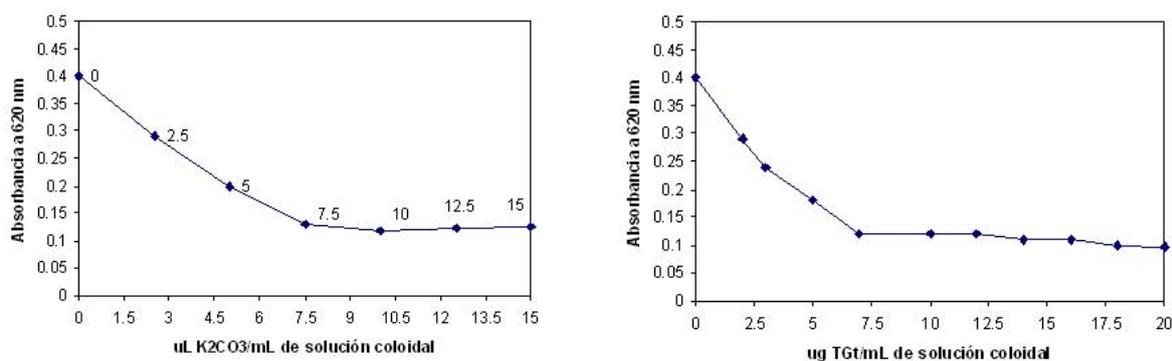


RESULTADOS

Desarrollo del ensayo inmunocromatográfico para la detección de anticuerpos anti-transglutaminasa

Preparación del conjugado transglutaminasa-oro coloidal: pH del coloide y cantidad mínima protectora de transglutaminasa: Los experimentos realizados para determinar el pH del coloide de oro, y la cantidad mínima de TGt protectora del coloide, permitieron establecer que la solución de oro coloidal quedaba completamente protegida de la floculación al añadir volúmenes entre 7.5 y 15.0 μL de K_2CO_3 0.1 mol/L por cada mililitro de la solución coloidal, lo que se corresponde con valores de pH entre 7.0 y 10.0; a cantidades de TGt entre 8 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de coloide, como se muestra en la Figura 4. Por consiguiente, se escogieron como parámetros de la conjugación, por cada mililitro de la solución coloidal: 10 μL de K_2CO_3 0.1 mol/L, que se corresponde con un valor de pH de 7.5; y 10 μg de TGt como cantidad protectora.

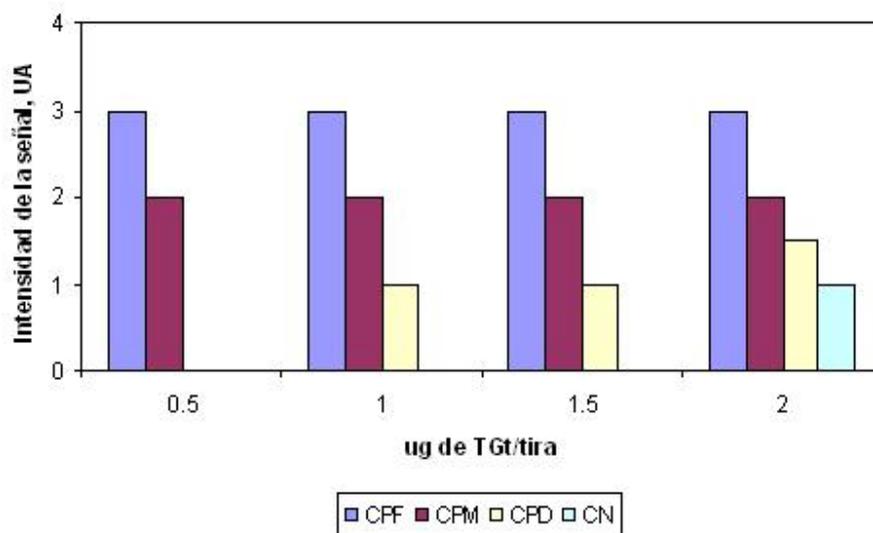
Figura 4. Condiciones óptimas de conjugación de la transglutaminasa tisular a las partículas de oro coloidal (40 nm) con aumento de la fuerza iónica. *Izquierda:* Volúmenes de K_2CO_3 0.1 mol/L por cada mililitro de coloide. *Derecha:* Cantidad de transglutaminasa tisular por cada mililitro de coloide a pH 7.5. Para más detalles: Consulte la Sección “Material y Método” de este trabajo.



Titulación de la cantidad de TGt para el recubrimiento de las tiras reactivas: Luego de establecer las condiciones de la preparación del conjugado de TGt-oro coloidal, se procedió a determinar la mejor cantidad de TGt a incluir en el recubrimiento de la tira de nitrocelulosa. Basados en los resultados de los experimentos completados, se escogió 1 μg de TGt por tira. Como puede apreciarse en la Figura 5, luego de 20 minutos de corrida cromatográfica, para las tiras recubiertas con 0.5 μg de TGt aparece una señal distinguible con los controles CPF y CPM, pero no hay señal visible con el CPD, y no se obtiene señal con el CN.

Con las tiras recubiertas a 1.0 y 1.5 μg de TGt se obtuvo un comportamiento similar. Con las tiras recubiertas con estas cantidades de la proteína, se detectaron los controles CPF y CPM. El CPD es visible a los 20 minutos sin ninguna dificultad. Con el CN no aparece señal visible. Por el contrario, con las tiras recubiertas con 2 μg de TGt se observaron señales con todos los controles ensayados, incluyendo el CN.

