C, Green PH, et al. Global Prevalence of Coeliac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2018;16:823-36.
2. King JA, Jeong J, Underwood FE, Quan J, Panaccione N, Windsor JW, et al. Incidence of Coeliac Disease Is Increasing Over Time: A Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2020;115:507-25.
3. Roberts SE, Morrison-Rees S, Thapar N, Benninga MA, Borrelli O, Broekaert I, et al. Systematic review and meta-analysis: The incidence and prevalence of paediatric coeliac disease across Europe. *Aliment Pharmacol Ther.* 2021;54:109-28.
4. Almazán MV, Ortega E, Moreno Torres R, Tovar M, Romero J, López-Casado MÁ, et al. Diagnostic screening for subclinical celiac disease using a rapid test in children aged 2-4. *Pediatr Res.* 2015;78:280-5.
5. Cilleruelo ML, Fernández-Fernández S, Jiménez-Jiménez J, Rayo AI, de Larramendi CH. Prevalence and Natural History of Celiac Disease in a Cohort of At-risk Children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016;62:739-45.
6. Mariné M, Farre C, Alsina M, Vilar P, Cortijo M, Salas A, et al. The prevalence of coeliac disease is significantly higher in children compared with adults. *Aliment Pharmacol Ther.* 2011;33:477-86.
7. Arau B, Dietl B, Sudrià-Lopez E, Ribes J, Pareja L, Marqués T, et al. A Population-Based Cross-Sectional Study of Paediatric Coeliac Disease in Catalonia Showed a Downward Trend in Prevalence Compared to the Previous Decade. *Nutrients.* 2023;15(24):5100.

Enfermedad celíaca en el adulto

DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA EN ADULTOS: PROTOCOLO A SEGUIR EN FUNCIÓN DEL ESCENARIO CLÍNICO

M.Á. Montoro¹⁻³, M. Latre¹, E. Menjón¹ y C. Núñez⁴

¹Unidad de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición, Hospital Universitario San Jorge, Huesca. ²Grupo de Investigación Gastro-celiac (B48_23D), Instituto de investigación Sanitaria Aragón (IIS-Aragón). ³Departamento de Medicina de la Universidad de Zaragoza. ⁴Laboratorio de Investigación en Genética de Enfermedades Complejas, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid.

El diagnóstico de enfermedad celíaca (EC) exige un protocolo que puede variar según el escenario: 1) niños vs adultos; 2) grado de sospecha clínica (SC); 3) supresión del gluten; 4) resultados de la serología; 5) casos de duodenitis linfocítica [DL] y 6) No respondedores a la dieta (NRCD, del inglés *Non-Responsive Celiac Disease*). La figura 1 muestra un algoritmo basado en las recomendaciones de las Guías de Práctica Clínica^{1,4} más recientes:

1) Serología positiva. En adultos, ante la presencia de anticuerpos antitransglutaminasa 2 IgA (anti-TG2), debe ofrecerse una biopsia duodenal (BD). El diagnóstico sin biopsia en presencia de anti-TG2 > 10 LSN en adultos es controvertido, pero podría considerarse en presencia de riesgo (p. ej., coagulopatía grave) o negativa del paciente¹. En ausencia de lesión mucosa, el paciente puede ser categorizado como EC potencial y procede un seguimiento. La presencia de atrofia vellositaria (AV) es compatible con una EC y el diagnóstico queda reforzado si los síntomas revierten y la serología se negativiza tras dieta sin gluten (DSG). Si los síntomas no revierten en 6-12 meses, el caso entra en la categoría de NRCD (ver más adelante)⁴. Los pacientes Marsh 1 pueden ser clasificados como celíacos si la probabilidad pretest es alta (p. ej., antecedentes familiares de 1º grado, hipotiroidismo autoinmune o presencia de anemia) y se han excluido otras causas reconocidas de DL (p. ej., *H. pylori*, consumo de AINE, sobrecrecimiento bacteriano intestinal [SIBO] o giardiasis).

2) SC y serología negativa. Si la seronegatividad no se explica por un déficit de IgA (< 0,7 mg/dL) o la toma de inmunosupresores, la actitud depende del grado de SC y la presencia de variantes que codifican los heterodímeros HLA DQ2.5, DQ2.2, DQ8 y DQ7.5. En pacientes con SC bien fundada, genes permisivos y AV no explicable por otra causa (p. ej., olmesartán) puede tratarse de una EC seronegativa⁵. En tales casos puede iniciarse una DSG. El diagnóstico se confirma si los síntomas y la enteropatía revierten⁵. El diagnóstico es más verosímil si en el momento de realizar la 1ª biopsia se realiza un linfoGRAMA intraepitelial por citometría de flujo que demuestre un aumento de los linfocitos intraepiteliales (LIEs) TCRγδ⁺ y una disminución de CD3⁺.

