

ORIGINAL

Utilidad del recuento e inmunofenotipaje de los linfocitos intraepiteliales de la mucosa intestinal en el diagnóstico de la enfermedad celiaca[☆]

Josefa Melero Ruiz^{*}, Montserrat García Cerrada, María Luisa Vargas Pérez, José Juan Fernández de Mera, María Isabel Muñoz Sanjuán, Cristina González Roíz y Emilio Doblaré Castellano

Servicio de Inmunología y Genética, Hospital Infanta Cristina, Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz, Badajoz, España

Recibido el 14 de junio de 2010; aceptado el 24 de noviembre de 2010

Disponible en Internet el 20 de febrero de 2011

PALABRAS CLAVE

Enfermedad celiaca;
Linfocitos
intraepiteliales
TCR $\gamma\delta$;
Linfocitos
intraepiteliales
NK-like;
Citometría de flujo

Resumen

Introducción: Se han observado cambios característicos en las poblaciones de linfocitos intraepiteliales (LIE) de la mucosa intestinal en pacientes celíacos infantiles y adultos.

Objetivos: Determinar el rango normal de las poblaciones de LIE por citometría de flujo y establecer su rentabilidad diagnóstica en la enfermedad celiaca (EC).

Material y métodos: Estudio retrospectivo de 246 niños y 461 adultos con sospecha de EC a los que se había realizado estudio de poblaciones de LIE. El grupo de EC (221 niños y 98 adultos) lo forman individuos con serología celiaca positiva e histología con lesión grado Marsh 1 o mayor. El grupo control (25 niños y 363 adultos) lo constituyen individuos sin lesión intestinal y serología celiaca negativa a los que también se había realizado inmunofenotipo de LIE por citometría de flujo.

Resultados: En el grupo de pacientes celíacos se observa un aumento significativo de LIE totales y LIE TCR $\gamma\delta$ y un descenso significativo de LIE NK-like en comparación con los grupos control. En función de las curvas ROC, los puntos de corte en la población infantil fueron: %LIE > 14,2%, %LIE TCR $\gamma\delta$ > 16,5% y %LIE NK-like < 10,1%. Los puntos de corte en la población adulta fueron: %LIE > 14,2%, %LIE TCR $\gamma\delta$ > 16,1% y %LIE NK-like < 4,4%. En ambas poblaciones se obtienen una especificidad y VPP cercano o igual al 100%, con unos CP+ > 5 y CP– < 2 o próximos.

Conclusiones: En el presente trabajo se han establecido los valores de corte para los tres parámetros analizados de los LIE. Estos parámetros permiten diagnosticar con una especificidad cercana al 100% la EC en el niño y en el adulto. Los valores de CP+ y CP– obtenidos muestran

[☆] Este trabajo corresponde a una comunicación científica presentada y premiada en el III Congreso Nacional del Laboratorio Clínico celebrado en Valencia del 14 al 16 de octubre de 2009.

^{*} Autor para correspondencia.

Correo electrónico: jmelero@unex.es (J. Melero Ruiz).

KEYWORDS

Celiac disease;
TCR $\gamma\delta$ intraepithelial
lymphocytes;
NK-like cell count;
Flow cytometry

que estos parámetros son muy útiles en el diagnóstico de EC activa infantil y del adulto. Por lo tanto, el análisis de las poblaciones de LIE por medio de la citometría de flujo es una nueva herramienta diagnóstica de la EC que complementa el estudio anatomopatológico clásico aumentando su especificidad.

© 2010 AEBM, AEFA y SEQC. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

Usefulness of intraepithelial lymphocytes immunophenotyping in intestinal mucosa for the diagnosis of coeliac disease

Abstract

Introduction: The intestinal mucosa of children and adult with coeliac disease shows characteristic changes in intraepithelial lymphocyte (IEL) populations.

Objectives: Determination of the normal range of IEL populations by flow cytometry and its diagnostic usefulness in coeliac disease (CD).

Methods: A retrospective study of 246 children and 461 adults with suspected CD with IEL immunophenotype results. The CD group (221 children and 98 adults) are individuals with positive coeliac serology and a histology lesion Marsh grade 1 or greater. The control group included 25 children and 363 adults without bowel lesion, negative serology and with IEL immunophenotype results.

Results: The group of coeliac patients, adults and children, shows a significant increase in total IEL and TCR $\gamma\delta$ IEL, and a significant decrease in NK-like IEL compared with control groups. Based on ROC curves, the cut-off in coeliac children was: %IEL >14.2%, %TCR $\delta\gamma$ IEL >16.5% and %NK-like IEL <10.1%. The cut-off in the adult coeliac population was: %IEL >14.2%, %TCR $\delta\gamma$ IEL >16.1% and %NK-like IEL <4.4%. In both populations the specificity and PPV are close or equal to 100%, a CP+ >5 and a CP- <2 or near.

Conclusions: The cut-off values of the LIE population analysed has been established in this study. The values of CP+ and CP- show that these parameters are very useful for the diagnosis of celiac disease in children and adults, with a specificity of approximately 100%. The immunophenotyping of LIE is a very useful technique in the diagnosis of CD, and complements the classical pathological study, thus increasing the specificity.