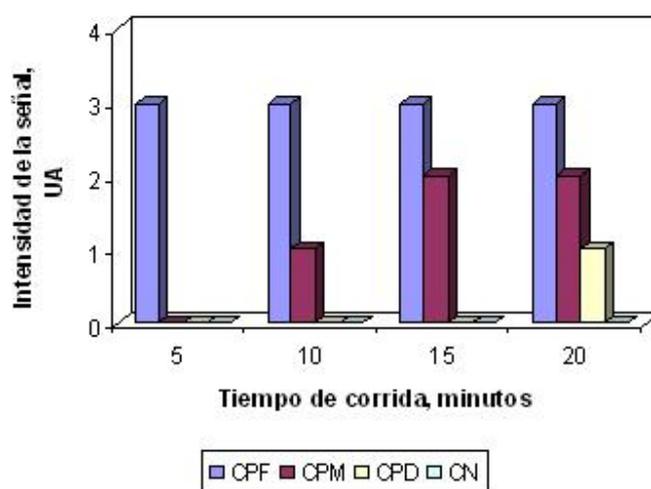
Figura 5. Determinación de la concentración óptima de transglutaminasa tisular para el recubrimiento de la tira reactiva. Se recurrió a una escala análogo-visual para medir la relación entre la concentración de la proteína y la intensidad de la señal obtenida: *Señal fuertemente visible*: 3 UA; *Señal medianamente visible*: 2 UA; *Señal débilmente visible*: 1 UA; y Ausencia de señal: 0. Las muestras se aplicaron por duplicado. El experimento se repitió 3 veces consecutivas. La inspección visual fue hecha siempre por los mismos 2 observadores. Tiempo de corrida: 20 minutos.



Leyenda: CPF: Control Positivo Fuerte; CPM: Control Positivo Medio; CPD: Control Positivo Débil; CN: Control Negativo.

Establecimiento del tiempo de corrida: El experimento realizado para determinar este parámetro permitió confirmar que el tiempo factible de corrida es de 20 minutos para lograr una correcta detección de las muestras con una señal baja. La Figura 6 muestra los resultados del experimento. A los cinco minutos solo se detectó el CPF. Entre los 10 y 15 minutos se detectó, además del CPF, el CPM. A los 20 minutos, las señales de los controles CPF, CPM y CPD se hicieron francamente visibles. En los tiempos ensayados no se observó señal con el CN.

Figura 6. Determinación del tiempo de corrida inmunocromatográfica. Se recurrió a una escala análogo-visual para medir la relación entre la concentración de la proteína y la intensidad de la señal obtenida: *Señal fuertemente visible*: 3 UA; *Señal medianamente visible*: 2 UA; *Señal débilmente visible*: 1 UA; y Ausencia de señal: 0. Las muestras se aplicaron por duplicado. El experimento se repitió 3 veces consecutivas. La inspección visual fue hecha siempre por los mismos 2 observadores.



Leyenda: CPF: Control Positivo Fuerte; CPM: Control Positivo Medio; CPD: Control Positivo Débil; CN: Control Negativo.

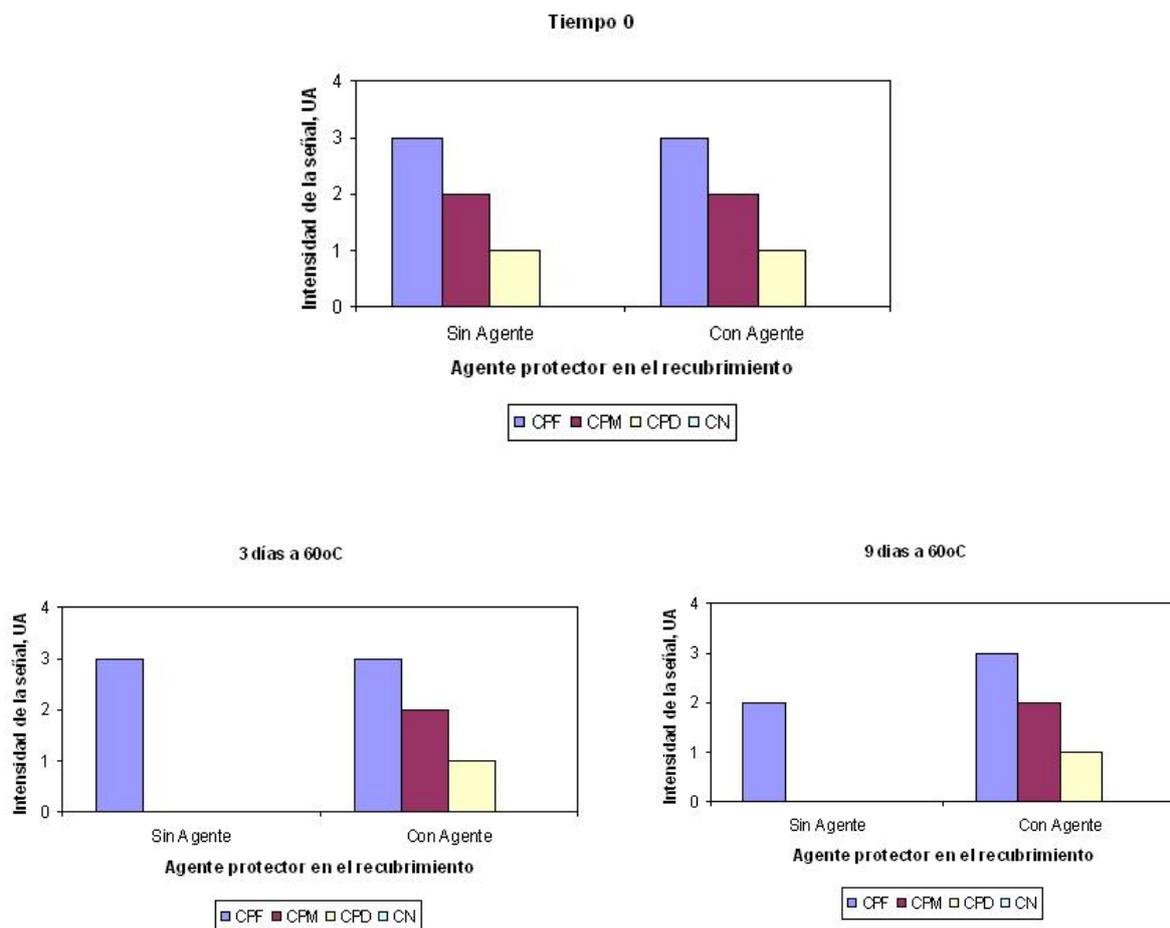
Estudio de estabilidad acelerada del recubrimiento a 60°C: Con el objetivo de conocer *a priori* cuál (cuáles) de los componentes del prototipo de sistema pueden resultar más inestables en el tiempo, éste se sometió a un estrés térmico para así simular el envejecimiento en tiempo real. El recubrimiento de la tira reactiva con el conjugado resultó el elemento inestable del prototipo de sistema. Se arribó a esta conclusión porque cuando en la tira sometida al estrés térmico se utilizó un conjugado conservado a TA (20 – 25°C), no se observó señal con ninguno de los controles positivos. En cambio, cuando este conjugado (una vez retirado de las tiras sometidas al estrés térmico) se utilizó en tiras inmunocromatográficas conservadas a TA (20 – 25°C), se observó la señal esperada con los controles positivos, y ausencia de señal con el CN.