3) Pacientes que han interrumpido la ingesta de gluten. La mejor aproximación es investigar únicamente a los pacientes con genética permisiva mediante una prueba de provocación (comúnmente: 10 g de gluten/día, durante 2 semanas, y si la tolerancia es buena prolongar hasta 6 semanas), repetir la serología y, en función de los resultados (positivos o negativos), actuar como en los puntos 1 y 2, respectivamente¹. Si el paciente es reacio o no tolera la provocación larga se puede recurrir a la determinación de linfocitos CD8⁺ de migración intestinal en sangre periférica, tras una provocación de 3 días. La prueba se considera positiva si se demuestra una elevación de linfocitos T activados (CD8⁺CD103⁺β7^{hi}CD38⁺/CD8⁺ totales) ≥ 0,009% (sensibilidad 97% y especificidad 95% para EC seropositiva)⁷.

4) Pacientes con NRCD. Este grupo incluye 4 subcategorías: 1) error de diagnóstico: revisión de la BD por 1-2 patólogos expertos y reevaluar la probabilidad pretest para el diagnóstico; 2) pobre adherencia a la dieta: es esencial contar con métodos sensibles para detectar transgresiones (p. ej., determinación de péptidos inmunogénicos del gluten [GIP] en heces u orina)⁸, además de revisar la DSG por expertos; 3) comorbilidad asociada: malabsorción-intolerancia a azúcares, SIBO, insuficiencia pancreática exocrina, colitis microscópica, Crohn, intestino irritable o malabsorción de sales biliares. Estas entidades deben ser investigadas y tratadas; 4) EC refractaria (persistencia de AV, 12 meses después de una DSG estricta [0,3-0,5%]). Tales pacientes deben someterse a pruebas que permitan diferenciar los dos subtipos, según el inmunofenotipo de los LIEs (normal o anormal) y el tipo de clonalidad en los genes del TCR⁴.

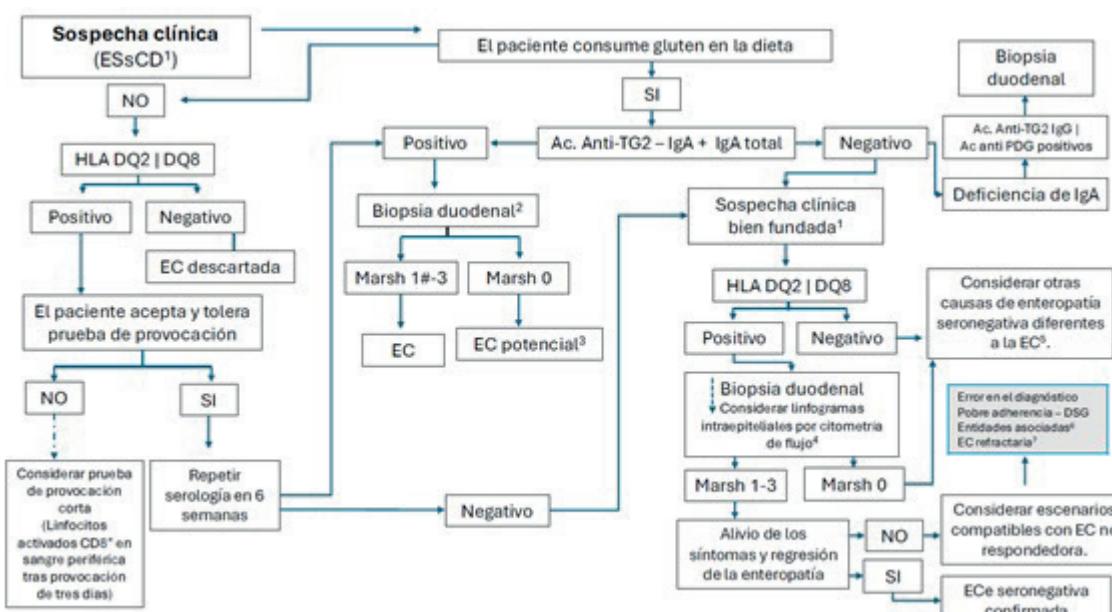


Fig. 1. Algoritmo diagnóstico para pacientes adultos.