© 2010 AEBM, AEFA y SEQC. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La enfermedad celiaca (EC) es una intolerancia permanente a los componentes del gluten que causa una enteropatía crónica en individuos genéticamente predispuestos¹. En la patogénesis de la enfermedad intervienen factores ambientales (gluten) y genéticos (HLA-DQ2 y HLA-DQ8) y está mediada por mecanismos inmunológicos (respuesta linfocitaria T intestinal)². Es una enfermedad muy prevalente, con frecuencia asintomática, por lo que aún hoy existen muchos casos sin diagnosticar y otros muchos que se diagnostican en edades muy avanzadas.

Según los criterios modificados de la ESPGHAN³, para la confirmación del diagnóstico de la EC se requiere, al menos, una biopsia intestinal en la que se demuestre la presencia de la lesión histológica característica de EC. Esta varía desde una lesión infiltrativa con incremento de los linfocitos intraepiteliales (LIE) hasta la atrofia vellositaria total con hiperplasia criptal, aumentando gradualmente según la severidad de la afectación⁴. Algunos autores^{5,6} proponen que la presencia de cambios histológicos leves, sin atrofia, pueden considerarse como las etapas tempranas de la EC, y el incremento en el número de LIE, por tanto, un hallazgo histopatológico característico de la EC⁴. Diversos estudios han demostrado el aumento de LIE en pacientes celiacos por métodos histológicos⁷⁻⁹. Mediante estudios inmunohistoquí-

micos se describió el predominio de linfocitos T con receptor TCR $\gamma\delta$ ¹⁰⁻¹⁷.

Los estudios acerca de la población de LIE en pacientes con EC, por lo general, se han realizado en un número relativamente pequeño de pacientes, casi siempre en niños, y con métodos inmunohistoquímicos en la mayoría de los casos. La citometría de flujo es una técnica más rápida, sensible, cuantitativa y objetiva que las técnicas histológicas e inmunohistoquímicas; la introducción de marcadores específicos de LIE como la integrina CD103 permite diferenciar esta población de los linfocitos de lámina propia¹⁸. En recientes estudios con citometría de flujo, además de demostrar el aumento de la población de LIE con receptor TCR $\gamma\delta$ ¹⁰, se describió una nueva subpoblación de LIE de naturaleza natural killer (LIE NK-like con fenotipo CD45+CD3-CD7+)¹⁹ que disminuye drásticamente en los pacientes con EC activa²⁰⁻²².

Nos planteamos como objetivo evaluar la utilidad diagnóstica del estudio de los LIE en la EC infantil y del adulto. Para ello, se cuantificó la población de LIE y las subpoblaciones de estos (LIE TCR δ y LIE NK-like) por citometría de flujo en una serie amplia de pacientes con criterios diagnósticos de EC y en grupos control de edades similares. Se establecieron unos puntos de corte para cada grupo de edad y se analizó la especificidad, sensibilidad, CR+, CR-, VPP y VPN de cada parámetro aislado y en conjunto.

Tabla 1 Datos demográficos y síntomas iniciales.

	Niños		Adultos	
	Controles	Casos	Controles	Casos
<i>N.º de pacientes</i>	25	221	363	98
<i>Edad en años; media (rango)</i>	6 (1-14)	4 (1-14)	43 (15-84)	40 (15-78)
<i>Mujeres, n (%)</i>	9 (36)	135 (61)	254 (70)	66 (67)
<i>Síntomas iniciales (%)</i>				
Manifestaciones GI	55	58	23	37
Anemia	8	21	13	19
Screening en enfermedades asociadas ^a	2	4	7	10
Screening en familiares de primer grado de EC	3	4	13	12
Otros ^b	32	13	44	22

^a Diabetes mellitus insulino-dependiente, tiroiditis, déficit de IgA, síndrome de Down, síndrome de Turner.

^b Trastornos alimenticios, del crecimiento, patología hepática, pancreática, renales, dérmicas, neurológicas, alteraciones hematológicas no anémicas, alergia alimentaria, infecciones víricas.

Material y métodos

Pacientes

Se incluyeron 319 pacientes con diagnóstico final de EC, llegados al Hospital Infanta Cristina de Badajoz entre enero del 2002 y octubre del 2008, a los que se realizó estudio histológico de biopsia duodenal, serología de EC, genotipado de los alelos HLA-DQA1* y HLA-DQB1* y estudio inmunofenotípico de los LIE por citometría de flujo. De las historias clínicas y las bases de datos del hospital se recogieron los datos demográficos y clínicos que completan la información de cada paciente. Se diferenciaron por grupos de edad, grupo infantil, hasta 14 años (procedentes todos de la consulta de Gastroenterología infantil), y el grupo de adultos, mayores de 14 años. Para cada grupo de edad se seleccionó un grupo control al que se había realizado el mismo estudio para despistaje de EC (estudio histológico, serología celiaca y estudio inmunofenotípico de los LIE por citometría de flujo) y en los que se había descartado el diagnóstico de EC.

