



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

IMPORTANCIA DE LOS LINFOCITOS  
INTRAEPITELIALES CD3-/CD7+ Y TcR *gamma*  
*delta*+ EN LA ENFERMEDAD CELIACA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO  
DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

KARINA ADAMES BEAS



MÉXICO, D. F.

Septiembre 2005

m. 347561



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

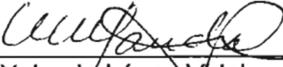
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Magdalena Acosta Segura  
Vocal: Prof. María Dolores Lastra Azpilicueta  
Secretario: Prof. Yolanda López Vidal  
1er sup. Prof. José Sulivan López González  
2do sup. Prof. Mónica Berenice Heras Chavarria

Sitio donde se desarrolló el tema:

Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Yolanda López Vidal  
Asesor

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal  
Supervisor Técnico

  
\_\_\_\_\_  
Karina Adames Beas  
Sustentante

---

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo y la asesoría brindados por la Dra. Yolanda López Vidal, así como también el tiempo, la dedicación y el apoyo de la Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal en la realización de esta tesis.

Agradezco al doctor Luis F. Uscanga del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición "Salvador Zubirán" por el estudio clínico y clasificación de los sujetos de estudio.

Agradezco el apoyo económico brindado por la beca PRONABES durante la realización de mis estudios de licenciatura, así como el apoyo de la beca PROBETEL durante el desarrollo de esta tesis.

---

## DEDICATORIAS

*A mis padres Alicia y Joaquín:*

Por ayudarme a alcanzar mi primer gran meta, por su cariño, apoyo, consejos y por darme lo más importante en la vida, su amor.

*A Lulú:*

Porque juntas hemos vivido angustias y alegrías, por su comprensión y paciencia. Hoy soy yo, pronto serás tú.

*A Daniel:*

Porque me diste un hombro para desahogarme, un brazo para apoyarme y la fuerza para salir adelante.

*A Rox:*

Por ser una excelente compañera, por su apoyo, por su ayuda, por su sinceridad y sobre todo por su gran amistad.

*A los chicos del laboratorio:*

Por hacer mis momentos difíciles, llevaderos, y porque más que compañeros han sido amigos.

*A Gonzalo, Mary, Mauricio C. y Mauricio R.:*

Por compartir sus conocimientos y experiencia conmigo.

## ÍNDICE

	Págs.
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<i>ii</i>
<b>DEDICATORIAS</b>	<i>iii</i>
<b>ÍNDICE</b>	<i>iv</i>
<b>ABREVIATURAS</b>	<i>vi</i>
<b>RESUMEN</b>	<i>vii</i>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1 Epidemiología	1
1.2 Manifestaciones clínicas	2
1.3 Diagnóstico	3
1.3.1 Pruebas diagnósticas	4
a) Serología	4
b) Histología	6
c) Tipificación del HLA	7
1.4 Patogénesis	7
a) Gluten	7
b) 33-mer	8
c) Moléculas MHC HLA-DQ2 y HLA-DQ8	9
d) Transglutaminasa tisular	10
1.4.1 Mecanismo	12
a) Lámina propia	12
b) Epitelio	13
1.4.2 Linfocitos intraepiteliales	15
a) Linfocitos intraepiteliales TcR $\gamma\delta$	16
b) Linfocitos intraepiteliales CD3 <sup>+</sup> /CD7 <sup>+</sup>	17
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	19
<b>3. OBJETIVOS</b>	20
3.1 Objetivo general	20

---

3.2 Objetivos particulares	20
<b>4. METODOLOGÍA</b>	<b>21</b>
4.1 Población	21
4.2 Criterios de selección	21
4.3 Pruebas rutinarias	22
4.4 Histopatología y subpoblaciones linfocitarias	24
4.5 Desagregación de tejido intestinal	24
4.6 Citometría de flujo	24
4.7 Estadística	25
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>26</b>
5.1 Histología	26
5.1.1 Control	26
5.1.2 Pacientes	26
5.2 Serología	28
5.2.1 Control	28
5.2.2 Pacientes	28
5.3 Análisis de subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo	30
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
6.1 Histología	35
6.2 Serología	36
6.3 Subpoblaciones linfocitarias	37
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>43</b>

---

## ABREVIATURAS

CF	Citometría de flujo
DTT	Ditiotreitol
EC	Enfermedad celíaca
EDTA	Ácido etilen diamino tetracético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
HLA	Antígeno leucocítico humano
IFN- $\gamma$	Interferon <i>gamma</i>
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks
LIE	Linfocitos intraepiteliales
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MICA	Gen A relacionado al MHC clase I
MICB	Gen B relacionado al MHC clase I
NK	Natural killer
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PE	Ficoeritrina
R-PE	R-Ficoeritrina
SAID	Síndrome de absorción intestinal deficiente
SFB	Suero fetal bovino
SPB	Sobrepoblación bacteriana
TcR	Receptor de células T
TNF	Factor de necrosis tumoral
tTG	Tansglutaminasa tisular

---

## RESUMEN

La enfermedad celiaca (EC) es una alteración inflamatoria crónica en la mucosa del intestino delgado, secundaria a la ingesta de la fracción proteica del gluten, que se encuentra en el trigo y otros granos; en individuos genéticamente predispuestos. El diagnóstico de EC se apoya en los cambios histológicos de la mucosa intestinal, así como en el incremento de marcadores serológicos dirigidos contra distintos antígenos, como la gliadina, el endomisio y la tTG, sin embargo no siempre son característicos, por lo que el diagnóstico se dificulta. Observaciones anteriores realizadas mediante Citometría de Flujo muestran que la EC se acompaña de la elevación de linfocitos intraepiteliales (LIE) en la mucosa intestinal con predominancia de LIE TcR $\gamma\delta^+$ , además de una disminución del fenotipo CD3/CD7 $^+$  por lo que la investigación de estas subpoblaciones apoya el diagnóstico de la patología intestinal.

En los resultados se muestra que la población de estudio estaba conformada por dos enfermedades EC y Sobrepopulación bacteriana (SBP) con características clínicas similares. Todos los sujetos de estudio presentaban un proceso inflamatorio en la mucosa duodenal evidenciado por la técnica de histoquímica. La determinación de anticuerpos IgA anti-tTG fue positiva sólo para el grupo de EC. En la determinación de LIE totales y del fenotipo CD3/CD7 $^+$ , no existió diferencia significativa en ninguno de los grupos con respecto al control. El porcentaje de los LIE TcR $\gamma\delta^+$  fue significativamente mayor en los grupos de EC y SPB con respecto al control, no así entre ellos.

Este trabajo contribuyó en la investigación hacia nuevas alternativas en el diagnóstico de EC. Además no sólo se observó el comportamiento linfocitario en esta enfermedad, sino también en SPB, que tiene características clínicas e histológicas similares. Sin embargo, la función de los LIE y de sus diferentes subpoblaciones aún es incierta, y el diagnóstico de EC sigue siendo difícil de establecer.

---

## 1. INTRODUCCION

La enfermedad celíaca (EC) es una alteración inflamatoria crónica en la mucosa del intestino delgado proximal, que se desarrolla posterior a la ingesta de la fracción proteica del gluten, de las proteínas análogas del centeno, de la cebada, y de la avena en individuos genéticamente predispuestos. Existen otros factores que pueden contribuir al desarrollo de EC como el amamantamiento, si el niño aún esta siendo amamantado cuando inicia su consumo de gluten se disminuye el riesgo a desarrollar EC<sup>1</sup>, así como también, el tiempo de inicio en el consumo de gluten, las infecciones virales y el cigarro.

### 1.1 Epidemiología

Con base en estudios serológicos se ha establecido que la EC es una de las patologías con base genética más común, con una prevalencia de 1 en 266<sup>2</sup> y las poblaciones con mayor número de casos se encuentran en el norte de Europa, existiendo reportes de una prevalencia similar en Estados Unidos, Sudamérica, Norte de Africa, Irán e India. En México aún no se ha desarrollado un estudio epidemiológico de esta enfermedad en la población general.

La frecuente ocurrencia intrafamiliar con la que se presenta la EC hizo pensar en una fuerte asociación con los genes del complejo principal de histocompatibilidad humano (HLA) comportándose estos como verdaderos marcadores de susceptibilidad genética a la enfermedad, ya que la mayoría de los pacientes celíacos expresan las moléculas HLA-DQ2 (90%) o HLA-DQ8 (<10%)<sup>3</sup>. Aunque estas moléculas están fuertemente asociadas a la EC no son suficientes para desarrollar la enfermedad, observándose otras regiones cromosomales comprometidas como el brazo largo del cromosoma 5 y el brazo largo del cromosoma 11<sup>4</sup>.

## 1.2 Manifestaciones clínicas

La principal manifestación clínica de la EC, es la diarrea crónica, la cual puede desencadenar el síndrome de absorción intestinal deficiente (SAID). Este síndrome se desarrolla debido a las lesiones que sufre la mucosa duodenal, tales como: atrofia de las vellosidades, reducción del número de pliegues circulares, fisuras y apariencia nodular. Las manifestaciones secundarias al SAID se conocen como síntomas no gastrointestinales (Tabla 1)<sup>3</sup>.

**Tabla 1** Manifestaciones clínicas de la EC no-gastrointestinales.

<b>Niños</b>	<b>Adultos</b>
Corta estatura	Dermatitis herpetiforme
Anemia	Anemia
Síntomas neurológicos	Reducción de la densidad ósea
	Infertilidad
	Síndrome del intestino irritable
	Dispepsia
	Reflujo esofageal
	Síntomas neurológicos
	Enfermedades autoinmunes

Los hallazgos serológicos, genéticos e histológicos han permitido la identificación de varios tipos de EC<sup>5</sup>:

- EC sintomática o clásica: con atrofia vellosa, síntomas de absorción deficiente y reconstitución de la mucosa al retirar el gluten de la dieta.
- EC asintomática o silenciosa: mucosa intestinal normal, ausencia de síntomas gastrointestinales durante una dieta con gluten.