La Figura 7 muestra los resultados de los estudios de estabilidad acelerada a 60°C. La formulación empleada inicialmente en el recubrimiento no garantizó la estabilidad de la proteína: a los tres días del estudio a 60°C el sistema no era capaz de detectar los controles CPM ni CPD. La formulación del tampón de recubrimiento fue modificada convenientemente, y se identificó un componente carbohidrato que funcionó como agente protector, y permitió así garantizar la estabilidad del prototipo del sistema durante nueve días a 60°C.

Hechas estas modificaciones, en todas las tiras se pudo observar la señal en la línea control del ensayo; y el total desprendimiento del conjugado de su matriz liberadora al desarmar el

casete. También se comprobó la ausencia de señal inespecífica alguna con el control CN en la línea de captura.

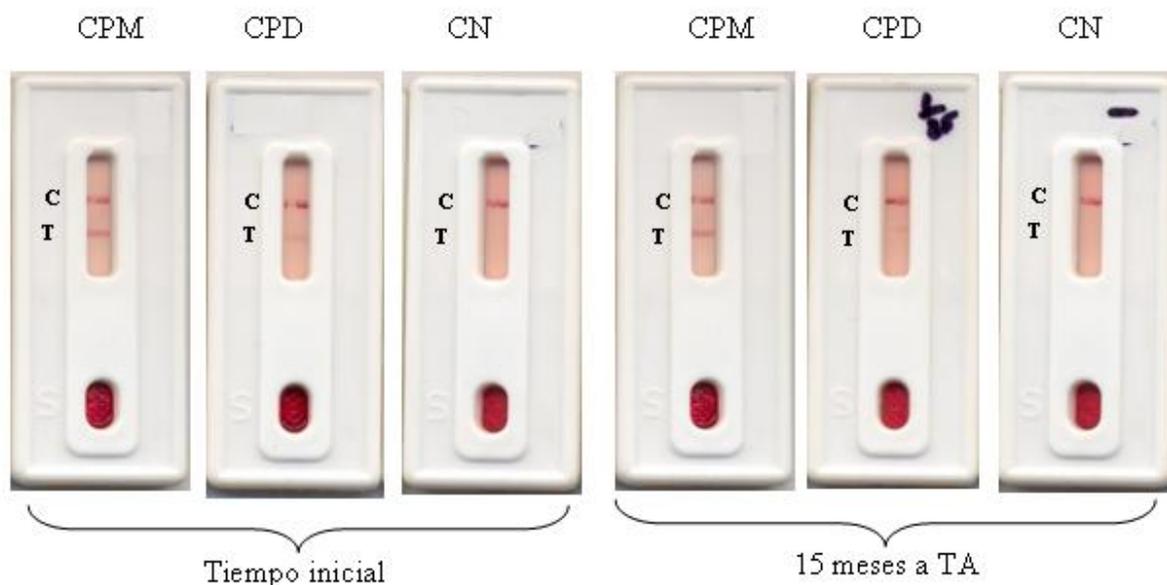
Figura 7. Estudio de estabilidad acelerada del sistema inmunocromatográfico a 60°C, en presencia/ausencia del agente protector en el recubrimiento. Se recurrió a una escala análogo-visual para medir la relación entre la concentración de la proteína y la intensidad de la señal obtenida: *Señal fuertemente visible*: 3 UA; *Señal medianamente visible*: 2 UA; *Señal débilmente visible*: 1 UA; y Ausencia de señal: 0. Las muestras se aplicaron por duplicado. El experimento se repitió 3 veces consecutivas. La inspección visual fue hecha siempre por los mismos 2 observadores. Tiempo de corrida: 20 minutos.



Leyenda: CPF: Control Positivo Fuerte; CPM: Control Positivo Medio; CPD: Control Positivo Débil; CN: Control Negativo.

Estudio de estabilidad en tiempo real y a temperatura ambiente del sistema inmunocromatográfico: Para verificar si realmente el prototipo de sistema desarrollado era estable en su conjunto, se procedió a realizar un experimento de estabilidad en tiempo real, a temperatura ambiente (20 – 25°C). La Figura 8 muestra los resultados del experimento. Se comprobó que, durante los 15 meses de estudio de estabilidad, el sistema era capaz de detectar a los 20 minutos los controles CPM y CPD sin que apareciera señal visible con el CN. En todas las tiras se pudo observar la señal en la línea control del ensayo, y al desarmar el casete también se comprobó el total desprendimiento del conjugado de su matriz liberadora.