- **Grupo de pacientes celíacos:** 221 niños y 98 adultos con positividad para anticuerpos anti-gliadina (AGA) y/o anti-transglutaminasa tisular (ATGT) y/o anti-endomisio (EMA) y lesión histológica en mucosa duodenal grado 1 de Marsh o mayor.
- **Grupo control:** 25 niños y 363 adultos, sin alteraciones histológicas en la biopsia intestinal, serología celiaca negativa y un diagnóstico final distinto al de EC.

Los datos demográficos y síntomas iniciales de cada grupo se recogen en la [tabla 1](#).

Métodos

Las muestras de biopsia del intestino delgado se obtuvieron en los niños mediante cápsula de Watson y en los adultos mediante endoscopia digestiva alta. En el momento de la realización de la biopsia todos los casos permanecían sin restricción dietética. Los resultados del estudio histológico fueron clasificados según los criterios modificados de Marsh⁴ en 4 tipos: sin lesión intestinal (Marsh 0), lesión infiltra-

tiva con arquitectura normal y aumento de linfocitos en la mucosa (Marsh 1), hiperplasia criptal (Marsh 2) y la atrofia vellositaria de distintos grados (parcial o Marsh 3a, subtotal o Marsh 3b y total o Marsh 3c).

Las muestras de biopsia para el estudio del inmunofenotipaje de LIE se procesan antes de transcurrir dos horas de su extracción (para evitar la desepitelización espontánea) siguiendo, con ligeras modificaciones, el protocolo descrito por Madrigal²³. Las muestras se incuban, a temperatura ambiente, durante una hora y con agitación suave en un medio RPMI enriquecido con un 5% de FCS (*Fetal calf serum*), al que se añade EDTA 1 mM y DDT 1 mM que provocan la rotura de las uniones intercelulares y la liberación de los LIE y los enterocitos. La suspensión celular resultante se recoge por centrifugación, se lava con suero salino y se incuba 30 minutos a 4 °C con un panel de anticuerpos monoclonales conjugados a distintos fluorocromos para marcar los distintos tipos de linfocitos: anti-CD103-FITC, anti-CD45-PerCP-Cy5.5, anti-TCRγδ-PE y anti-CD3-APC, todos ellos de Becton-Dickinson (San José, California, EE. UU.). Se analizan mediante el software CellQuest en un citómetro de flujo modelo Facscalibur, de Becton-Dickinson (San José, California, EE. UU.), con capacidad para detectar cuatro fluorescencias.

Se adquirieron en cada caso el número de eventos totales necesarios para conseguir 6.000 eventos en la ventana de linfocitos realizada el histograma de CD45 frente a SSC (*Side Scatter Characteristics*). Se selecciona la población de LIE por la coexpresión de CD45 y CD103 y se determina la proporción de estos que coexpresan CD3 y TCRγδ (población LIE TCR(δ) y los negativos para CD3 (población LIE NK-like).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete estadístico SPSS 12.0. Las diferencias de distribución en las poblacionales de LIE entre los grupos control y celíacos se determinaron mediante las pruebas no paramétricas de U de Mann-Whitney. El valor de significación empleado fue $p \leq 0,05$.

Para la obtención de los puntos de corte en las diferentes poblaciones de LIE se utilizaron las curvas ROC. Se eligieron los puntos de corte que mostraban un mayor equilibrio entre

Tabla 2 Medias, desviación estándar, IC 95% y percentiles 10 y 90.

	Controles				Casos			
	Media \pm DS	IC 95%	P10	P90	Media \pm DS	IC 95%	P10	P90
Niños								
LIE totales ^a	8,5 \pm 4,1	6,8-10,2	2,8	14,5	24,3 \pm 10,1 ^c	22,9-25,6	12,9	38
LIE NK-like ^b	30,5 \pm 20,5	22-39	10,1	60,9	4,7 \pm 9,3 ^c	3,5-6	0,6	11,5
LIE TCR $\gamma\delta$ ^b	11,5 \pm 6,8	8,7-14,3	1,9	20,7	29,3 \pm 13,2 ^c	27,5-31	13,6	48,1
Adultos								
LIE totales ^a	9,7 \pm 5,5	9,1-10,3	3,8	16,9	22,7 \pm 10,4 ^c	20,6-24,8	11,2	38,3
LIE NK-like ^b	19,7 \pm 14,9	18,1-21,2	5	41,3	2,1 \pm 2,6 ^c	1,6-2,6	0,3	5,2
LIE TCR $\gamma\delta$ ^b	8,5 \pm 7,8	7,6-9,3	1,5	18	26,9 \pm 13,0 ^c	24,2-29,5	9,39	46,4

^a % sobre el total de células epiteliales.

^b % sobre el total de LIE.

^c Significación estadística ($p < 0,0001$) respecto a los controles.

especificidad y sensibilidad, y a partir de ellos se determinaron la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo y el coeficiente de probabilidad positivo y negativo para cada uno de los valores de LIE por separado y de los tres parámetros en su conjunto.