- 
- Potencial o latente EC: presente en personas que nunca han tenido una biopsia consistente con EC, pero que presenta signos como anticuerpos anti-endomisio e infiltrado de linfocitos intraepiteliales (LIE), y tienen predisposición genética por la presencia de HLA-DQ2 o DQ8.

La falta de un diagnóstico y el tratamiento inadecuado pueden conducir al deterioro del paciente e incluso a la muerte, atribuyéndose como causa principal el desarrollo de enfermedades malignas como linfoma de células T, que se manifiesta como una expansión anormal de linfocitos intraepiteliales, el cual no responde de manera adecuada a la quimioterapia y es fatal a corto plazo<sup>3</sup>.

### 1.3 Diagnóstico

El diagnóstico de EC se realiza al confirmar los cambios histológicos característicos en biopsia de intestino delgado aunados a la presencia de datos clínicos. Cabe hacer mención que tanto las alteraciones histológicas como las clínicas se pueden confundir con otras patologías en donde está implicado el SAID, por ejemplo el esprue tropical y la sobrepoblación bacteriana (SPB).

La Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica postuló el siguiente criterio de diagnóstico para EC<sup>6,7</sup>. "Si los síntomas, tanto típicos como atípicos sumados a las pruebas serológicas son sugerentes de EC, se procede a la toma de biopsia de intestino. Finalmente si se tiene una respuesta serológica y clínica favorable a una dieta libre de gluten, se considera suficiente para confirmar el diagnóstico (Tabla 2)".

**Tabla 2** Criterio de diagnóstico propuesto por La Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica<sup>6</sup>.

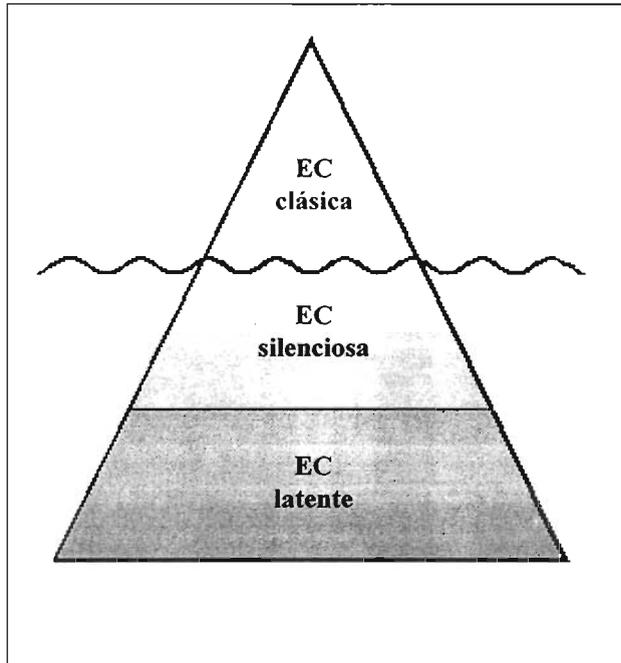
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Historia y presentación clínica compatible con EC</li><li>2. Exámenes serológicos compatibles con EC</li><li>3. Observaciones histológicas compatibles con EC</li><li>4. Respuesta clínica y serológica favorable a dieta libre de gluten</li><li>5. Sujeto mayor de 2 años</li><li>6. Exclusión de otras condiciones clínicas que se parecen a la EC</li></ol>
↓
Diagnostico definitivo de enfermedad celíaca

Además de las formas clínicas sintomáticas, aunque de expresividad clínica variable, en los últimos 10 años la disponibilidad de marcadores inmunológicos de EC ha puesto en evidencia la existencia de una serie de formas ocultas de esta enfermedad, lo cual dio lugar a la representación gráfica denominada "Iceberg Celíaco" (Figura 1).

### 1.3.1 Pruebas diagnósticas

#### a) Serología

Actualmente en la práctica clínica se cuenta con cuatro pruebas serológicas que se utilizan para evaluar a pacientes con sospecha de EC; monitorear la adherencia y respuesta a la dieta libre de gluten, y estudiar a individuos asintomáticos para confirmar la enfermedad. En la tabla 3 se enlistan las diferentes pruebas así como su sensibilidad y especificidad<sup>7</sup>.



**Figura 1** Iceberg celíaco de diagnóstico. Sólo una fracción de los enfermos celíacos tiene manifestaciones clínicas compatibles.

**Tabla 3** Sensibilidad y especificidad de las pruebas serológicas en la EC.

Prueba serológica	Sensibilidad	Especificidad
IgA anti-endomisio	85-98%	97-100%
IgA anti-transglutaminasa tisular	90-98%	94-97%
IgA anti-gliadina	75-90%	82-95%
IgG anti-gliadina	69-85%	73-90%

A pesar de que los ensayos que determinan la presencia de anticuerpos de la clase IgA tienen alta sensibilidad y especificidad, pueden ocurrir falsos negativos

---

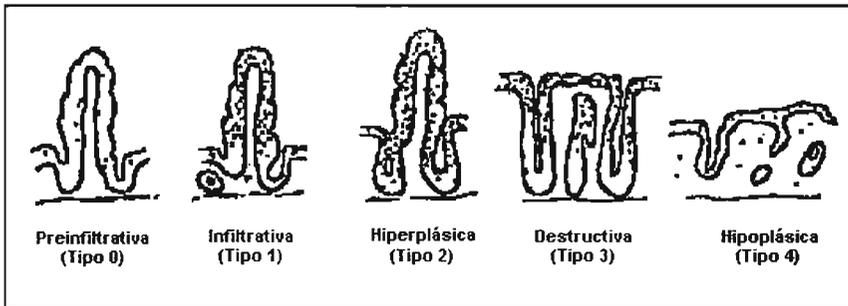
en pacientes con deficiencia selectiva de este tipo de anticuerpos y en niños menores de dos años. En estos casos se recurre a la búsqueda de anticuerpos IgG.

Recientemente Dieterich y col.<sup>8</sup> demostraron que la enzima transglutaminasa tisular (tTG) sería el principal y probablemente único antígeno en la enfermedad celiaca, que reconocido tanto por anticuerpos anti-transglutaminasa, como por los anti-endomisio.

#### b) Histología

Actualmente la histología de la mucosa del intestino delgado es el estándar de oro en el diagnóstico de EC, basado en la clasificación propuesta por Marsh para la progresión de las lesiones en la mucosa intestinal<sup>9</sup> (Figura 2):

- Estado 0 (preinfiltrativo): se caracteriza por mucosa normal.
- Estado 1 (infiltrativo): mucosa normal, pero con incremento de LIE.
- Estado 2 (hiperplásico): además de la LIE, existe hiperplasia de las criptas con disminución en la altura de las vellosidades intestinales.
- Estado 3 (destrutivo): es la lesión clásica de la EC, se caracteriza por atrofia parcial o sub-total de vellosidades, con hiperplasia críptica y LIE.
- Estado 4 (hipoplásico): se considera como la etapa terminal de la enfermedad, con atrofia completa de las vellosidades, incremento de apoptosis e hiperplasia críptica



**Figura 2.** Clasificación de Marsh de las lesiones intestinales en la EC<sup>7</sup>.

#### c) Tipificación del HLA

Ya que más del 98% de los enfermos celíacos presentan el haplotipo HLA-DQ2 o HLA-DQ8 del MHC clase II, la tipificación de estas moléculas parece ser una herramienta útil en el diagnóstico de EC. Esta prueba tiene una alta sensibilidad (90%-95%), sin embargo, aproximadamente 30% de la población general, y una gran proporción de los sujetos considerados de alto riesgo para EC, también presentan estos marcadores. Por esta razón la especificidad de esta prueba no es la ideal<sup>10</sup>.

#### 1.4 Patogénesis

##### a) Gluten

Para comprender la patogénesis de la enfermedad celíaca es necesario conocer características propias del gluten, que es una mezcla compleja de polipéptidos de gliadina y glutenina. La gliadina es una molécula monomérica mientras que la glutenina esta formada por grandes estructuras poliméricas. Basándose en su secuencia de aminoácidos, la gliadina se divide en  $\alpha$ -,  $\gamma$ - y  $\omega$ -gliadina (250-300



---

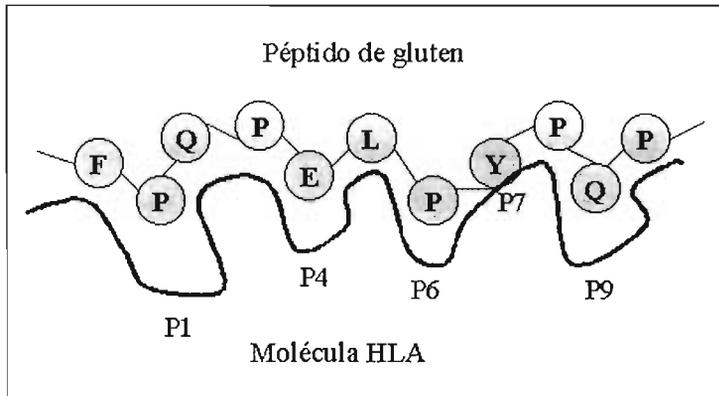
### c) Moléculas MHC HLA-DQ2 y HLA-DQ8

Las moléculas HLA son proteínas del complejo principal de histocompatibilidad (en inglés MCH) expresadas sobre la superficie de células humanas. Tienen la función de presentar antígenos para el reconocimiento por los linfocitos T. Existen tres tipos de moléculas MHC: las moléculas MHC I y II, participan en la presentación del antígeno y las del MHC III forman parte del complemento. Las moléculas MHC clase I unen péptidos derivados de proteínas citosólicas y son reconocidas por linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Las moléculas MHC clase II están restringidas principalmente a las células presentadoras de antígeno profesionales, unen péptidos derivados de proteínas endocitadas, y son reconocidas por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> <sup>15</sup>.