Figura 8. Estudio de estabilidad en tiempo real, a temperatura ambiente, del prototipo de sistema inmunocromatográfico. Las muestras se aplicaron por duplicado. La inspección visual de los resultados fue hecha siempre por los mismos 2 observadores.



Leyenda: CPF: Control Positivo Fuerte; CPM: Control Positivo Medio; CPD: Control Positivo Débil; CN: Control Negativo. C: Línea control; T: Línea específica.

Estudio de las características operacionales del sistema inmunocromatográfico: Para verificar el desempeño del prototipo de sistema desarrollado, se ensayaron con el mismo muestras de suero de 50 pacientes celíacos no tratados, diagnosticados según los criterios de la ESPGAN. Se comprobó que el ensayo devolvió resultados positivos en los 50 pacientes, para una sensibilidad del 100.0% (IC 95%: 92.9 – 100.0%).

Estas mismas muestras fueron ensayadas indistintamente con el método ELISA comercial Celikey (Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania) para las clases IgA e IgG de los AATGt, y con otro método para la detección por inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos IgA contra endomisio de mono (BioSystem, Barcelona, España). De las 50 muestras ensayadas, 47 fueron AATGt-IgA/IgG-positivas (Sensibilidad: 94.0%; IC 95%: 88.2 – 98.4%); mientras que 48 lo fueron para los anticuerpos endomisio (Sensibilidad: 96%; IC 95%: 89.1 – 99.0%). Las

diferencias observadas entre los estimados de sensibilidad no fueron significativas ($p > 0.05$; test de homogeneidad basado en tablas 2 x 2 de contingencia).

El ensayo de las muestras obtenidas de 40 pacientes que presentaban desórdenes intestinales, y en los que la presencia de EC fue desechada después de biopsia de yeyuno, devolvió resultados negativos con los 3 sistemas de determinación: Especificidad: 100% (IC 95%: 91.2 – 100.0%).

Rendimiento del sistema inmunocromatográfico con muestras de sangre, suero y plasma: Para comprobar si era posible el ensayo de muestras de sangre, suero o plasma con el sistema inmunocromatográfico desarrollado y descrito en este trabajo, se estudiaron muestras de 25 pacientes diagnosticados con EC después de biopsia de yeyuno. La Tabla 6 muestra los resultados obtenidos. Todos los enfermos resultaron AATGt-positivos mediante el método inmunocromatográfico independientemente del tipo de muestra empleado en la determinación serológica.

De los 200 individuos aparentemente sanos estudiados en ocasión de un chequeo laboral, 199 de ellos resultaron negativos por cualquiera de los métodos empleados, inmunocromatográfico o ELISA, sin que el tipo de muestra influyera en el resultado final.

Se debe destacar que uno de los sujetos aparentemente sanos resultó positivo para los AATGt, independientemente del método o el tipo de muestra ensayada. Se comprobó, además, que esta persona tenía valores de 100 g/L de hemoglobina, consistente con una anemia por déficit de hierro durante el análisis médico de rutina. Mediante la biopsia de yeyuno se detectó una atrofia parcial de las vellosidades intestinales con un marcado incremento de los linfocitos intraepiteliales, cambios morfológicos compatibles con el diagnóstico de EC. Además, en este sujeto se comprobó la presencia de los 2 alelos HLA-DQA1*0501 y HLA-DQB1*02, que conforman el heterodímero DQ2, y que están asociados a la predisposición genética de padecer la EC. En base a estos resultados, el sujeto se clasificó como celíaco, y se instituyó inmediatamente una dieta libre de gluten. Pasado un año del diagnóstico, se comprobó la negativización del marcador serológico en muestras de sangre, suero, o plasma; mejoría clínica, valores de 120 g/L de hemoglobina; y la recuperación de la arquitectura normal de la mucosa yeyunal.