Resultados

En la [tabla 2](#) se resumen los parámetros estadísticos analizados para los valores de LIE totales, LIE TCR $\gamma\delta$ y LIE NK-like en cada grupo en estudio. El porcentaje de LIE totales se calculó respecto al número total de células extraídas del epitelio (mayoritariamente células epiteliales) y el porcentaje de LIE TCR $\gamma\delta$ y LIE NK-like se calcularon con respecto a estos LIE.

Linfocitos intraepiteliales totales

En la [figura 1](#) se muestra la densidad de esta población celular en los distintos grupos de estudio. Los pacientes con

EC presentan unos valores medios en población infantil y en población adulta significativamente más altos que en el grupo control de edad similar ($p < 0,0001$), como se detalla en la [tabla 2](#). Sin embargo, se observan variaciones individuales en cada grupo con superposición en algunos casos entre pacientes celiacos y el grupo control tanto en niños como en adultos ([fig. 1](#)).

Linfocitos intraepiteliales TCR $\gamma\delta$

Como muestra la [figura 2](#), los valores medios de la densidad de los LIE TCR $\gamma\delta$, que se detallan en la [tabla 2](#), fueron significativamente más elevados en los pacientes celiacos que en los controles en ambas poblaciones de edad ($p < 0,0001$). La media del porcentaje de LIE TCR $\gamma\delta$ fue de 11,5% (mediana 11,5%) en el grupo control infantil y de 8,5% (mediana 6,2%) en el grupo control adulto. Como ocurre con los LIE totales, se observa cierto solapamiento entre los grupos de celiacos y sus respectivos grupos control de ambas poblaciones de edad.

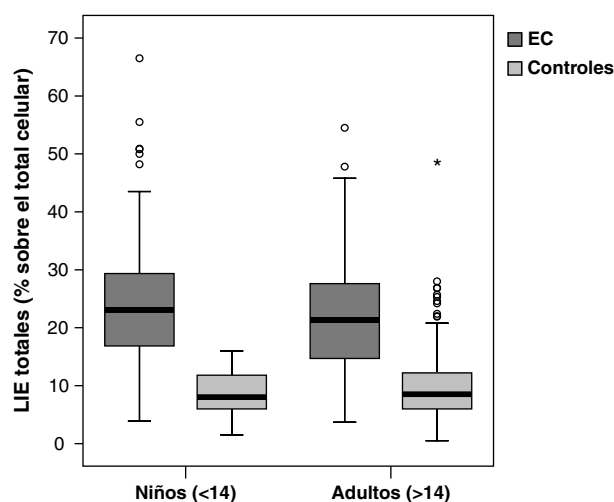


Figura 1 Medianas, rangos e intercuartiles de los porcentajes de los linfocitos intraepiteliales (LIE) totales con respecto al total de células epiteliales en los pacientes con enfermedad celiaca (EC) y los controles no EC tanto en población infantil como adulta.

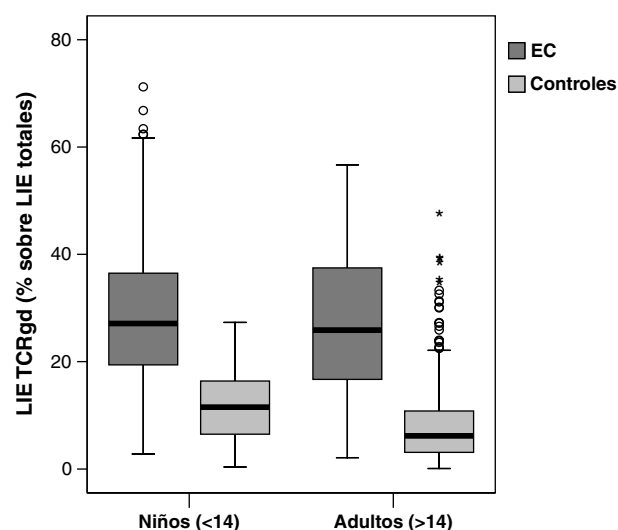


Figura 2 Medianas, rangos e intercuartiles de los porcentajes de los LIE TCR $\gamma\delta$ con respecto al porcentaje de LIE totales en los pacientes con enfermedad celiaca (EC) y los controles no celiacos tanto en población infantil como adulta.

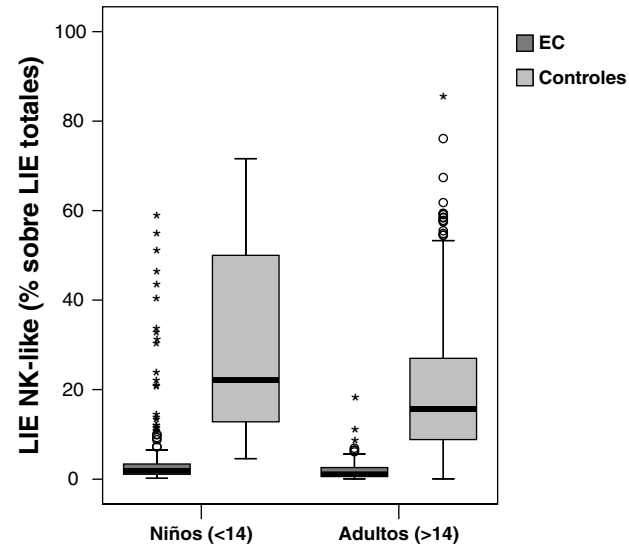


Figura 3 Medianas, rangos e intercuartiles de los porcentajes de los LIE NK-like con respecto al porcentaje de LIE totales en los pacientes con enfermedad celíaca (EC) y los controles no celíacos tanto en población infantil como adulta.