Los primeros genes HLA en identificarse fueron HLA-A, HLA-B y HLA-C. Posteriormente se identificó una región adyacente a la ya caracterizada, y se le nombró HLA-D. A las proteínas codificadas por este locus se les denominó HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. Las moléculas HLA-A, -B y -C corresponden al MHC clase I, mientras que las moléculas HLA-DP, Q y R pertenecen al MHC clase II<sup>15</sup>.

La presencia de moléculas HLA-DQ2 y DQ8 puede ser un factor que confiere susceptibilidad a la EC, debido a que son las responsables de la presentación de los péptidos de gluten a las células T. Lo anterior se demostró en biopsias de individuos celíacos que fueron expuestas *in vitro* con péptidos de gluten, presentándose una activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de lámina propia. Y estos linfocitos invariablemente reconocieron péptidos de gluten presentados sólo por las moléculas DQ2 y DQ8.

Los motivos de unión al péptido de DQ2 y DQ8 predicen una preferencia por cargas negativas en las posiciones de anclaje. DQ2 tiene preferencia por las posiciones P4, P6 y P7, mientras que DQ8 tienen preferencia por P1, P4 y P9 (Figura 4).



**Figura 4:** Posiciones de unión a la molécula de HLA<sup>4</sup>.

Los linfocitos T sólo reconocen péptidos de gliadina desamidados, reacción que es llevada a cabo por la enzima transglutaminasa tisular.

#### d) Transglutaminasa tisular (tTG)

La transglutaminasa tisular es una enzima dependiente de calcio que es responsable de las modificaciones postraduccionales de proteínas, por medio de la transamidación o desamidación de glutaminas específicas. La reacción de transamidación involucra a aminas primarias (como la lisina), mientras que la reacción de desamidación involucra agua (Figura 5).

Cuando la lisina de otro polipéptido se une a la glutamina del péptido original, se lleva a cabo la reacción de transamidación, la cual se favorece a pH 7.3. Sin embargo algunas reacciones de desamidación también se pueden llevar a cabo. Por otro lado, al disminuir el pH también disminuye la reacción de transamidación y se favorece la reacción de desamidación<sup>4</sup>.



---

---

El nivel de expresión de tTG se incrementa durante la EC, cuando es expresada por células epiteliales, de manera extracelular en la región subepitelial<sup>11</sup>, sobre la superficie de macrófagos y monocitos<sup>16</sup> después de activación, así como en células dendríticas durante su maduración<sup>17</sup>.

#### 1.4.1 Mecanismo

El gluten ingerido en la dieta es procesado por enzimas digestivas, algunos fragmentos de gliadina son resistentes a esta digestión y pueden permanecer intactos en el lumen intestinal, donde existen dos posibilidades: que los péptidos intactos lleguen al epitelio, o que atraviesen esta barrera y alcancen la lámina propia. Los péptidos de gliadina pueden llegar a la lámina propia por cambios en la permeabilidad ocasionados por daño en las uniones estrechas de las células<sup>18</sup>.

##### a) Lámina propia (Figura 6)

Los péptidos de gliadina resistentes a la digestión, son reconocidos por la tTG, la cual lleva a cabo la reacción de desamidación. Residuos de glutamina específicos son transformados a ácido glutámico, esta reacción le confiere cargas negativas al péptido, lo que le permite una mayor afinidad de unión a DQ2 y DQ8.

En la lámina propia estos péptidos desamidados se anclan fácilmente a las moléculas HLA-QD2 o HLA-DQ8, que se expresan en la superficie de las células presentadoras de antígeno. En este compartimento existe una importante concentración de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, que en su mayoría, reconocen los péptidos de gliadina presentados por DQ2 o DQ8, por medio de la unión con el receptor TcR $\alpha\beta$ . Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que reconocen al péptido, producen interferón  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), la citocina más importantemente producida durante la EC<sup>4</sup>. La producción de ésta citocina, además de activar a los macrófagos, estimula el cambio de estructura de las células endoteliales, permitiendo el incremento del flujo

---

sanguíneo, aumento de la permeabilidad vascular, e incrementando la migración de leucocitos, fluido y proteína al sitio de lesión. Estos eventos desencadenan en una respuesta inflamatoria y consecuente atrofia.

b) Epitelio (Figura 7)

Para la explicación de la permanencia de los péptidos deamidados de gliadina en el epitelio, se ha postulado un modelo, en el que las células epiteliales en presencia de los péptidos de gliadina, se alteran, secretan interleucina 15 (IL-15) y expresan una forma no clásica de moléculas MHC clase I. A su vez IL-15 sobre-regula la expresión de receptores natural killer (NK), como NKG2D y CD94, sobre los linfocitos intraepiteliales (LIE), los cuales reconocen moléculas no clásicas del MHC clase I, esto permite la activación de LIE por medio de dos mecanismos: a) la reducción del umbral de activación y el reconocimiento de auto-antígenos de baja afinidad. b) la adquisición de actividad similar a NK<sup>3</sup>. Por otro lado, los LIE activados destruyen el epitelio por citólisis y secreción de IFN- $\gamma$ .

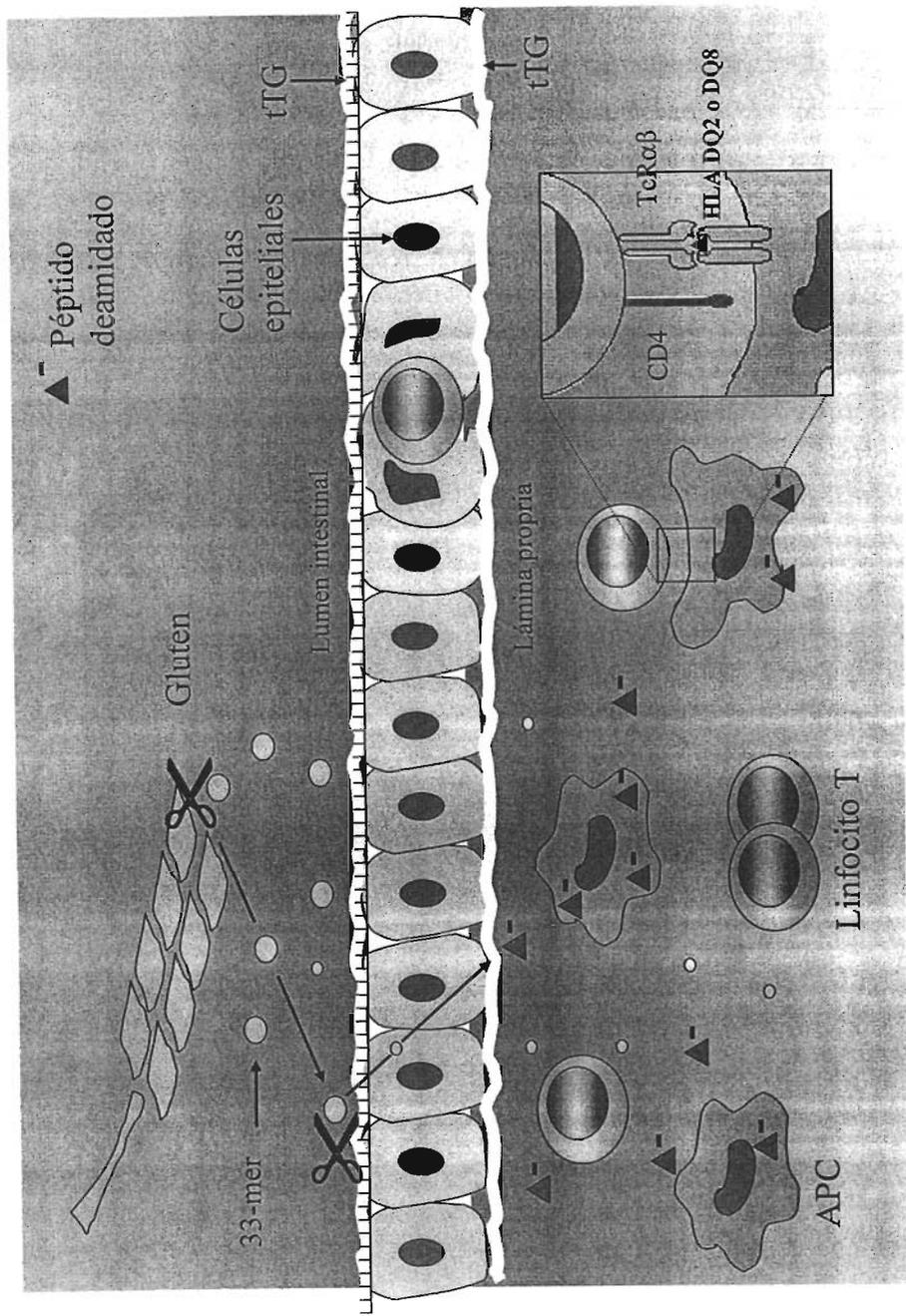
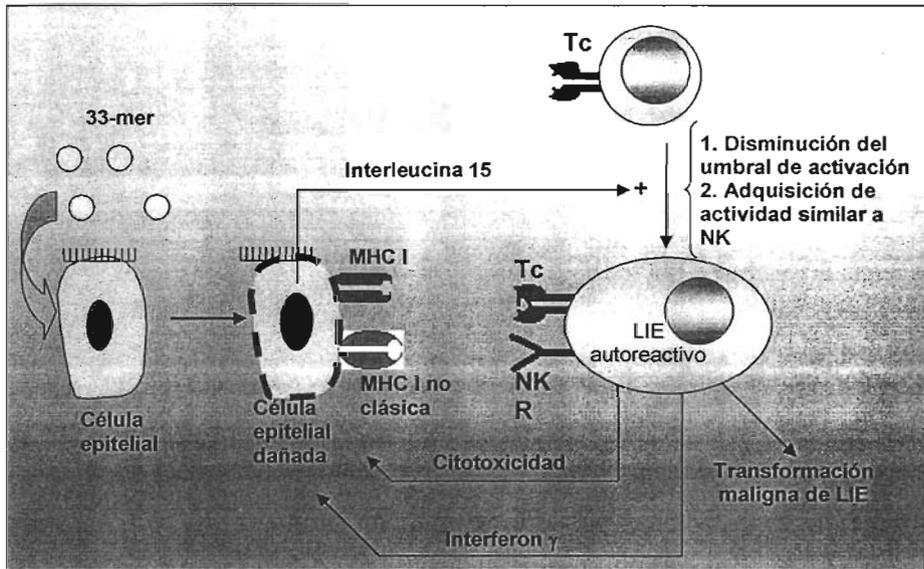


Figura 6. Mecanismo de patogénesis en la lámina propia<sup>4</sup>.