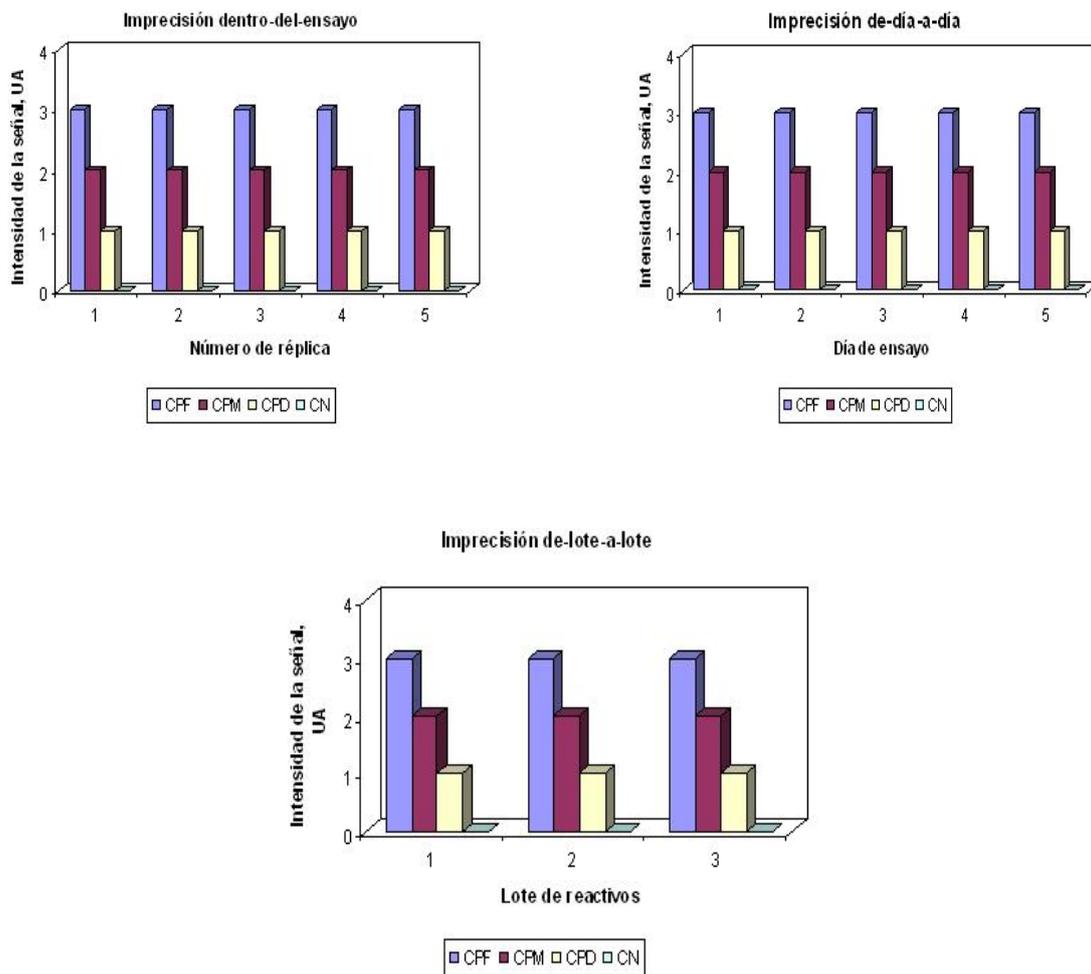
Tabla 6. Desempeño del sistema inmunocromatográfico en el ensayo de muestras de sangre, suero y plasma. Para más detalles: Consulte la sección “Resultados” de este ensayo.

| Sistema inmunocromatográfico | Tamaño | AATGt | Sangre | Suero | Plasma |
|---------------------------------|--------|-----------|--------|-------|--------|
| Pacientes celíacos, no tratados | 25 | Positivos | 25* | 25* | 25* |
| | | Negativos | 0 | 0 | 0 |
| Individuos aparentemente sanos | 200 | Positivos | 1* | 1* | 1* |
| | | Negativos | 199 | 199 | 199 |

Leyenda: El asterisco (“*”) designa los casos confirmados por biopsia de yeyuno.

Estado de la imprecisión del sistema inmunocromatográfico: La Figura 9 muestra los estimados de los distintos componentes de la imprecisión analítica del sistema inmunocromatográfico para la determinación de los AATGt. Se comprobó un rendimiento satisfactorio de réplica a réplica, dentro del día; de día a día; y de lote a lote. De esta manera, se demostró la elevada precisión del ensayo inmunocromatográfico desarrollado y descrito en este trabajo para la determinación de los AATGt.

Figura 9. Estado de la imprecisión analítica del sistema inmunocromatográfico para la determinación de los anticuerpos anti-transglutaminasa. **Panel superior:** *Izquierda:* Repetibilidad. La corrida cromatográfica se realizó con cinco réplicas de 100 μ L de muestra de cada uno de los controles del ensayo en el mismo día de trabajo. *Derecha:* Reproducibilidad. La corrida cromatográfica se realizó por duplicado con 100 μ L de muestra de cada uno de los controles del ensayo durante cinco días consecutivos. **Panel inferior:** Imprecisión de-lote-a-lote: La corrida cromatográfica se realizó por duplicado con 100 μ L de muestra de cada uno de los controles del ensayo. La inspección visual de los resultados fue hecha siempre por los 2 mismos observadores.



Legenda: CPF: Control Positivo Fuerte; CPM: Control Positivo Medio; CPD: Control Positivo Débil; y CN: Control Negativo.

Comparación del sistema inmunocromatográfico contra otros similares: El sistema inmunocromatográfico desarrollado y descrito en este trabajo fue capaz de detectar la presencia de los AATGt en las 22 muestras en las que se encontraron AATGt IgA y/o IgG mediante los sistemas ELISA Celikey (Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania). La sensibilidad estimada fue del 100% (IC 95%: 97.7 – 100.0%). La Tabla 7 muestra los resultados de la comparación de los métodos para la determinación de los AATGt. Con estas mismas muestras, el sistema CD1+2 anti-TGt (Operon, España) detectó correctamente 21 de las muestras, para una sensibilidad del 95.5% (IC 95%: 84.4 – 100.0%); mientras que el sistema CD1 anti-TGt (Operon, España) solo detectó 20 muestras, para una sensibilidad del 90.9% (IC 95%: 76.6 – 100.0%). Por su parte, la especificidad de los sistemas comparados después del ensayo de las 22 muestras AATGt-negativas fue como sigue: Sistema inmunocromatográfico: 95.5% (IC 95%: 84.5 – 100.0%); Sistema CD1+2 anti-TGt: 90.9% (IC 95%: 76.6 + 100.0%); y Sistema CD1 anti-TGt: 100% (IC 95%: 97.7 – 100.0%); respectivamente.