Linfocitos intraepiteliales NK-like

Como muestra la [figura 3](#), los enfermos celíacos tenían valores medios ($4,74 \pm 9,25\%$ en niños y $2,08 \pm 2,62\%$ en adultos) significativamente menores ($p < 0,0001$) que sus grupos control. La [figura 3](#) muestra la existencia de superposición de la densidad de LIE-NK like entre los enfermos celíacos y sus respectivos grupos control, como sucedía con las otras dos poblaciones de LIE.

Tipificación de alelos HLA-DQ

Los alelos HLA-DQA1 y HLA-DQB1 expresados se determinaron por PCR-SSP en 85 niños con EC, en 77 de ellos (90,6%) se detectó el heterodímero HLA-DQA1*05/HLA-DQB1*02 y, de los negativos para este dímero, 5 (5,9%) presentaban el alelo HLA-DQB1*03:02 (DQ8 serológico). De los 63 adultos con EC genotipados, 55 (87,3%) expresaban el heterodímero HLA-DQA1*05/HLA-DQB1*02 y 4 (6,3%) de los negativos eran positivos para el alelo HLA-DQB1*03:02 (DQ8 serológico).

Rentabilidad diagnóstica

Para establecer los puntos de corte para LIE totales, LIE TCR $\gamma\delta$ y LIE NK-like que mejor discriminan a los pacientes celíacos de los controles, se estimó la curva ROC. El punto de corte elegido fue aquel que presentaba una mayor especificidad sin perder sensibilidad. Este valor para los LIE totales es del 14,2%, tanto en niños como en adultos, para los LIE NK-like de 10,1% y 4,4% en niños y adultos respectivamente, y para los LIE TCR $\gamma\delta$, 16,5% en niños y 16,1% en adultos. En la [tabla 3](#) se muestran los valores de corte elegidos y sus variables estadísticas para ambas poblaciones de edad; como puede observarse los valores de especificidad y sensibilidad son altos y los valores de CP+ muy próximos o claramente superiores a 5 y los de CP– muy próximos o

Tabla 3 Rendimiento estadístico de los cut-off propuestos en población infantil y en adultos.

Parámetro	Niños				Adultos			
	LIE totales ^a	LIE NK-like ^b	LIE TCR $\gamma\delta$ ^b	Linfograma	LIE totales ^a	LIE NK-like ^b	LIE TCR $\gamma\delta$ ^b	Linfograma
Cut-off (%)	14,2	10,1	16,5		14,2	4,4	16,1	
Sensibilidad	0,87	0,89	0,84	0,66	0,82	0,87	0,80	0,61
Especificidad	0,89	0,92	0,83	1	0,83	0,91	0,89	0,99
VPP	0,96	0,98	0,94	1	0,42	0,59	0,52	0,96
VPN	0,67	0,71	0,59	0,46	0,97	0,98	0,97	0,94
CP+	7,81	11,23	4,79 ^c		4,81	9,64	7,27	204,5
CP–	0,15	0,12	0,20	0,3	0,22	0,15	0,23	0,4
Curva COR (área bajo la curva) [IC 95%]	0,946 [0,916-0,976]	0,944 [0,915-0,973]	0,898 [0,852-0,945]		0,887 [0,848-0,927]	0,96 [0,942-0,977]	0,903 [0,872-0,934]	

CP+: coeficiente de probabilidad positivo; CP–: coeficiente de probabilidad negativo; IC: intervalo de confianza; VPN: valor predictivo negativo; VPP: valor predictivo positivo.
^a % sobre el total de células epiteliales.
^b % sobre el total de LIE.
^c No se puede calcular el valor real (1/0).

inferiores a 0,2. El parámetro aislado, que en función de los resultados de los CP+ y CP-, resulta ser más útil para el diagnóstico de la EC a cualquier edad es el descenso de los LIE NK-like, siendo 11,23 y 9,64 veces más probable que un valor de LIE NK-like por debajo de 10,1 y 4,4% corresponda a un niño o adulto con enfermedad celiaca activa, respectivamente.

En los niños el VPP fue alto, y el VPN fue más bajo en los tres parámetros, mientras que en el caso de los adultos, el VPN es superior a 96% en los tres test y el VPP es bajo; lo que es consecuencia del relativamente alto número de falsos negativos en el caso de los niños y de falsos positivos en el caso de los adultos (tabla 3).

Al combinar los tres parámetros como una única prueba, la sensibilidad fue menor, 66% en niños y 61% en adultos, pero con una especificidad y VPP del 100% o muy próximas en ambas poblaciones; el VPN fue alto en adultos, 94,6%, pero bajo en los niños, 46,7%. Los tres parámetros combinados mostraban unos valores de CP+ muy elevados y por tanto muy útiles para confirmar la presencia de EC; los valores de CP- eran de 0,3 y 0,4 en la población infantil y adulta, respectivamente (tabla 3).