**Figura 7.** Mecanismo de patogénesis en el epitelio<sup>3</sup>.

#### 1.4.2 Linfocitos Intraepiteliales

El tejido linfoide asociado al intestino es uno de los principales participantes del sistema inmune humano ya que está expuesto a un continuo reto antigénico. La función de los LIE aún es desconocida, se postula que desempeñan una función muy importante en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, esto debido a características como<sup>19</sup>.

- **Abundancia:** Los LIE se encuentran en una relación 1:10 con respecto a las células epiteliales. Si se observa que la superficie de absorción intestinal es de aproximadamente 300 m<sup>2</sup>, se puede comprender la importancia de este tejido linfoide.

- *Situación:* El intestino es el órgano que soporta una mayor carga antigénica en el organismo y los LIE son los primeros en entrar en contacto con ella. A pesar de esto, los antígenos de la dieta y los de la flora intestinal no originan una respuesta inmune, esto es, tolerancia oral. Se piensa que los LIE pueden participar en el mecanismo de ésta.
- *Ontogenia:* Gran parte de los LIE son CD8<sup>+</sup>. Actualmente se conoce que algunos de estos linfocitos tienen maduración extratímica, y posiblemente esta maduración se lleve a cabo *in situ* en el intestino. El repertorio antigénico resultante y por lo tanto la capacidad de respuesta es diferente a la de los linfocitos periféricos.
- *Complejidad fenotípica:* Existen diferentes tipos de LIE. La mayoría de los linfocitos son CD8<sup>+</sup> (>85%), mientras que < 10% son CD4<sup>+</sup>. De igual forma la mayoría de los LIE presentan el receptor de linfocitos T  $\alpha\beta$  (TcR $\alpha\beta$ ) y menos del 10% presentan la molécula TcR $\gamma\delta$ . Eiras en 1998<sup>20</sup> identificó un grupo de LIE con fenotipo sugerente de pertenecer a un linaje *natural-killer* (CD3<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup>), y que comprende aproximadamente un 42% de los LIE totales. Esta complejidad fenotípica puede estar relacionada con el desempeño de diferentes funciones.

#### a) Linfocitos intraepiteliales TcR $\gamma\delta$

Los linfocitos intraepiteliales TcR $\gamma\delta$  constituyen una minoría de los linfocitos T, por lo que se les consideró por mucho tiempo un error evolutivo, y se les ignoró. Sin embargo, actualmente se sabe que están presentes en gran proporción en mucosas y en la epidermis, y que representan una población linfoide muy particular con varias diferencias que los separan del resto de los linfocitos T. Una de las características más importantes de estos linfocitos es su capacidad de reconocer ligandos no peptídicos<sup>21</sup>, antígenos proteicos no procesados<sup>22</sup>, y superantígenos bacterianos. Además reconocen antígenos en un contexto distinto al de las moléculas de histocompatibilidad clásicas por ejemplo en el contexto de CD1d, la cual es una molécula especializada en la presentación de antígenos

---

lipídicos<sup>23</sup>; o en el de las moléculas MICA-MICB<sup>24</sup>. Se le han atribuido diferentes funciones a los LIE TcR $\gamma\delta$ . Por un lado se les considera la primera línea de defensa contra patógenos intestinales; por otro lado se considera que su principal función es la de mantener la integridad del epitelio, por su capacidad de reconocimiento de proteínas de choque térmico; por último se considera que su función es la de contribuir a la homeostasis del epitelio. Últimamente se incrementó el interés por éstos linfocitos debido a su posible participación en la patogenia de varias enfermedades, y en caso especial en las enfermedades autoinmunes.

b) Linfocitos intraepiteliales CD3<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup>

Este fenotipo de linfocitos poco estudiado, se describió recientemente<sup>20</sup>. Se cree que este fenotipo es sugerente de actividad *natural-killer* (NK), aunque aún no se ha comprobado en humanos, sin embargo, se ha observado que LIE de ratón presentaron una actividad NK espontánea<sup>20</sup>. En otro intento por caracterizar la actividad de esta subpoblación, se estudió la producción de citocinas como respuesta a un mitógeno, y se descubrió que tienden a producir citocinas tipo Th1, principalmente IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ <sup>25</sup>. Existen varias hipótesis acerca de la actividad de estos LIE, por un lado se postula que puede ser un subtipo inmunoregulador que esta involucrado en la tolerancia oral. Por otro lado se sugiere que es un subtipo efector de NK, y finalmente se propone que son precursores inmaduros tanto de LIE como de células NK<sup>20</sup>.

Recientemente aumentó el interés en los LIE debido a las alteraciones reportadas en sus subpoblaciones durante la EC.

Las alteraciones más importantes son:

- Aumento en el porcentaje total de los LIE (con relación a las células epiteliales) durante las fases activas de la enfermedad, que se corrige al excluir el gluten de la dieta.

- 
- Aumento constante, independiente de la ingestión o no de gluten, del porcentaje de LIE TcR $\gamma\delta$ .
  - Disminución constante, independiente de la ingestión o no de gluten, del porcentaje de LIE CD3 $^+$ /CD7 $^+$ .

A pesar de que las alteraciones de los LIE durante la EC se conocen desde hace tiempo, su estudio se ha visto limitado por el uso de técnicas subjetivas y poco estandarizadas como la inmunohistoquímica. Actualmente se ha disminuido este problema con la introducción de una técnica con una excelente sensibilidad y especificidad en la identificación de subpoblaciones linfocitarias, como es la citometría de flujo (CF), cuyo único requisito es la individualización de las células.

---

## **2. JUSTIFICACIÓN**

La EC es una patología de difícil diagnóstico, por lo que existe la necesidad de buscar alternativas que permitan establecer un diagnóstico certero ante la especificidad y sensibilidad variable ofrecida por los marcadores serológicos y la histología.

---

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar y comparar el infiltrado de LIE CD3-/CD7+ y TcR $\delta\gamma$ + en biopsias de la mucosa duodenal de pacientes adultos con probable EC y controles, mediante citometría de flujo.

#### 3.2 Objetivos particulares

Estandarizar la metodología de desagregación de tejido de las biopsias duodenales.

Determinar las proporciones de los fenotipos CD3-/CD7+ y TcR $\delta\gamma$  de los LIE en biopsias de sujetos control y pacientes por CF.

Determinar si las diferencias en las proporciones de los LIE CD3-/CD7+ y TcR $\delta\gamma$ , son de utilidad para el diagnóstico de la EC, comparado con las pruebas de serología y diagnóstico histológico.

---

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1 Población:

El grupo de estudio incluyó 20 pacientes que ingresaron al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán" (INCMNSZ) por diarrea crónica y que se les diagnosticó SAID. El diagnóstico de este síndrome se realizó mediante historia clínica, pruebas bioquímicas (citología hemática, cinética de hierro, pruebas de función hepática, pruebas de absorción intestinal, radiología (tránsito intestinal) e histología (biopsia de mucosa de intestino delgado).

### 4.2 Criterios de selección:

Criterios de inclusión:

- Edad: mayores de 18 años.
- Presencia de diarrea crónica (duración mayor a 4 semanas).
- VIH negativo.
- Consentimiento por escrito.

Criterios de exclusión:

- Sujetos con insuficiencia renal.
- Sujetos con neoplasias malignas.
- Sujetos con tratamiento inmunosupresor.
- Sujetos con trastornos de la coagulación en quienes este contraindicado la realización de el procedimiento endoscópico con toma de biopsia.
- Cualquier otra condición médica preexistente que pudiera interferir con la participación del paciente como: condición psiquiátrica, traumatismo del sistema nervioso central o epilepsia que requiera medicación, y disfunción cardiovascular grave.

- 
- Cualquier otra condición que en opinión del investigador no haga adecuado el registro del paciente en el estudio o pueda interferir con la participación del paciente.

El grupo control estuvo formado por 10 sujetos que no presentaron diarrea crónica ni SAID, a los cuales se les practicó endoscopia del tubo digestivo superior por cualquier otra causa que no fuera mal absorción intestinal.