- 1) Considerar los postulados y recomendaciones de la *European Society for Study of Celiac Disease*³ y en especial los criterios para indicar biopsia duodenal en presencia de serología negativa.
 - 2) 1-2 biopsias de bulbo en posición “9” o “12” horarias y 4 de 2^a porción duodenal + 1 muestra para citometría de flujo en seronegativos. Tomar las muestras de una en una, sin agitar las pinzas para depositar la muestra en el frasco.
 - 3) Considerar dieta sin gluten en presencia de síntomas o signos compatibles (p. ej., anemia).
 - 4) Según los datos actuales en adultos, los puntos de corte que ofrecen una especificidad elevada (98%) para pacientes que no han interrumpido la ingesta de gluten en el momento de la evaluación son TCRγδ⁺ ≥ 14% y CD3⁻ ≤ 4% (sensibilidad: 79%). La sensibilidad desciende al 45% si se encuentran en dieta sin gluten. Elevar el punto de corte de LIES CD3⁻ a ≤ 10% parece aceptable para aumentar la sensibilidad de la prueba en pacientes en dieta sin gluten, pero disminuirá la especificidad de la prueba⁷.
 - 5) Considerar otras causas de enteropatía no celíaca: fármacos (p. ej., olmesartán, telmisartán), Whipple, SIBO, inmunodeficiencia común variable, enteritis autoinmune, gastroenteritis eosinofílica, giardiasis, tuberculosis, VIH, mastocitosis, enfermedad de Crohn, enfermedad del injerto por el huésped, linfoma.
 - 6) Investigaciones útiles para la búsqueda intencionada de comorbilidades asociadas a la EC en pacientes con “Non responsive celiac disease” son hormonas tiroideas, test respiratorios para confirmar malabsorción de azúcares o SIBO, colonoscopia con biopsias seriadas para descartar colitis microscópica, calprotectina en heces, ileocolonoscopia, enterorresonancia y/o cápsula endoscópica para excluir enfermedad de Crohn, linfoma o yeunoileítis ulcerativa; considerar los criterios de Roma para el diagnóstico de intestino irritable y resinas de intercambio iónico para una posible malabsorción idiopática de sales biliares.
 - 7) Ante la sospecha de EC refractaria se recomienda derivar el caso a un centro especializado para efectuar técnicas de inmunohistoquímica y citometría de flujo para obtener información sobre el inmunofenotipo de los LIEs, y la presencia de clonalidad en el gen del receptor de linfocitos T (TCR). Los pacientes con EC refractaria tipo I muestran un inmunofenotipo constituido por CD3⁺CD8⁺ αβ (TCR)^{*}, un repertorio policlonal del gen TCR y niveles comparables de LIEs CD3⁺ y CD8⁺ por cada 100 células epiteliales, sin infiltrar la lámina propia. En la EC refractaria tipo II suelen presentar pérdida de peso, anemia, hipalbuminemia, úlceras > 1 cm y estenosis, un fenotipo de LIEs anormal y un incremento masivo de LIEs atípicos (> 50% LIEs CD3⁺CD8⁺).
- *La probabilidad de que un Marsh 1 pueda atribuirse a una EC aumenta si la probabilidad pretest basada en la sospecha clínica es elevada (p. ej., pertenencia a grupos de riesgo o presencia de anemia).

BIBLIOGRAFÍA

1. Rubio-Tapia A, Hill ID, Semrad C, Kelly CP, Greer KB, Limketkai BN. American College of Gastroenterology Guidelines Update: Diagnosis and Management of Celiac Disease. Am J Gastroenterol. 2023;118:59-76.
2. Austin K, Deiss-Yehiely N, Alexander JT. Diagnosis and Management of celiac Disease JAMA. 2024;332:249-50.
3. Al-Toma A, Volta U, Auricchio R, Castillejo G, Sanders DS, Cellier C, et al. European Society for the Study of Coeliac Disease (ESSCD) guideline for coeliac disease and other gluten-related disorders. United European Gastroenterol J. 2019;7:583-613.
4. Malamut G, Soderquist CR, Bhagat G, Cerf-Bensussan N. Advances in Nonresponsive and Refractory Celiac Disease. Gastroenterology. 2024;167:132-47.
5. Leonard MM, Lebwohl B, Rubio-Tapia A, Biagi F. AGA Clinical Practice