Utilizando estos puntos de corte, 72 de los 221 niños celiacos (32,6%) tenían valores normales de alguno o algunos de los parámetros LIE. Solo tres de ellos (1,4%) presentaron valores normales de los tres parámetros en conjunto. Casi el 80% de estos falsos negativos son debidos a un único parámetro no alterado, mayoritariamente son falsos negativos de LIE TCR $\gamma\delta$ (un 50% de los FN). Por otra parte, 11 de los 25 niños no celiacos (44%) tienen uno de los tres parámetros con valores fuera del punto de corte (6 con valores de LIE TCR $\gamma\delta$ superiores a 16,5% y tres con valores de LIE NK-like < 10,1). No hay ningún niño con falsos positivos en los tres parámetros.

En el caso de los adultos, 38 de los 98 celiacos (38,8%) presentan valores normales de alguno o algunos de los tres parámetros según los puntos de corte establecidos. Casi el 70% de estos son debidos a un único parámetro no alterado, en su mayoría, también los LIE TCR $\gamma\delta$ (52% de los falsos negativos). Solo un adulto celiaco presentó los tres parámetros normales. Del grupo control de adultos no celiacos, 105 (28,9%) presentaban algunos de los valores del linfograma fuera del rango normal. En la mayoría de los casos solo uno de los parámetros estaba alterado, y en este caso, mayoritariamente por causa de los LIE totales con un 56,2% de falsos positivos. Solo dos adultos del grupo control presentaron todas las poblaciones de LIE alterados con LIE totales y LIE TCR $\gamma\delta$ superiores al punto de corte establecido y valores de LIE NK-like < 4,4%.

Discusión

La demostración de la lesión de la mucosa intestinal sigue siendo una condición imprescindible («gold standard») en el diagnóstico de la EC³. Sin embargo, la lesión histológica no es totalmente característica de la EC²⁴; por otra parte, la afectación parcheada de la mucosa se ha reconocido como causa de falsos negativos de la histología²⁵. En el presente trabajo se aborda la utilidad del estudio de los linfocitos de la mucosa intestinal por citometría de flujo como herramienta diagnóstica de la EC, estudiando retrospectivamente

una serie amplia de casos de pacientes pediátricos y adultos con EC activa. Ya en 1971, Ferguson et al⁷ mostraron que en la afectación de la mucosa intestinal de la EC se produce un aumento del número de LIE; posteriormente se ha demostrado por distintos métodos, sobre todo inmunohistoquímicos, un aumento de los LIE TCR $\gamma\delta$ en los pacientes celiacos¹⁰⁻¹⁴, y más recientemente, ha cobrado interés una población de linfocitos de fenotipo NK-like (CD45+, CD3-, CD56+/-, CD7+)²⁶, definida por citometría de flujo, presentes, normalmente, en la mucosa intestinal y que disminuye en los pacientes celiacos. Nuestros resultados confirman estos hallazgos empleando la citometría de flujo de cuatro fluorescencias como método de cuantificación, técnica que permite el análisis simultáneo de seis características celulares y el análisis de un número elevado de células, además de rapidez, sensibilidad, objetividad y reproducibilidad de los resultados. Nuestro estudio, además del método, aporta el que se realiza sobre una muestra muy amplia y homogénea de pacientes celiacos activos, que incluye la EC infantil y las formas del adulto. Nuestros resultados demuestran que el linfograma intraepitelial (LIE totales, LIE TCR $\gamma\delta$ y LIE NK-like) está alterado de forma muy característica en la enfermedad celiaca activa con un aumento de los LIE totales y LIE TCR $\gamma\delta$ y una depleción de la densidad de LIE NK-like, y que esto es así tanto en la EC infantil, como ya demostraron otros autores²², como en una amplia muestra de pacientes adultos con EC, población sobre la que recientemente también se ha publicado un trabajo²⁷.

Se observó solapamiento entre los valores del linfograma entre los grupos control y de pacientes con EC. Los puntos de corte que mejor sensibilidad y especificidad ofrecían a partir de la curva ROC fueron, en la población celiaca infantil, > 14,2%, > 16,5% y < 10,1% para los LIE totales, LIE TCR $\gamma\delta$ y LIE NK-like, respectivamente. Para los adultos con EC estos puntos de corte fueron: LIE > 14,2%, LIE TCR $\gamma\delta$ > 16,1% y LIE NK-like < 4,4%, puntos similares a los obtenidos por Olivença et al²⁷. Algunos falsos negativos de los LIE totales pueden explicarse por la pérdida de células en el proceso de extracción a causa de problemas preanalíticos (más de dos horas de su extracción). El solapamiento de algunos valores por la presencia de falsos positivos podría estar relacionado con la selección de los grupos control que incluye individuos con sintomatología digestiva. Se sabe que la infiltración de la mucosa intestinal por linfocitos no es un hecho específico de la EC²⁶, sino común a otras alteraciones inflamatorias de la mucosa. Además, la elevación de la proporción de linfocitos T con receptor TCR $\gamma\delta$ también se ha descrito en otras patologías distintas como intolerancia a proteínas de la leche y otras alergias alimentarias^{28,29} y enfermedad de Crohn¹²; en cambio, la disminución de la población de LIE NK-like solo se ha visto en la EC, hasta el momento²⁷. De los 25 niños no celiacos, 11 tuvieron algún falso positivo para alguno de los parámetros del linfograma; tres de ellos debido a los valores de LIE NK-like (4,6, 9,7 y 10,0%), todos mayores de tres años. Según el estudio de Camarero y colaboradores³⁰, en los niños sanos mayores de tres años la densidad de LIE NK-like es significativamente más baja que los menores de tres años y similar a la de los adultos; si se aplica el mismo punto de corte de los adultos sanos (> 4,4%), estos tres niños tendrían valores de LIE NK-like normales. El tamaño de nuestra muestra control infantil y su distribución por edades no nos permitió realizar este análisis.