#### 4.3 Pruebas rutinarias

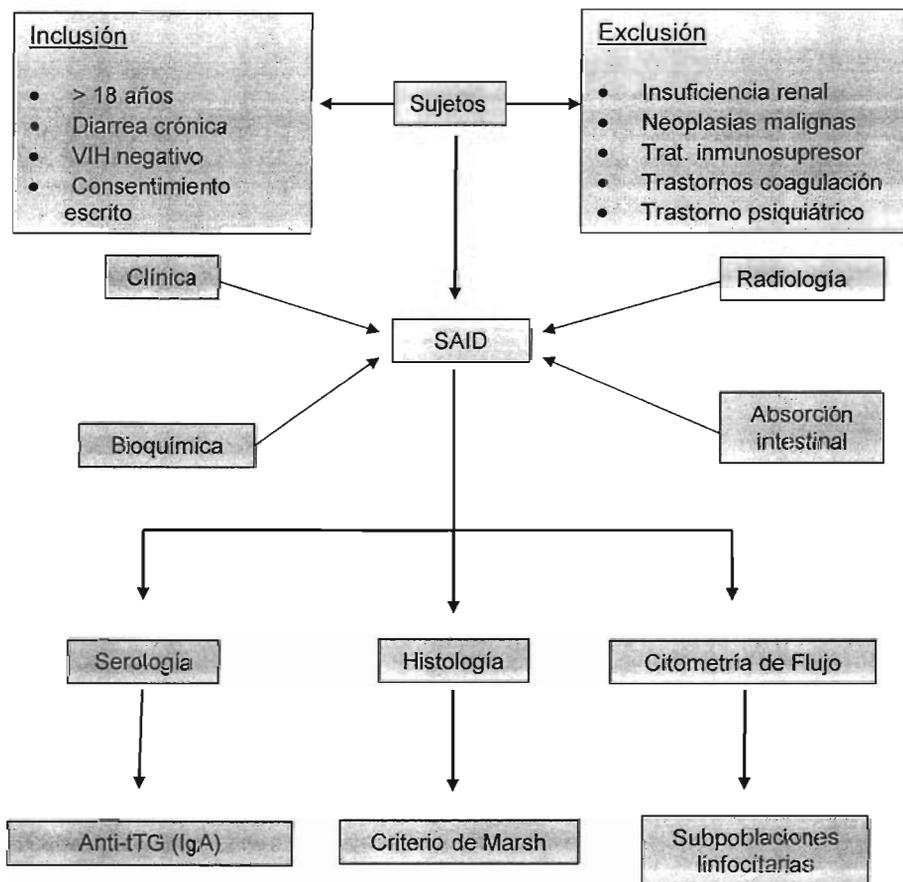
A todos los pacientes se les realizaron de forma rutinaria las siguientes pruebas:

- a) Evaluación clínica
- b) Citología hemática, cinética de hierro, carga de beta carotenos, determinación de ácido fólico y pruebas de función hepática.
- c) Coprocultivo y estudio parasitológico
- d) Prueba de absorción con d-xilosa
- e) Prueba de hidrógeno espirado con lactulosa
- f) Placa simple de abdomen y tránsito intestinal con bario
- g) Determinación de anticuerpos IgA anti-transglutaminasa tisular. Esta detección se realizó mediante la técnica de ELISA.
- h) Endoscopia del tubo digestivo superior con toma de aspirado duodenal y biopsia de la mucosa duodenal. Se tomaron cinco biopsias. Tres se destinaron para estudios histológicos y dos para el estudio linfocitario por citometría de flujo.
- i) Análisis histológico. Los cortes histológicos fueron analizados por dos patólogos de forma independiente y de manera ciega.
- j) Análisis de subpoblaciones linfocitarias por CF.

La selección de los sujetos, así como la realización de las pruebas de a) a j), se llevó a cabo en el INCMNSZ. El análisis de las subpoblaciones linfocitarias por CF se realizó en la Facultad de Medicina de la UNAM, también de forma ciega.

### Metodología general

Diagrama 1. Esquema general del proyecto



---

#### 4.4 Histopatología y subpoblaciones linfocitarias

Se tomaron 5 biopsias del intestino delgado proximal (duodeno), tres para estudio histopatológico y dos para CF.

#### 4.5 Desagregación de tejido intestinal.

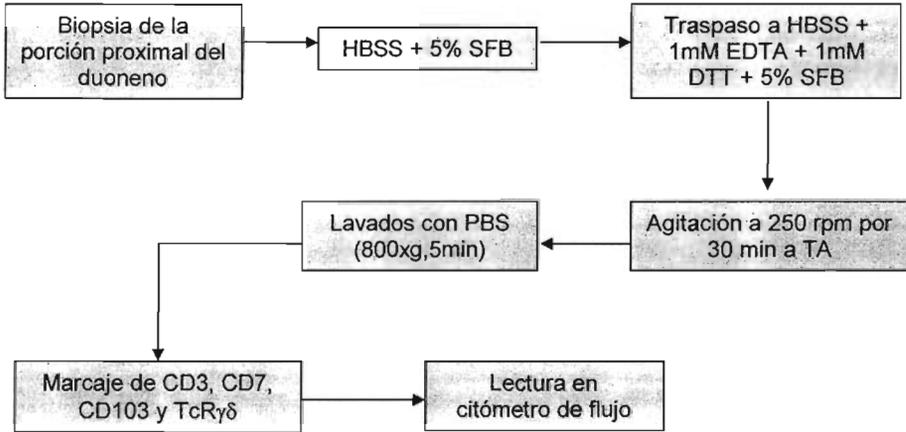
Cada una de las dos biopsias destinadas para CF se colocaron en 1 mL de Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS) suplementada con 5% de suero fetal bovino(SFB)., Se transportaron de inmediato al laboratorio y se cambió la solución a 1 mL de solución fresca HBSS adicionada con 1mM de EDTA, 1mM de DTT y 5% de SFB. Las biopsias se colocaron, en un agitador orbital, a 250 rpm, por 30 minutos, a temperatura ambiente; se filtraron a través de una malla de nylon para retirar el tejido no desagregado. Las muestras en suspensión se centrifugaron a 800xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante, se agregó 1 mL de amortiguador de fosfatos (PBS), a cada una, y se resuspendieron con pipeta. Se centrifugaron por segunda ocasión a 800xg por 5 minutos. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron los precipitados celulares en 200  $\mu$ L de PBS. Las células de ambas biopsias se unen y se leen en una sola determinación.

#### 4.6 Citometría de flujo:

Las células desagregadas fueron marcadas con los siguientes anticuerpos: anti-CD3 (conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) clona SK7), anti-CD7 (conjugado a R-Ficoeritrina (R-PE) clona M-T701), anti-CD103 (conjugado a ficoeritrina (PE) clona Ver-ACT8) y anti-TcR $\gamma\delta$  (conjugado a FITC clona 11F2). (Beckton Dickinson). Las muestras fueron leídas en un citómetro de flujo *FACS Epics Altra (Beckman Coulter)*. Los datos fueron analizados con el programa *Expo 2.0 software (Coulter, Ca, USA)*

## Metodología citometría de flujo

**Diagrama 2.** Metodología del análisis de las subpoblaciones linfocitarias por CF, realizado en la Facultad de Medicina de la UNAM



### 4.7 Estadística

La comparación entre grupos se llevó a cabo mediante la prueba de Kruskal-Wallis<sup>26</sup>, bajo un nivel de significancia de 0.05. Para la realización de las gráficas de cuarteles en porcentaje, se utilizó el programa estadístico *Statistica '98 edition* (Stat Soft Inc. USA).

## 5. RESULTADOS

De los treinta sujetos estudiados, diez pertenecieron al grupo control y a los veinte sujetos restantes se les diagnosticó SAID mediante las pruebas antes mencionadas. Las características de la población se presentan en la tabla 5.

**Tabla 5** Características de la población de estudio.

Grupo	Número de sujetos	Edad (rango)	Sexo	
			H (%)	M (%)
Control	10	49.5 (28-76)	3 (30)	7 (70)
Enfermedad Celiaca	12	55.5 (35-75)	3 (25)	9 (75)
Sobrepoblación Bacteriana	8	50 (21-91)	3 (37.5)	5 (62.5)
Total	30	51.7 (21-91)	9 (30)	21 (70)

### 5.1 Histología:

#### 5.1.1 Control

Todos los integrantes del grupo control presentaron un proceso inflamatorio de leve a severo, un sujeto presentó atrofia intestinal y otro presentó lesiones sugerentes de EC que se ubicó en el grupo II de la clasificación de Marsh (Tabla 6).

#### 5.1.2 Pacientes

La mayoría de los pacientes con SAID (presunta EC) presentaron un proceso inflamatorio crónico leve (Tabla 7). En algunos se observó atrofia de vellosidades leve y sólo cuatro de los veinte sujetos presentaron lesiones sugerentes de EC, los cuales se ubicaron en el grupo II y III de la clasificación de Marsh. Uno de los sujetos se le diagnosticó atrofia compatible con EC pero no se ubicó en ningún criterio de la clasificación de Marsh.

**Tabla 6** Resultados de histología para el grupo control. Todos los sujetos presentaron un proceso inflamatorio.

<b>Sujeto</b>	<b>Resultado Histológico</b>
2	Duodenitis crónica leve
4	E. Celiaca Marsh II
7	Duodenitis crónica leve con atrofia irregular superficial
8	Duodenitis crónica
9	Duodenitis leve
15	Enteritis leve
16	Enteritis crónica leve, aguda y edematosa
17	Enteritis crónica con atrofia
22	Enteritis crónica inespecífica
28	Duodenitis crónica leve

**Tabla 7** Resultados de histología para el grupo de pacientes. Sólo los pacientes 3, 4, 12, 18 y 29 presentan lesiones compatibles con EC.

<b>Pacientes</b>	<b>Resultado Histológico</b>
1	Duodenitis crónica leve y atrofia
3	E. Celiaca Marsh II
5	E. Celiaca Marsh III
6	Duodenitis crónica leve
10	Duodenitis crónica leve
11	Duodenitis crónica sin atrofia
12	E. Celiaca Marsh III
13	Enteritis aguda edematosa leve
14	Enteritis linfocítica con atrofia de vellosidades
18	E. Celiaca Marsh III
19	Duodenitis, atrofia y LIE
20	Duodenitis crónica leve con atrofia leve de vellosidades
21	Duodenitis crónica leve con atrofia, abundantes LIE
23	Atrofia leve
24	Duodenitis crónica
25	Duodenitis crónica leve
26	Duodenitis y atrofia leve
27	Duodenitis crónica leve
29	Atrofia compatible con EC
30	Duodenitis crónica moderada con atrofia de vellosidades

## 5.2 Serología:

### 5.2.1 Control

Todos los sujetos que integraban el grupo control dieron negativo para la determinación de anticuerpos IgA anti tTG (Tabla 8).