- Update on the Evaluation and Management of Seronegative Enteropathies. Gastroenterology. 2021;160:437-44.
6. García-Hoz C, Crespo L, Pariente R, De Andrés A, Rodríguez-Ramos R, Roy G. Intraepithelial Lymphogram in the Diagnosis of Celiac Disease in Adult Patients: A Validation Cohort. Nutrients. 2024;16:1117.
 7. Fernández-Baños F, López-Palacios N, Corzo M, Arau B, Rubio M, Fernández-Prieto M, et al. Activated gut-homing CD8 (+) T cells for coeliac disease diagnosis on a gluten-free diet. BMC Med. 2021;19:237.
 8. Coto L, Mendia I, Sousa C, Bai JC, Cebolla A. Determination of gluten immunogenic peptides for the management of the treatment adherence of celiac disease: A systematic review. World J Gastroenterol. 2021;27:6306-21.

DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD CELÍACA EN DIETA SIN GLUTEN: PROTOCOLO DE ACTUACIÓN

N. López-Palacios¹, S. Gómez-Aguililla², J. Infante-Menéndez², V. Esparza¹, M. Corzo², I. Casado³ y C. Núñez²

¹Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid. ²Laboratorio de Investigación en Genética de enfermedades complejas, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid. ³Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid.

El diagnóstico de enfermedad celíaca (EC) en dieta sin gluten (DSG) es todo un desafío, ya que las pruebas de diagnóstico disponibles en la clínica son dependientes del consumo de gluten y no existe un protocolo estandarizado para llevar a cabo la provocación con gluten. Lo más extendido en adultos es recomendar la ingesta de 10 g/día durante 6 a 8 semanas antes de realizar la serología y biopsia de diagnóstico, pero no hay suficientes estudios que lo avalen. Recientemente, una alternativa muy prometedora la ofrecen los métodos basados en la respuesta inmunológica a una provocación con gluten por un periodo corto.

Las opciones de las que disponemos hoy en día para realizar el diagnóstico en DSG son:

A) Sin provocación con gluten

A.1. Genética. Un resultado negativo del genotipado HLA-DQ2/8 permite descartar la EC.

A.2. Linfograma intraepitelial en muestras de duodeno mediante citometría de flujo. El estudio de cohortes más amplio publicado en adultos determinó que el 45% presentó un linfograma celíaco completo, otro 45% un linfograma parcial (aumento aislado de TCRγδ⁺), y el 10% un linfograma no celíaco, con la consecuente pérdida de precisión diagnóstica¹. La consideración únicamente del aumento de TCRγδ⁺ parece una opción adecuada en DSG².

B) Con provocación con gluten corta

Requieren al menos un período de 4 semanas de DSG previo. La detección de citoquinas precisa una sola dosis de gluten, con toma de muestras de sangre periférica basal (previa a la ingesta) y a las 4 horas del consumo de gluten. Los estudios celulares requieren la reintroducción de gluten durante 3 días consecutivos, con toma de muestras de sangre basal y 6 días después.

B.1. Ensayos de detección de citoquinas. Mediante métodos ultrasensibles se detectaron niveles elevados de al menos 15 citoquinas plasmáticas a las 4 horas de la ingesta de una dosis de gluten. La IL-2 destacó por aparecer de manera más precoz y experimentar un mayor aumento³. Se ha descrito que este aumento de IL-2 en sangre es 100% específico y 92% sensible para el diagnóstico de EC en pacientes en DSG⁴.

B.2. Detección de linfocitos T CD4⁺: ELISPOT de IFN-γ y tetrameros. La provocación de 3 días con gluten moviliza células T CD4⁺ reactivas al gluten, que se pueden detectar mediante la cuantifica-

ción de los niveles de interferón (IFN)- γ mediante ensayo inmuno-pot ligado a enzimas (ELISPOT) o mediante tetrámeros HLA-DQ-gliadina. En ambos casos se emplean células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) estimuladas con péptidos inmunogénicos de gluten, generalmente dependientes de HLA-DQ2.5; y existe alto requerimiento técnico y coste económico. Para diagnosticar EC en pacientes con HLA-DQ2.5 en DSG, se ha descrito una sensibilidad del 85% y una especificidad del 100% para el ELISPOT de IFN- γ ⁵, y del 97% y 95%, respectivamente, para el estudio de los tetrámeros HLA-DQ2.5-gliadina⁶.