Tabla 7. Comparación de los resultados del sistema inmunocromatográfico con otros similares. Se emplearon 22 muestras AATGt-positivas, y otras 22 AATGt-negativas. El *status* serológico de las muestras se determinó mediante un sistema ELISA Celikey (Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania). Entre corchetes, se muestran los intervalos al 95% de confianza de los estimados de Sensibilidad y Especificidad. Para más detalles: Consulte la sección “Resultados” de este trabajo.

| | Sistema inmunocromatográfico | Sistema CD1 | Sistema CD1+2 |
|-----------------------------|---------------------------------|-------------------------|------------------------|
| Sensibilidad, % | 100.0 [97.7 – 100.0] | 90.9 [76.6 – 100.0] | 95.5 [84.5 – 100.0] |
| Especificidad, % | 95.5 [84.5 – 100.0] | 100.0 [97.7 – 100.0] | 90.9 [76.6 – 100.0] |
| Concordancia ^(a) | 0.95 ^(b) | 0.86 ^(b) | 0.90 ^(b) |
| VPP ^(c) , % | 95.7 | 100.0 | 91.7 |
| VPN ^(d) , % | 100.0 | 91.7 | 95.7 |

^a Test de kappa

^b $p_{\text{kappa}} < 0.05$

^c Valor predictivo positivo

^d Valor predictivo negativo

La concordancia entre los resultados del sistema inmunocromatográfico y los sistemas objeto de comparación fue como sigue: *vs. Estuche Celikey* (Pharmacia & Upjohn, Freiburg, Alemania): 0.95 ($p_{\text{kappa}} < 0.05$); *vs. Sistema CD1 anti-TG*: 0.86 ($p_{\text{kappa}} < 0.05$); y *vs. Sistema CD1+2 anti-TG*: 0.90 ($p_{\text{kappa}} < 0.05$); respectivamente.

El uso del sistema inmunocromatográfico en los laboratorios del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (España) reportó resultados similares a los expuestos (datos no mostrados).

Utilidad del uso del sistema inmunocromatográfico en grupos de riesgo y población sana

Pacientes con trastornos gastrointestinales: De los 637 pacientes con síntomas gastrointestinales, presencia de AAG, y que reunían criterios para la realización de una biopsia yeyunal confirmatoria, solo 88 (13.8%) de ellos presentaron AATGt. Hasta el momento de la terminación de este trabajo, se había realizado una biopsia de yeyuno en 57 de los pacientes AATGt-positivos. En 56 de ellos se observó un patrón histológico compatible con la EC. La prevalencia de EC, estimada de la presencia de AATGt y confirmada posteriormente mediante la biopsia yeyunal, fue del 8.8%

Respecto del paciente número 57, no se pudo demostrar que el aspecto de la mucosa yeyunal fuera el propio de la EC. Se ha de destacar que en este paciente se realizó una segunda biopsia cuyo resultado fue también negativo de la presencia de EC. Adicionalmente, no se pudieron detectar en él los alelos de riesgo para la EC.

Pacientes con giardiasis: Según los resultados de la biopsia de yeyuno, 40 pacientes diagnosticados con giardiasis se distribuyeron de la manera siguiente: *Aspecto normal de la mucosa yeyunal:* 37 (92.5%); y *Presencia de alteraciones del patrón histológico:* 3 (7.5%). Las alteraciones observadas en la mucosa yeyunal de estos 3 pacientes incluían atrofia vellositaria subtotal y presencia de linfocitosis intraepitelial, hallazgos compatibles con el diagnóstico de EC. Sin embargo, la gravedad de las lesiones fue similar en los 3 pacientes, lo que impidió el diagnóstico diferencial histológico.

Los resultados de la determinación de los AAG fue como sigue: *Pacientes sin cambios en la mucosa yeyunal:* 7 (Falsos positivos: 18.9%; Especificidad: 81.1%); *Pacientes con cambios en la mucosa yeyunal:* 3 (Sensibilidad: 100.0%).

Los AATGt se determinaron en estos pacientes indistintamente mediante el sistema inmunocromatográfico desarrollado y descrito en este trabajo, y un segundo método ELISA. No se encontraron AATGt en ninguno de los pacientes con una mucosa yeyunal de aspecto normal.

Tabla 8. Comportamiento del sistema inmunocromatográfico para la determinación de anticuerpos antitransglutaminasa en pacientes con giardiasis.

| Mucosa yeyunal | Tamaño | AAG | AATGt |
|---|--------|-----|-------|
| De aspecto normal | 37 | 7 | 0 |
| Atrofia vellositaria subtotal + Linfocitosis intraepitelial | 10 | 3 | 2 |
| Totales | | 10 | 2 |

Se observaron AATGt en 2 de los 3 pacientes con atrofia vellositaria subtotal y linfocitosis intraepitelial. En vista del aspecto de la mucosa yeyunal y la presencia de AATGt, estos pacientes fueron tenidos como sospechosos de EC, y en consecuencia, se les prescribió una DLG, conjuntamente con el tratamiento anti-giardiasis específico. La sintomatología clínica mejoró notablemente en el año siguiente de seguimiento y evaluación. El diagnóstico de EC se confirmó ante la restauración de la arquitectura propia de la mucosa yeyunal en ocasión de la biopsia hecha cumplidos los 12 meses del diagnóstico inicial, y la desaparición de los AATGt, en concordancia con los criterios revisados de la ESPGAN.¹⁴

No se detectaron AATGt en el tercero de los pacientes con cambios en la mucosa yeyunal. Por ello, se le prescribió un anti-giardiasis (SECNIDAZOL: 30 mg/Kg de peso/24 horas), y no

se restringió el contenido de gluten de la dieta. Tras 12 meses de seguimiento, se observó recuperación del aspecto normal de la mucosa yeyunal después de una segunda biopsia. Tampoco se detectaron AATGt en este momento.

Pacientes con Diabetes mellitus dependiente de insulina: Se observaron AATGt en 14 (6.7%) de 208 pacientes con DMT1. Solo 2 de estos 14 pacientes presentaban síntomas clínicos asociados clásicamente a la EC, como el dolor abdominal, la diarrea y la anorexia.