**Tabla 8** Resultados de serología para el grupo control. Todos los sujetos fueron negativos para esta prueba.

Sujeto	Determinación de anticuerpos IgA anti-tTG
2	Negativo
4	Negativo
7	Negativo
8	Negativo
9	Negativo
15	Negativo
16	Negativo
17	Negativo
22	Negativo
28	Negativo

### 5.2.2 Pacientes

De los veinte pacientes, sólo a uno no fue posible determinarle los anticuerpos IgA anti-tTG y de los 19 restantes 11 pacientes fueron positivos para esta prueba. De los cuatro pacientes que por histología presentaron lesiones sugerentes de EC (pacientes 1, 3, 12 y 18), tres fueron positivos, y a uno de éstos (el 18) no se le realizó la determinación anticuerpos anti-tTG, sin embargo fue diagnosticado como enfermo celiaco debido al resto de las determinaciones (Tabla 9).

**Tabla 9** Resultados de serología para el grupo de pacientes NR= no se realizó.

<b>Paciente</b>	<b>Determinación de Anticuerpos IgA anti-tTG</b>
1	Positivo
3	Positivo
5	Positivo
6	Negativo
10	Negativo
11	Negativo
12	Positivo
13	Positivo
14	Positivo
18	NR
19	Positivo
20	Negativo
21	Positivo
23	Negativo
24	Negativo
25	Positivo
26	Positivo
27	Negativo
29	Positivo
30	Negativo

Los especialistas en gastroenterología del INCMNSZ tomaron los resultados de histología, serología y aquellas pruebas que se realizaron para el diagnóstico de SAID, y de acuerdo a su experiencia y criterios, observaron que el grupo de pacientes, no fue homogéneo. Por lo anterior sospechaban que probablemente en ese grupo hubiera una mezcla de dos enfermedades. Esto puede suceder ya que hay algunas entidades clínicas, que también presentan SAID (SPB y ET) pueden confundirse con EC. Para conocer si existía una mezcla de enfermedades o no, se reanalizaron los resultados antes mencionados y se decidió realizar dos pruebas

más para comprobar el diagnóstico de SPB: aspirado duodenal y cuenta de unidades formadoras de colonias.

De acuerdo a lo anterior se observó que verdaderamente el grupo de pacientes si estaba mezclado y se dividió de la siguiente manera (Tabla 10):

**Tabla 10** División del grupo de pacientes en dos entidades  
SPB= sobrepoblación bacteriana; EC= enfermedad celiaca.

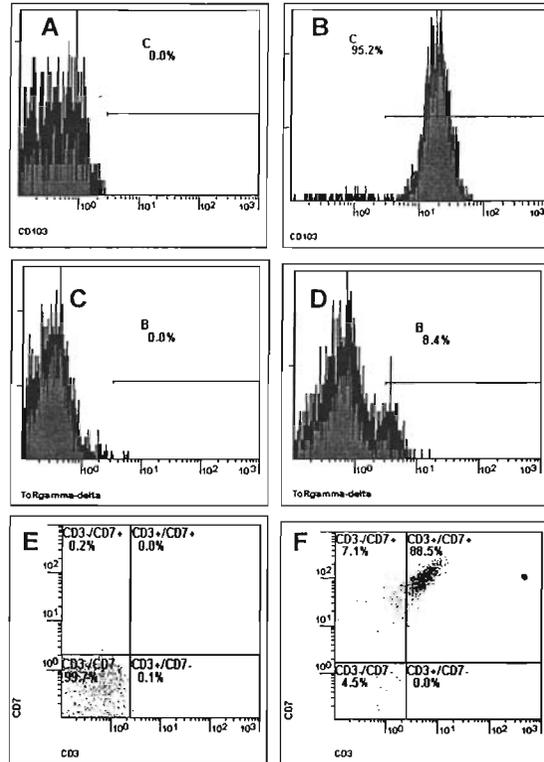
Paciente	Diagnóstico	Paciente	Diagnóstico
6	SPB	1	EC
10	SPB	3	EC
11	SPB	5	EC
20	SPB	12	EC
23	SPB	13	EC
24	SPB	14	EC
27	SPB	18	EC
30	SPB	19	EC
		21	EC
		25	EC
		26	EC
		29	EC

Después de dividir a los pacientes, sólo doce de los inicialmente 30 sujetos, presentó EC y el resto de los pacientes presentaba SPB, enfermedad en la cual también se desarrolla el SAID. Teniendo este conocimiento, los resultados de la evaluación de subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo, se analizaron dividiendo el grupo de pacientes en dos entidades.

### 5.3 Análisis de subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo

Las células derivadas de las biopsias intestinales se corrieron en el citómetro de flujo. Los eventos totales a los cuales se corrieron las diferentes muestras variaron dependiendo de la cantidad de células que había en cada una, ya que algunas

biopsias estaban más deterioradas que otras. La población de LIE se identificó como aquellas células que presentaron el marcador celular CD103 (Figura 8). Para determinar cantidades número de LIE totales, se hizo una relación entre el total de las células contadas por el citómetro y aquellas que presentaban el marcador CD103. De esa población se partió para el análisis de las subpoblaciones de LIE TcR $\gamma\delta$  y CD3 $\gamma$ /CD7 $\gamma$ .



**Figura 8** Histogramas obtenidos a partir de CF mostrando las diferencias entre las células sin marcar y aquellas marcadas con los fluorocromos correspondientes. A = CD103 negativo (FITC), B = CD103 positivo (FITC), C = TcR $\gamma\delta$  sin teñir, D = TcR $\gamma\delta$  (FITC), E = CD3 $\gamma$ /CD7 $\gamma$  sin teñir, F = CD3 $\gamma$ /CD7 $\gamma$  (FITC/R-PE $\gamma$ ).

Los porcentajes obtenidos se resumen en las tablas 11 y 12 para el grupo de SPB y EC respectivamente. Para el grupo de pacientes con SPB se obtuvo un valor medio de LIE totales de  $25.5 \pm 17.3\%$ . El valor para los LIE TcR $\gamma\delta$  fue de  $14.6 \pm 8.2\%$  y para la subpoblación CD3/CD7 $^+$  fue de  $5.2 \pm 5.4\%$ . Para los pacientes a los cuales, según el criterio del INCMNSZ, se les diagnosticó EC, se obtuvo un valor de LIE totales de  $26.2 \pm 13.2\%$ , para los LIE TcR $\gamma\delta$  de  $15.8 \pm 13.0\%$ , y para la subpoblación CD3/CD7 $^+$  de  $5.7 \pm 5.3\%$ .

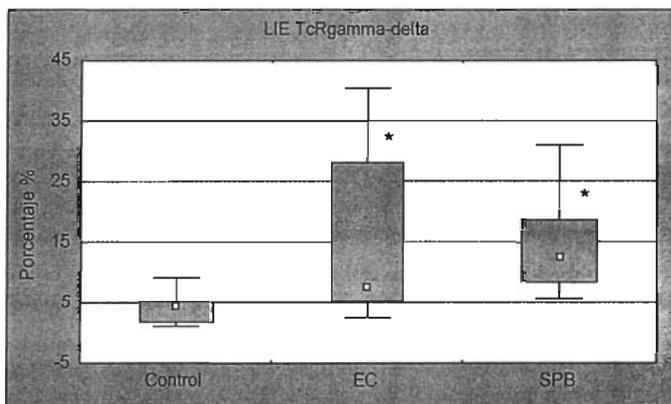
**Tabla 11** Resultados de citometría de flujo para los pacientes con sobrepoblación bacteriana.

Paciente	Porcentaje LIE totales	Porcentaje LIE TcR $\gamma\delta$	Porcentaje LIE CD3/CD7 $^+$
6	11.6	6.8	5.8
10	29.2	10.5	1.81
11	62.6	20.4	2.5
20	21.2	31	2.5
23	15.4	17.2	1.5
24	22.9	5.6	0.7
27	7.3	12.8	15.7
30	33.4	12.6	11.3

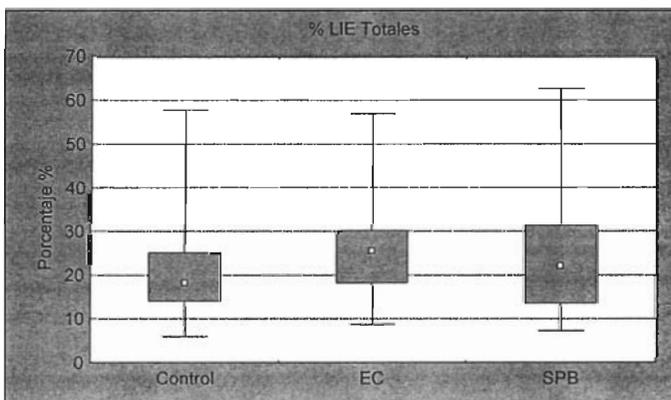
**Tabla 12** Resultados de citometría de flujo para los pacientes con enfermedad celiaca.