B.3. Detección de linfocitos T CD8⁺ mediante citometría de flujo. La provocación de 3 días moviliza también células T CD8⁺ en sangre después de la exposición al gluten. Su estudio ha mostrado una especificidad del 95% y una sensibilidad del 97% para detectar la EC seropositiva⁷. Presenta la ventaja de que los sujetos estudiados pueden ser portadores de cualquier receptor HLA-DQ. Además, el principal requerimiento para su análisis es un citómetro de flujo, disponible en la mayoría de los hospitales, lo que facilita su implementación en práctica clínica.

COMPARACIÓN DE ESTUDIOS

Leonard *et al.* realizaron un estudio evaluando los tetrámeros HLA-DQ2-gliadina, el ELISpot de IFN- γ y las células T CD8⁺ de migración intestinal tras una provocación de 3 días; así como los niveles plasmáticos de IL-2 tras una ingesta de gluten⁸. Evaluaron la respuesta considerando dos dosis diarias de gluten (3 g y 10 g de gluten/día). Se observó mejor respuesta en pacientes que recibieron 10 g de gluten, y la IL-2 se describió como el marcador más temprano y sensible. El ensayo de células T CD8⁺ destacó porque requirió menor volumen de sangre y no precisó cultivo o enriquecimiento *in vitro*, siendo un método factible para entornos clínicos.

Recientemente, nuestro grupo de investigación llevó a cabo otro estudio comparativo que incluía la IL-2, los linfocitos T CD8⁺ de migración intestinal y los LIE con TCR $\gamma\delta$ ⁺ en mucosa duodenal (<https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2024.08.05.24311406v1>). Observamos una sensibilidad similar para LIE TCR $\gamma\delta$ ⁺ en biopsia y las células T CD8⁺ en sangre (88%), ligeramente superior a la observada para la IL-2 (82,4%).

Valorando los estudios descritos, proponemos un posible algoritmo diagnóstico de EC en DSG (fig.).

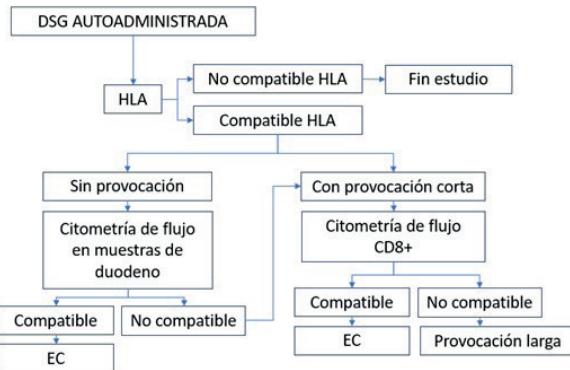


Fig. Algoritmo diagnóstico en individuos adultos en dieta sin gluten (DSG) con sospecha de enfermedad celíaca.

BIBLIOGRAFÍA

- García-Hoz et al. Intraepithelial Lymphogram in the Diagnosis of Celiac Disease in Adult Patients: A Validation Cohort. *Nutrients*. 2024;16(8):1117-31.
- Martín-Cardona et al. Gammadelta+ T-Cells is a useful biomarker for the differential diagnosis between celiac disease and non-celiac gluten sensitivity in patients under gluten free diet. *Nutrients*. 2024;16(14):2294.
- Goel et al. Cytokine release and gastrointestinal symptoms after gluten challenge in celiac disease. *Sci Adv*. 2019;5:eaw7756.
- Anderson RP, et al. Whole blood interleukin-2 release test to detect and characterize rare circulating gluten-specific T cell responses in coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. 2021;204(3):321-34.
- Ontiveros N, et al. Ex-vivo whole blood secretion of interferon (IFN)- γ and IFN- γ -inducible protein-10 measured by enzyme-linked immunosorbent assay are as sensitive as IFN- γ enzyme-linked immunospot for the detection of gluten-reactive T cells in human leucocyte antigen (HLA)-DQ2.5+-associated coeliac disease. *Clinical Exp Immunol*. 2014;175(2):305-15.
- Brottveit M, et al. Assessing possible celiac disease by an HLA-DQ2-gliadin Tetramer Test. *Am J Gastroenterol*. 2021;106(7):1318-24.
- Fernández-Bañares et al. Activated gut-homing CD8+ T cells for coeliac disease diagnosis on a gluten-free Diet. *BMC Med*. 2021;19:237-46.
- Leonard MM, et al. Evaluating Responses to Gluten Challenge: A Randomized, Double-Blind, 2-Dose Gluten Challenge Trial. *Gastroenterology*. 2021;160:720-33.