En la mayoría de los estudios, el diagnóstico de EC se establece cuando la lesión es de grado Marsh 3 y el EMA es positivo²⁷, mientras que en nuestro estudio se han incluido como EC a los pacientes genéticamente predispuestos que presentaban desde una lesión de grado Marsh 1 con clínica sugestiva y algún marcador serológico positivo (AGA-IgA y/o ATGT-IgA y/o EMA-IgA)⁵ considerados por otros autores como formas latentes o potenciales o simplemente una sensibilización al gluten^{9,18}.

Los resultados presentados permiten confirmar que la cuantificación de las poblaciones de LIE analizadas definen un linfograma característico de la EC activa. Analizando los tres parámetros en conjunto la especificidad y el VPP son del 100% o cercanos al 100%; ningún niño del grupo control presentó los tres parámetros con valores patológicos y solo dos adultos no celíacos resultaron falsos positivos a todo el linfograma. Estos podrían tratarse de EC latentes o potenciales, pero no se les pudo hacer un seguimiento para comprobar esta hipótesis, hecho este que sería muy interesante confirmar en trabajos futuros. Las alteraciones en el linfograma de los LIE al diagnóstico parecen ser extensivas a otras etapas o formas (DSG, EC latentes o potenciales, dermatitis herpetiforme) de la enfermedad¹⁸, en las que los marcadores serológicos y la alteración histológica se normalizan.

Aunque no mostrado en este trabajo, la caracterización fenotípica de los LIE por citometría de flujo permite detectar fenotipos aberrantes asociados a la EC refractaria tipo II³¹ y diagnosticar precozmente la transformación a linfoma T asociado a enteropatía (caso no publicado).