Paciente	Porcentaje LIE totales	Porcentaje LIE TcR $\gamma\delta$	Porcentaje LIE CD3/CD7 $^+$
1	8.7	37.3	5.9
3	17.9	6.5	8.7
5	28.2	5.6	4.2
12	56.9	5.4	2.2
13	20.7	7.8	4.5
14	41.4	16.8	5.8
18	30.3	5.4	20.1
19	18.4	40.4	1.7
21	24.7	ND	2.9
25	10.3	17.5	2
26	29.9	2.5	0.9
29	26.5	28.2	9.2

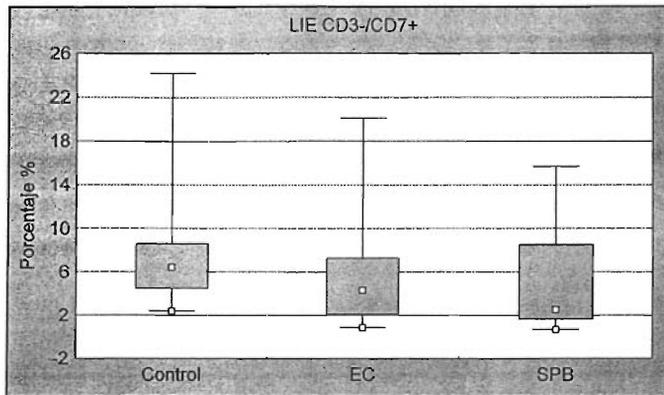
Analizando los resultados de las subpoblaciones linfocitarias para cada grupo y comparando con los valores obtenidos en el grupo control, se observó el incremento significativo ( $p < 0.05$ ) del porcentaje de la subpoblación de LIE TcR $\gamma\delta$  de los grupos de EC y SPB con respecto al grupo control (gráfica 1). Mientras que no hay diferencia significativa entre el grupo de EC y el de SPB. En los LIE totales y en la subpoblación CD3-/CD7+ no se encontraron diferencias significativas de ninguno de los grupos con respecto al control ( $p < 0.05$ ) (gráficas 2 y 3).



**Gráfica 1** Mediana, 25 y 75 percentil e intervalos de los LIE TcR $\gamma\delta$  en los diferentes grupos. \*  $p < 0.05$



**Gráfica 2** Mediana, 25 y 75 percentil e intervalos de los LIE totales en los diferentes grupos.



**Gráfica 3** Mediana, 25 y 75 percentil e intervalos de los LIE CD3<sup>-</sup>/CD7<sup>+</sup> en los diferentes grupos.

---

## 6. DISCUSIÓN

Investigaciones recientes señalan la necesidad de utilizar diferentes herramientas para definir al diagnóstico de EC como son: historia clínica, pruebas serológicas, histología y dieta libre de gluten. A pesar de esto la EC se confunde con otras enfermedades que también presentan el SAID y se plantea la necesidad de nuevas alternativas diagnósticas. Por lo que en este trabajo se decidió estudiar el comportamiento de dos subpoblaciones de LIE mediante CF, con el propósito de contribuir a un diagnóstico más certero.

### 6.1 Histología

La histología del grupo control mostró en todos los sujetos un proceso inflamatorio, con características similares a las de la EC y estos individuos no tenían resultados sugerentes de padecer SAID (tabla 5). Incluso uno de los sujetos control (el número 4) presentó una lesión que se clasificó dentro del criterio de Marsh, sin embargo al observar en conjunto todas las pruebas bioquímicas, funcionales y de serología que le fueron aplicadas, se tomó la decisión de conservarlo en este grupo. Con lo anterior y por antecedentes previos se muestra, que a pesar de contar con una buena clasificación y descripción de las lesiones de la mucosa intestinal en EC, el diagnóstico no es definitivo.

Posterior a los hallazgos en el grupo control, este debe considerarse como un grupo de personas con ausencia de SAID, pero con alteración histológica. Esto debe ser tomado en cuenta en la observación de los parámetros obtenidos para el resto de las pruebas aplicadas.

En el grupo de pacientes (tabla 6), conformado por 20 sujetos, todos presentaron inflamación de leve a crónica, algunos con infiltrado linfocitario y otros más con atrofia de vellosidades. Tomando en cuenta sólo las observaciones histológicas

---

resultaba muy difícil obtener un diagnóstico definitivo de la EC. Por lo que el diagnóstico de esta enfermedad se basó también en el resultado de serología y de las pruebas bioquímicas y funcionales. De los 20 sujetos que conformaban el grupo de pacientes, sólo 12 se diagnosticaron como enfermos celíacos, lo cual nos demuestra que en las etapas iniciales de la enfermedad, cuando la atrofia aun no es de severa a total, las lesiones se pueden confundir con las presentes en otras enfermedades. Además en el caso de EC asintomática y latente en las cuales la mucosa duodenal suele ser normal, la histología no es de ayuda en el diagnóstico.

En estudios anteriores se ha demostrado que el proceso inflamatorio crónico presente en enfermos con EC produce un daño histológico similar al encontrado en SPB, giardiasis, esprue tropical y enteropatía por VIH<sup>7</sup>. Por lo que el diagnóstico diferencial de EC solo por histología, no es concluyente.

## 6.2 Serología

La determinación de anticuerpos anti-tTG se realizó en 29 de los 30 sujetos incluidos en el estudio. En los grupos control y de SPB no existieron individuos que dieran positivo para esta prueba, a diferencia del grupo de EC en el cual a todos los pacientes que se les determinaron estos anticuerpos, dieron resultado positivo. La alta especificidad de esta prueba corresponde con los valores reportados<sup>7</sup> y refuerza la idea de que la época de la determinación de anticuerpos anti-gliadina, está siendo substituida, por la recientemente establecida, determinación de anticuerpos anti-tTG<sup>10</sup>.

La alta especificidad de esta prueba se debe a que la producción de anticuerpos anti-tTG se lleva a cabo sólo cuando la enzima se encuentra acoplada a los péptidos de gliadina formando un complejo hapteno-acarreador. De esta manera fue reconocida por las células presentadoras de antígeno y presentada a los

---

linfocitos T CD4<sup>+</sup>, los cuales estimulaban a los linfocitos B para la producción de anticuerpos IgA. El acoplamiento de los péptidos de gliadina sucede en las moléculas del MHC clase II DQ2 y DQ8, es decir, en personas con predisposición a desarrollar EC.

La detección de anticuerpos IgA anti tTG se ha propuesto como una prueba presuntiva ideal para el diagnóstico de EC. Esto debido a que es menos costosa que la determinación de anticuerpos anti-endomisio y a su ya mencionada alta especificidad y sensibilidad. Actualmente existen muchos estuches de diagnóstico comerciales para la realización de esta prueba, sin embargo, los valores obtenidos entre ellos no son comparables, debido a la utilización de diferentes sustratos<sup>27</sup>. Entonces resulta de interés primordial la estandarización de éstos ensayos para su implantación como prueba diagnóstica.

### 6.3 Subpoblaciones linfocitarias

La complejidad fenotípica de los LIE es bien conocida, lo que ha sugerido una función diferente para cada subpoblación<sup>19</sup>. El estudio de estas subpoblaciones y su comportamiento es de gran importancia en la caracterización de diversas enfermedades, entre ellas la EC.

Se sabe desde hace muchos años de la relación estrecha que los LIE tienen con la EC, por el importante infiltrado linfocitario presente durante las diferentes etapas de esta enfermedad<sup>28</sup>.

La determinación de valores de LIE normales, para establecer un punto de corte, ha sido estudiada ampliamente, con la finalidad de conocer y establecer, el verdadero incremento de estas células durante la EC. Esto con el objetivo de encontrar una utilidad diagnóstica en ello, incluso algunos estudios señalan que

---

más que la cuantificación de LIE, se debe tomar en cuenta su distribución en las vellosidades intestinales<sup>29</sup>.

La gran mayoría de los estudios sobre LIE se realizaron bajo las técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica, sin embargo en este estudio evaluamos los porcentajes de LIE totales, y de las subpoblaciones CD3<sup>+</sup>/CD7<sup>+</sup> y TcR $\gamma\delta$ , por la técnica de CF, debido a que con ella se logró estudiar un número mayor de células, a diferencia de la histología en donde sólo se observó una sección de la biopsia, así como, varios marcadores celulares de manera simultánea, y por su alta especificidad y sensibilidad.

Los valores reportados para la cuenta total de LIE mediante la técnica de histología es de 1.8-26 LIE por cada 100 células epiteliales<sup>30</sup>, y aproximadamente un 10% por medio de CF<sup>31</sup>. Nosotros observamos en la cuenta total de LIE un valor medio de 21.9% para el grupo control, valores superiores a lo anteriormente reportado, sin embargo cabe señalar que este grupo está formado por pacientes con alguna patología diferente a diarrea crónica y SAID. A pesar de esto, su mucosa intestinal presentó un proceso inflamatorio crónico, siendo esta alteración probablemente la causa de los valores altos de LIE encontrados.

Tanto en la EC como en la SPB los valores obtenidos para LIE totales, no presentan diferencia significativa. Es bien conocido que durante la EC se presenta un importante infiltrado linfocitario, pero en el caso de la SPB se tiene poca información acerca del comportamiento de los LIE en la mucosa intestinal de éstos enfermos.

Kakar en el 2003<sup>32</sup> observó que 3 pacientes con SPB, presentaron un leve incremento en LIE, pero sin llegar a ser significativo. Por otro lado en este trabajo se observó un incremento de los LIE en el grupo de SPB similar al presentado por

---

los pacientes celíacos. La SPB presenta un cuadro clínico e histológico similar al de la EC por lo que es fácil confundir el diagnóstico.

La subpoblación de LIE CD3<sup>-</sup>/CD7<sup>+</sup> fue descrita recientemente<sup>20</sup> y su función aún es desconocida, sin embargo, se le ha otorgado importancia debido a que sus porcentajes se ven disminuidos durante la EC. Existen pocos trabajos que estudien ésta subpoblación<sup>25, 31</sup>, los cuales fueron encaminados a observar su posible utilidad diagnóstica.