El estudio histopatológico de la mucosa yeyunal mediante la correspondiente biopsia se completó en solo 6 de ellos que consintieron en la realización del proceder. En todos ellos se observaron cambios morfológicos en la mucosa yeyunal consistente con EC, como aumento de los linfocitos intraepiteliales (6), atrofia vellositaria parcial (5), y atrofia subtotal (1). En base a estos resultados, la prevalencia de EC en la DMT1 estimada mediante los AATGt y confirmada por la correspondiente biopsia, fue del 2.9%.

Los 6 pacientes DMT1 diagnosticados de EC se distribuyeron según el momento del debut de la comorbilidad: *En ocasión del diagnóstico de la DMT1:* 4; y *Tardíamente, entre 2 – 10 años del diagnóstico de la DMT1:* 2. Se debe señalar que 2 de los 4 pacientes diagnosticados tempranamente de EC presentaban los síntomas sugestivos de la comorbilidad (dolor abdominal, diarrea y anorexia). Por el contrario, ninguno de los 2 pacientes diabéticos diagnosticados tardíamente de EC mostraba síntoma sugestivo alguno.

Pacientes con síndrome de Down y Tiroiditis autoinmune: Se detectaron AATGt solo en 6 (2.2%) de los 263 pacientes con síndrome de Down estudiados en este trabajo. Se debe hacer notar que 63 (23.9%) habían resultado ser AAG-positivos.

En el caso de la Tiroiditis autoinmune, solo 3 (3.0%) de los 100 pacientes estudiados fueron AATGt-positivos. La determinación de los AAG había sido positiva en 13 (13.0%) de ellos.

Adultos sanos: Los adultos sanos se estudiaron en ocasión de un chequeo laboral, como se ha descrito más arriba. Se debe destacar que mediante el sistema inmunocromatográfico desarrollado se identificó un enfermo celíaco cuya síntoma predominante era la anemia ferripriva, y en el que se confirmó la enfermedad mediante la biopsia del yeyuno. La respuesta a la DLG fue satisfactoria.

Niños sanos: Como parte de los procedimientos de este trabajo, se determinaron los AATGt en 595 niños supuestamente sanos mediante 3 sistemas analíticos diferentes. Se detectaron AATGt en 7 (1.2%) de los niños tanto por el sistema inmunocromatográfico, como por el sistema ELISA *Celikey IgG* (Celikey Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania). En cambio, solo 5 niños resultaron AATGt-positivos por el sistema ELISA *Celikey IgA* (Celikey Pharmacia & Upjohn, Diagnostics AB, Freiburg, Alemania). Se debe destacar que 2 de estos niños también resultaron positivos por el sistema inmunocromatográfico y el ELISA *Celikey IgG*.

Concordancia entre el sistema inmunocromatográfico y la biopsia de yeyuno: La Tabla 9 muestra la concordancia entre los resultados del sistema inmunocromatográfico desarrollado y descrito en este trabajo, y la biopsia yeyunal. Para ello, se acumularon los resultados observados con estos métodos diagnósticos en los pacientes examinados en las diferentes categorías descritas: *Manifestaciones gastrointestinales:* 57; *Giardiasis:* 40; y *DMT1:* 6; respectivamente.

Tabla 8. Concordancia entre los resultados del sistema inmunocromatográfico para la determinación de los anticuerpos antitransglutaminasa y la biopsia de yeyuno. La concordancia estimada fue de 0.98 ($p_{\text{kappa}} < 0.05$).

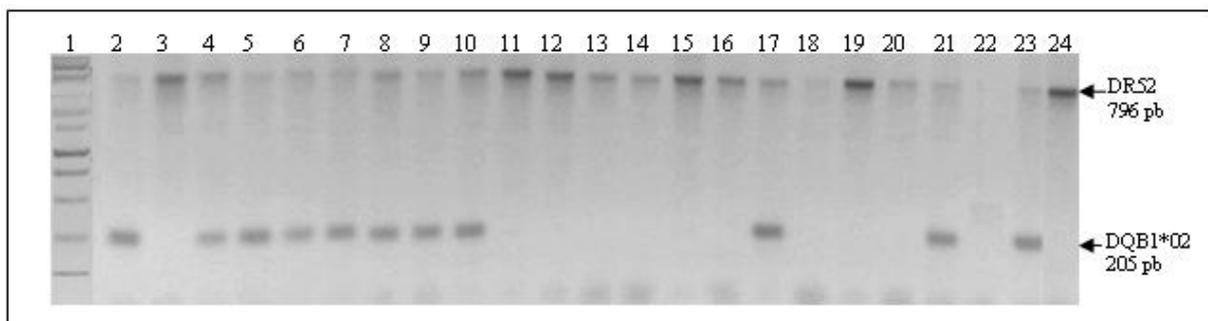
| Grupo | Número | Biopsia + AATGt + | Biopsia – AATGt + | Biopsia – AATGt – |
|----------------------|--------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Síntomas clínicos | 57 | 56 | 1 | 0 |
| Giardiasis | 40 | 2 | 0 | 38 |
| Diabetes mellitus T1 | 6 | 6 | 0 | 0 |
| Totales | 103 | 64 | 1 | 38 |

Leyenda: AATGt: Anticuerpos antitransglutaminasa.

De los 103 pacientes estudiados, 65 (63.1%) mostraron AATGt. Por su parte, la biopsia de yeyuno reveló cambios en la mucosa compatibles con la EC en 64 (62.1%) de ellos. Se observaron AATGt junto con cambios en la mucosa yeyunal en 64 de los enfermos estudiados. Asimismo, no se observaron AATGt en 38 pacientes con una mucosa de aspecto normal. El índice de concordancia entre los resultados de ambos métodos fue de 0.98 ($p_{\text{kappa}} < 0.05$); lo que se considera como un grado de acuerdo casi perfecto.¹⁸¹

Estudio de los genes asociados a la enfermedad celíaca en pacientes con EC y familiares de primer grado: Los genes asociados a la EC fueron estudiados tanto en enfermos como familiares de primer grado. La Figura 10 expone el resultado de la electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de la reacción en cadena de la enzima polimerasa con los cebadores del alelo DQB1*02 del HLA-DQ2 en muestras de sangre de pacientes y controles.