En el presente trabajo se han establecido los valores de corte para los tres parámetros analizados del linfograma intraepitelial que permiten diagnosticar con una especificidad y cercana al 100% la EC en el niño y en el adulto. Los valores de CP+ y CP- obtenidos muestran a estos parámetros como muy útiles en el diagnóstico de EC activa infantil y del adulto, destacando el valor de los LIE NK-like como parámetro aislado. Por lo tanto, el análisis de las poblaciones de LIE por medio de la citometría de flujo es una nueva herramienta muy útil en el diagnóstico en la EC. Este análisis complementa al estudio histológico clásico aportándole mayor especificidad; particularmente útil en el diagnóstico diferencial con otras enteropatías que cursan con atrofia vellositaria y en aquellos casos en los que la biopsia es dudosa o falsamente negativa por la afectación parcheada de la mucosa.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ("Celiac Sprue"). *Gastroenterology*. 1992;102:330–54.
- Hill PG, McMillan SA. Anti-tissue transglutaminase antibodies and their role in the investigation of coeliac disease. *Ann Clin Biochem*. 2006;43:105–17.
- Walter-Smith JA, Guandalini S, Schmitz J, Schmerling DH, Visakorpi JK, Report of Working Group of European Society of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. Revised criteria for diagnosis of celiac disease. *Arch Dis Childhood*. 1990;65:909–11.
- Oberhuber G, Granditsch G, Vogelsang H. The histopathology of celiac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999;11:1185–94.
- Kaukinen K, Markku M, Partanen J, Sievanen H, Collin P. Celiac disease without atrophy: Revision of criteria called for. *Dig Dis Sci*. 2001;46:879–87.
- Collin P, Wahab PJ, Murray JA. Intraepithelial lymphocytes and celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2005;19:341–50.
- Ferguson A, Murray D. Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human jejunum. *Gut*. 1971;17:600–3.
- Corazza GR, Frazzoni M, Gasbarrini G. Jejunal intraepithelial lymphocytes in coeliac disease: are they increased or decreased? *Gut*. 1984;25:158–62.
- Cabanne A, Vázquez H, Argoz J, Moreno ML, Nachman F, Niveloni S, et al. Clinical utility of counting intraepithelial lymphocytes in celiac disease intestinal mucosa. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2007;37:20–8.
- Halstensen TS, Scott H, Brandtzaeg P. Intraepithelial T cells of the TcR gamma/delta+ CD8- and V delta 1/J delta 1+ phenotypes are increased in coeliac disease. *Scand J Immunol*. 1989;30:665–72.
- Savilahti E, Arato A, Verkasalo M. Intestinal gamma/delta receptor-bearing T lymphocytes in celiac disease and inflammatory bowel diseases in children. Constant increase in celiac disease. *Pediatr Res*. 1990;28:579–81.
- Spenser J, Isaacson PG, Macdonald TT, Thomas AJ, Walker-Smith JA. Gamma/delta T cells and the diagnosis of coeliac disease. *Clin Exp Immunol*. 1991;85:109–13.
- Rust C, Kooy Y, Pena S, Mearin ML, Kluin P, Koning F. Phenotypic and functional characterization of small intestinal TcR gamma delta + T cells in coeliac disease. *Scand J Immunol*. 1992;35:459–68.
- Javinén TT, Kaukinen K, Laurila K, Kyrönpalo S, Rasmussen M, Mäki M, et al. Intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *Am J Gastroenterol*. 2003;98:1332–7.
- Ferguson A, Arranz E, O'Mahony S. Clinical and pathological spectrum of celiac disease- active, silent, latent, potencial. *Gut*. 1993;34:150–1.
- Kutlu T, Brousse N, Rambaud C, Le Deist F, Schmitz J, Cerf-Bennussan N. Numbers of T cell receptor (TCR) alpha beta+ but not of TcR gamma delta+ intraepithelial lymphocytes correlate with the grade of villous atrophy in coeliac patients on a long term normal diet. *Gut*. 1993;34:208–14.
- Arranz E, Bode J, Kingstone K, Ferguson A. Intestinal antibody pattern of coeliac disease: association with y/I T cell receptor expression by intraepithelial lymphocytes, and other indices of potential coeliac disease. *Gut*. 1994;35:476–82.
- Eiras P, León F, Camarero C, Roy G. Los linfocitos intraepiteliales en el diagnóstico de la enfermedad celíaca latente-potencial. *Rev Clin Esp*. 2002;202:497–9.
- Eiras P, Roldán E, Camarero C, Olivares F, Bootello A, Roy G. Flow cytometry description of a novel CD3-CD7+ intraepithelial subset in human duodenal biopsies: Potencial diagnostic value in coeliac disease. *Cytometry*. 1998;34:95–102.
- Eiras P, León F, Camarero C, Lombardia M, Roldán E, Bootello A, et al. Intestinal Intraepithelial Lymphocytes contain a CD3-CD7+ subset expressing natural killer markers and a singular pattern of adhesion molecules. *Scand J Immunol*. 2000;52:1–6.
- León F, Eiras P, Camarero C, Roldán E, Sánchez L, R-Pena R, et al. Avances en el diagnóstico de la enfermedad celíaca: anticuerpos antitransglutaminasa y linfocitos intraepiteliales intestinales. *Gastroenterol Hepatol*. 2002;25:416–22.
- Camarero C, Eiras P, Asensio A, León F, Olivares F, Escobar H, et al. Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease: per-

- manent changes in CD3-/CD7+ and T cell receptor $\gamma\delta$ subsets studied by flow cytometry. *Acta Paediatr.* 2000;89:285–90.
23. Madrigal L, Lynch S, Feighery C, Weir D, Lelleher D, O'Farrelly CJ. Flow cytometry analysis of surface major histocompatibility complex class II expression on human epithelial cells prepared from small intestinal biopsies. *Immunol Meth.* 1993;158:207–14.
 24. Branski D, Troncone R. Celiac disease: A reappraisal. *J Pediatr.* 1998;133:181–7.
 25. Achkar E, Carey WD, Petras R, Sivak MV, Revta R. Comparison of suction capsule and endoscopy biopsy of small bowel mucosa. *Gastrointestinal endosc.* 1986;32:278–81.
 26. Mavromichalis J, Brueton MJ, McNeish AS, Anderson CM. Evaluation of the intraepithelial lymphocyte count in the jejunum in childhood enteropathies. *Gut.* 1976;17:600–3.
 27. Olivencia P, Cano A, Martín MA, León F, Roy G, Redondo C. Enfermedad celiaca del adulto y linfocitos intraepiteliales. ¿Nuevas opciones para el diagnóstico? *Gastroenterol Hepatol.* 2008;31:555–9.
 28. Kokkonen J, Hela K, Karttunen TJ, Maki M. Children with untreated food allergy Express a relative increment in the density of duodenal $\gamma\delta$ T cells. *Scand J Gastroenterol.* 2000;35:1137–42.
 29. Phillips AD, Rice SJ, France NE, Walter-Smith JA. Small intestinal intraepithelial lymphocytes levels in cow's milk protein intolerance. *Gut.* 1979;20:509–12.
 30. Camarero C, León F, Sánchez L, Asensio A, Roy G. Age-related variation of Intraepithelial lymphocytes subsets in normal human duodenal mucosa. *Dig Dis Sci.* 2007;52:685–91.
 31. Spencer JO, Macdonal TT, Diss TC, Walter-Smith JA, Ciclitira PJ, Isaacson PG. Changes in intraepithelial lymphocytes subpopulations in coeliac disease and enteropathy associates T cell lymphoma (malignant histiocytosis of the intestine). *Gut.* 1989;30:339–46.