El porcentaje de la subpoblación de LIE CD3<sup>-</sup>/CD7<sup>+</sup>, entre el grupo control y los grupos de EC y SPB, no presentó diferencia significativa, además de que fue similar en los dos grupos. Este resultado difiere con lo reportado en estudios previos<sup>25</sup>, en donde se ha observado una disminución de esta subpoblación durante la EC. Por otro lado, no existen estudios que evalúen el comportamiento de los LIE CD3<sup>-</sup>/CD7<sup>+</sup>, en la SPB por lo que este trabajo es pionero en el área.

La subpoblación de LIE TcR $\gamma\delta$  ha sido ampliamente estudiada y se conoce su notable incremento en los enfermos celíacos<sup>28</sup>. Los valores reportados de esta subpoblación en individuos normales, aun no se han unificado, y pueden variar dependiendo de la técnica empleada, edad y población estudiada. En el caso de los trabajos realizados mediante inmunohistoquímica, se reportó una densidad de 2.3 LIE TcR $\gamma\delta$  por milímetro de epitelio<sup>33</sup>. Por otro lado en los análisis realizados por CF, se ha reportado que aproximadamente el 8% de los LIE expresaron el TcR $\gamma\delta$ . Nuestra investigación aportó un valor medio de 15.3%, para el grupo control, el cual fue mayor a lo anteriormente mencionado, sin embargo cabe recordar que aún no se ha establecido una unificación en los valores normales de esta subpoblación.

En los grupos de EC y SPB se observó un incremento significativo de la subpoblación de LIE TcR $\gamma\delta$  con respecto al grupo control, sin embargo no existe

diferencia entre ellos. El incremento de los LIE TcR $\gamma\delta$  en la EC esta bien documentado y este comportamiento ha sido fuertemente apoyado como una posible técnica de diagnóstico para esta enfermedad<sup>31, 33</sup>. Sólo en el trabajo realizado por Camarero y col's. en el 2000<sup>31</sup>, se compararon los valores de los LIE TcR $\gamma\delta$  en EC contra otras enteropatías. Una diferencia en el porcentaje de esta subpoblación se encontró en biopsias de enfermos celíacos, lo cual les permitió sugerir este análisis como apoyo al diagnóstico de EC. Sin embargo entre las enteropatías estudiadas no se encontraba la enfermedad de SPB. Hasta el momento, este estudio ha sido la única comparación del comportamiento de los LIE TcR $\gamma\delta$  durante estas dos enfermedades, y se observó que por ésta técnica no hay diferencias.

Las observaciones realizadas en los sujetos con SPB y EC sugieren dependencia de esta última sobre la primera, lo cual indicaría que la enfermedad de SPB pudiese ser en algunos sujetos el disparador temprano de la EC. Por los resultados aquí presentados, se pudo observar una transición y superposición de las determinaciones realizadas; que aunque clínicamente fueron diferenciales, metodológicamente no lo fueron de forma contundente. Sin embargo la CF sugiere sutilmente, sin llegar a la significancia de esta prueba, la diferenciación de los sujetos de estudio.

Los resultados obtenidos, no descartan la importancia en la evaluación de las subpoblaciones linfocitarias por CF, como una técnica de apoyo en el diagnóstico de EC. La investigación más a fondo, de otro tipo de moléculas o receptores en los LIE, que se expresen sólo durante la EC podría ser de gran ayuda. De ahí que el estudio de los factores determinantes de la patogénesis de la EC sea de suma importancia.

No obstante que la investigación sobre EC es amplia, su diagnóstico sigue siendo complicado y se requieren más estudios al respecto. Es necesario estandarizar

---

metodologías ya establecidas para unificar resultados y que estas puedan ser aplicables en la práctica. Los estudios relacionados con técnicas de diagnóstico se deben realizar también en población abierta para conocer los verdaderos valores normales. De igual manera se requiere de mayor información acerca de la epidemiología de EC en nuestro país, ya que todos los datos y cifras en la cual se apoyan la mayoría de los trabajos se derivan de población europea donde la incidencia de esta enfermedad es alta. Y como ya fue mencionado en algunas publicaciones<sup>10</sup>, es necesario redefinir al estándar de oro para el diagnóstico de EC, por uno en el cual se incluya la combinación de varias pruebas, que en realidad son las que definen a los enfermos celíacos.

---

## 7. CONCLUSIONES

- Los resultados de histología demostraron un proceso inflamatorio en todos los pacientes sin importar la patología que tenían, lo cual indica que el diagnóstico diferencial de EC por esta técnica no fue definitivo.
- La determinación de anticuerpos IgA anti-tTG fue positiva para todos los enfermos celíacos, siendo una buena herramienta de diagnóstico, sin embargo requiere de un mayor número de sujetos y de otros estudios para su estandarización.
- Se encontró un incremento significativo de los LIE TcR $\gamma\delta$  de los grupos de EC y SPB con respecto al control, sin embargo no hubo diferencia entre ellos.
- En el porcentaje de LIE CD3-/CD7+ entre el grupo control, el de EC y el de SPB no existió diferencia estadísticamente significativa.

---

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ivarsson A, Hernell O, Stenlund H, *et al.* Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2002;75:914-921.
2. Fasano A, Catassi C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 2001;120:636-651.
3. Green P, Jabri B. Coeliac disease. *Lancet* 2003;362:383-391.
4. Sollid LM. Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2002;2:647-655.
5. Schuppan D, Dieterich W. Pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of celiac disease. 2003, en [www.uptodate.com](http://www.uptodate.com)
6. Walker-Smith JA, Guandalini S, Schmitz K. Revised criteria for the diagnosis of celiac disease. Report of working group. *Arch Dis Child* 1990;65:909-911.
7. Farrel R, Kelly C. Diagnosis of celiac sprue. *Am J Gastroenterol* 2001;96:3237-3246.
8. Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, *et al.* Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997;3:797-801.
9. 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;102:330-354.
10. Rostom A, Dubé C, Cranney A, *et al.* Celiac Disease. Summary, Evidence Report/Technology Assessment No. 104. (Prepared by the University of Ottawa Evidence-based Practice Center, under Contract No. 290-02-0021.) AHRQ Publication No. 04-E029-1. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality. June 2004.
11. Molberg Ø, McAdam SN, Körner R, *et al.* Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells. *Nat Med* 1998;4:713-717.
12. Shan L, Molberg Ø, Parrot I, *et al.* Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 2002;297:2275-2279.
13. Jardetzky TS, Brown JH, Gorga JC, *et al.* Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common,

---

polyproline II-like conformation for bound peptides. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1996;93:734-738.

14. Qiao SW, Bergseng E, Molberg Ø, *et al.* Antigen presentation to celiac lesion-derived T cells of a 33-mer gliadin peptide naturally formed by gastrointestinal digestion. *J Immunol* 2004;173:1757-1762.
15. Abbas A, Lichtman A. Cellular and molecular immunology. 5<sup>th</sup> ed. USA, 2003. Chap 4. "The mayor histocompatibility complex". pp 65-80.
16. Murtaugh MP, Arend WP, Davies PJ. Induction of tissue transglutaminase in human peripheral-blood monocytes. *J Exp Med* 1984;159:114-125.
17. Le Naour F, Hohenkirk L, Grolleau A, *et al.* Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics. *J Biol Chem* 2001;276:17920-17931.
18. Clemente MG, De Virgiliis S, Kang JS, *et al.* Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* 2003;52:218-223.
19. Eiras P, Camarero C, León F, *et al.* Linfocitos intraepiteliales en la enfermedad celíaca. *An Esp Pediatr* 2002;56:224-232.
20. Eiras P, Roldán E, Camarero C, *et al.* Flow cytometry description of a novel CD3-/CD7+ intraepithelial lymphocyte subset in human duodenal biopsies: potential diagnostic value in coeliac disease. *Cytometry* 1998;34:95-102.
21. Tanaka Y, Sano S, Nieves E, *et al.* Nonpeptide ligands for human  $\gamma\delta$  T cells. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1994;91:8175-8179.
22. Salerno A, Dieli F, Role of gamma-delta T lymphocytes in immune response in human and mice. *Crit Rev Immunol* 1998;18:327-357.
23. Sugita M, Jackman RM, Grant EP, *et al.* CD1, a new paradigm for antigen presentation and T cell activation. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;87:8-14.
24. Croh V, Steinle A, Bauer S, *et al.* Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial  $\gamma\delta$  T cells. *Science* 1998;279:1737-1740.
25. León F, Roldán E, Sánchez L, *et al.* Human small-intestinal epithelium contains functional natural killer lymphocytes. *Gastroenterology* 2003;125:345-356.

- 
26. Walpole, Myers. Probabilidad y Estadística. 4ª ed. México, 1992. Cap. 14 "Estadística no paramétrica". pp 659-662.
  27. Murdock AM, Johnston SD. Diagnostic criteria for coeliac disease: time of change? *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005;17:41-43.
  28. Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, *et al.* Intraepithelial lymphocytes: exploring the third way in immunology. *Nature Immunol* 2001;2:997-1003.
  29. Goldstein NS. Proximal small-bowel mucosal villous intraepithelial lymphocytes. *Histopathology* 2004;44:199-205.
  30. Hayat M, Cairns A, Dixon MF, *et al.* Quantitation of intraepithelial lymphocytes in human duodenum: what is normal? *J Clin Pathol* 2002;55:393-395.
  31. Camarero C, Eiras P, Asensio A, *et al.* Intraepithelial lymphocytes and coeliac disease: permanent changes in CD3-/CD7+ and T cell receptor  $\gamma\delta$  subsets studied by flow cytometry. *Acta Paediatr* 2000;89:285-290.
  32. Kakar S, Nehra V, Murray JA, *et al.* Significance of intraepithelial lymphocytosis in small bowel biopsy samples with normal mucosal architecture. *Am J Gastroenterol* 2003;98:2027-2033.
  33. Järvinen TT, Kaukinen K, Laurila K, *et al.* Intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *Am J Gastroenterol* 2003;98:1332-1337.