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de la reacción en cadena de la enzima polimerasa del alelo DQB1*02 del HLA-DQ2 en muestras de sangre de pacientes y controles. *Línea 1:* Patrón de peso molecular 100 bp DNA “step leader” (1500-100 pb). *Líneas 2-21:* Muestras. *Línea 22:* Control negativo PCR. *Línea 23:* Muestra de control positivo. *Línea 24:* Muestra de control negativo. DR52 humano: control interno de la reacción.



Leyenda: pb: pares de bases.

La presencia del heterodímero HLA-DQ2 fue superior en los pacientes diagnosticados de la enfermedad: Celíacos: 86.3% vs. Sanos: 20.0% (test de homogeneidad: $p < 0.05$; Razón de disparidades: 4.32; IC 95%: 9.0 – 5.54; $p < 0.05$). La proporción de los alelos del HLADQ2 también fue mayor en los pacientes diagnosticados de EC: *DQA1*0501*: Enfermos: 86.3% vs. Sanos: 56.6% ($p > 0.05$); y *DQB1*02*: Enfermos: 90.2% vs. Sanos: 45.0% ($p > 0.05$); respectivamente; pero las diferencias no tuvieron fuerza estadística.

Tabla 9. Determinación de los alelos HLA-DQA1*0501 y DQB1*02 del heterodímero HLA-DQ2 en pacientes celíacos, familiares de primer grado, y sujetos sanos que actuaron como controles. Para más detalles: Consulte la sección “Resultados” de este trabajo.

| Categoría | Tamaño | Alelos | | Heterodímero HLA-DQ2 + |
|----------------------------|--------|--------------|--------------|--|
| | | DQA1*0501 | DQB1*02 | |
| Pacientes celíacos | 22 | 19 [86.3] | 20 [90.2] | 19 ^a [86.3] RP: 4.32 (IC 95%: 0.90 – 5.54) |
| Familiares de primer grado | 54 | 38 [70.0] | 48 [90.0] | 38 ^a [70.3] RP: 3.52 (IC 95%: 1.35 – 5.99) |
| Controles | 60 | 34 [56.6] | 27 [45.0] | 12 [20.0] |

Leyenda: ^a: Valores de p en la comparación contra los controles.

La proporción del heterodímero HLA-DQ2 fue también superior en los familiares de primer grado de los pacientes celíacos: *Familiares de primer grado*: 70.3% vs. *Sanos*: 20.0% (test de homogeneidad: $p < 0.5$; Razón de disparidades: 3.52; IC 95%: 1.35 – 5.99). Se debe destacar que un familiar de primer grado solo presentó el alelo DQB1*02.

En cuanto al heterodímero HLA-DQ8 (*DQA1*0301*, *DQB1*0302*), solo uno (de los 22 pacientes genotipados) resultó positivo para las 2 cadenas, mientras que otro solo fue positivo para el alelo *DQA1*03* de este gen (datos no mostrados).

Asociación entre los heterodímeros HLA-DQ2/HLA-DQ8 y los anticuerpos antitransglutaminasa: La Tabla 10 presenta los resultados de la asociación entre la presencia del heterodímero HLA-DQ2 y los AATGt. La respuesta del sistema inmunocromatográfico cuando se aplicó a las muestras de los pacientes celíacos fue dependiente del tratamiento dietético implementado. Se detectaron AATGt en 18 (81.8%) de los 22 pacientes celíacos. Diecisiete de ellos resultaron positivos para ambos alelos del HLA-DQ2. El paciente restante resultó positivo solamente para el alelo *DQA1*03* del HLA-DQ8.

Los 4 enfermos celíacos AATGt-negativos se encontraban sujetos a una DLG en el momento del examen serológico. De estos 4 pacientes, dos de ellos mostraron ambos alelos del HLA-DQ2. El tercero de los enfermos fue positivo solo para el alelo *DQB1*02* del HLA DQ2. Finalmente, el cuarto de los pacientes AATGt-negativos presentaba los alelos *DQA1*0301* y *DQB1*0302* del heterodímero HLA-DQ8.

Tabla 10. Asociación entre los heterodímeros HLA DQ2/DQ8 y los anticuerpos antitransglutaminasa. El genotipaje HLA no se realizó en los familiares de primer grado con resultados negativos del marcador serológico.

| Categoría | Tamaño | AATGt | Alelos | | Heterodímero HLA-DQ2 + |
|-------------------------------|--------|---------------------|-----------|-----------------|---------------------------|
| | | | DQA1*0501 | DQB1*02 | |
| Pacientes | 22 | AATGt- Positivos | 18 | 17 | 17 |
| | | AATGt- Negativos | 4 | 2 | 3 |
| Familiares de primer grado | 54 | AATGt- Positivos | 10 | 7 | 7 |
| | | AATGt- Negativos | 44 | No Realizado | No Realizado |

Finalmente, 10 (18.5%) de los familiares de primer grado resultaron positivos para los AATGt. De ellos, 7 presentaron ambos alelos del HLA-DQ2. En vista de los resultados obtenidos, se recomendó la realización de una biopsia yeyunal confirmativa de EC en ellos. En 5 de estos sujetos se encontraron cambios histomorfológicos compatibles con la EC. Todos los controles sanos resultaron negativos para los AATGt.