

**AVALUACIÓ DEL PERCENTATGE DE LIMFÒCITS
INTRAEPITELIALS EN BIÒPSIA DUODENAL COM A EINA
DIAGNÒSTICA EN LA MALALTIA CELÍACA**

Natàlia Cabré Margalef

TREBALL FINAL DE GRAU BIOTECNOLOGIA

Tutor acadèmic: Dra. Marta Sanchis Talón

Grau en Biotecnologia

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

marta.sanchis@urv.cat

En cooperació amb: Laboratori d'Anàlisis Clíniques

Hospital Universitari Sant Joan Reus

Supervisors: Dr. Xavier Gabaldó Barrios

Facultatiu Especialista d'Anàlisis Clíniques

xavier.gabaldo@salutsantjoan.cat

Dr. Màrius Juanpere Aixalà

Facultatiu Especialista d'Anàlisis Clíniques

marius.juanpere@salutsantjoan.cat

Jo, Natàlia Cabré Margalef, amb DNI 39470426B, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vida-campus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 6 de Juny de 2023

A handwritten signature in blue ink that reads "Natàlia". The signature is written in a cursive style with a large, circular flourish at the beginning.

ÍNDEX

1.	ABREVIATURES UTILITZADES	4
2.	DADES DEL CENTRE.....	4
3.	RESUM.....	5
4.	INTRODUCCIÓ	6
4.1.	La Malaltia Celíaca	7
4.1.1.	Epidemiologia.....	8
4.1.2.	Etiopatogènia	8
4.1.3.	Presentació de la malaltia	11
4.1.4.	Diagnòstic	13
4.1.5.	Patró Citomètric de Limfòcits Intraepiteliais Intestinals (LIEs) com a mètode de diagnòstic complementari.....	20
5.	JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS	23
6.	MATERIALS	23
7.	METODOLOGIA I PLA DE TREBALL.....	24
8.	RESULTATS I DISCUSSIÓ.....	31
8.1.	Estudi poblacional	31
8.2.	Estudi comparatiu dels percentatges de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 ⁻	39
8.3.	Valors de referència dels percentatges de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 ⁻	41
9.	CONCLUSIONS	43
10.	AUTOAVALUACIÓ	45
11.	BIBLIOGRAFIA.....	46

1. ABREVIATURES UTILITZADES

- **AEM:** anticossos antiendomisi
- **AINEs:** medicaments antiinflamatoris no esteroïdals
- **ASC:** àrea sota la corba
- **ATGT:** anticossos antitransglutaminasa tissular
- **HLA:** antigen leucocitari humà
- **HUSJR:** Hospital Universitari Sant Joan de Reus
- **IgA:** immunoglobulina A
- **IgE:** immunoglobulina E
- **LIEs:** limfòcits intraepiteliais intestinals
- **MC:** malaltia celíaca
- **TG2:** transglutaminasa tissular 2

2. DADES DEL CENTRE

Aquest Treball Final de Grau ha estat realitzat en el Laboratori d'Anàlisis Clíniques del Hospital Universitari Sant Joan de Reus (HUSJR), en l'àrea d'hematologia i bioquímica, coordinada pel Dr. Màrius Juanpere Aixalà i pel Dr. Xavier Gabaldó Barrios, respectivament, ambdós especialistes en anàlisis clíniques.

El Laboratori d'Anàlisis Clíniques del HUSJR està ubicat actualment a la planta baixa de l'edifici CEPID ubicat al polígon Tecnoparc de Reus (Avda. de la Cambra de Comerç, 42, 43204), situat a 2 Km de distància del HUSJR.

L'objectiu del Laboratori d'Anàlisis Clíniques del HUSJR és oferir un ampli catàleg de serveis d'anàlisis clíniques al propi hospital i altres centres sanitaris de la zona, per tal de donar suport als professionals sanitaris a l'hora de prendre decisions clíniques, diagnòstiques i/o terapèutiques. A més, s'implica en el disseny de nous mètodes per a la investigació de processos patològics.

3. RESUM

L'eficàcia de les eines diagnòstiques disponibles actualment per la Malaltia Celíaca (MC) és limitada. Conseqüentment, certs pacients romanen com a casos dubtosos, a l'espera d'un diagnòstic definitiu. La citometria de flux és una eina diagnòstica no implementada habitualment en els serveis clínics que podria millorar l'eficiència del diagnòstic de la MC.

Aquest estudi té com a objectiu principal establir un valor de referència per edat dels percentatges de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻ en pacients celíacs. Addicionalment, es busca relacionar aquests marcadors en alteracions no celíacques i valorar la influència del dèficit d'IgA en la MC.

Dels 282 pacients estudiats, sotmesos a una biòpsia duodenal, el 54,3% presentava un diagnòstic definitiu de MC, el 36,2% no presentava un diagnòstic compatible amb la MC i el 9,6% restant no disposava d'un diagnòstic definitiu.

La gran majoria dels pacients celíacs presentaven anàlisis clínics positius per la MC: un 80,3% presentaven ATGT IgA positiu i un 90% AEM IgA positiu, un 92,8% mostrava histologia compatible amb la MC, un 94,7% exhibia un patró celíac en la citometria de flux, així com una forta predisposició genètica, amb un 86,2% dels individus amb els haplotips HLA de major risc.

Els pacients celíacs i els no celíacs presentaven diferències significatives en els percentatges de LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻ ($p < 0,05$). No s'han trobat diferències significatives entre l'absència o presència de deficiència d'IgA en pacients amb MC en relació als percentatges de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻. En pacients no celíacs, s'han observat diferències significatives en el percentatge de LIEs entre la gastritis per *Helicobacter pylori* i la intolerància al gluten ($p < 0,05$), i entre la gastritis per *H. pylori* i la gastritis crònica o per AINEs ($p < 0,05$).

El percentatge de LIEs no és una bona eina diagnòstica per la MC degut a que, tot i presentar una especificitat superior al 80%, mostrava una sensibilitat molt baixa ($\leq 40\%$), i una ASC baixa ($\leq 0,64$). En canvi, els percentatges de LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻ han mostrat una sensibilitat i especificitat superior al 80% en l'avaluació de pacients amb i sense MC, així com en la classificació segons l'edat (infants o adults) d'aquests grups d'estudi.

Paraules clau: malaltia celíaca, diagnòstic malaltia celíaca, citometria de flux, limfòcits intraepitelials, dèficit immunoglobulina A.

4. INTRODUCCIÓ

La malaltia celíaca (MC) és una condició crònica i autoimmunitària de l'intestí prim que afecta un percentatge significatiu de la població mundial. Caracteritzada per una reacció immunològica anormal al gluten, la MC pot desencadenar una àmplia gamma de símptomes i complicacions que afecten la qualitat de vida dels qui la pateixen (Poddighe & Capittini, 2021).

L'origen del terme celiàquia es basa en la traducció feta per Francis Adams l'any 1856 sobre els textos que inclouen la primera descripció de la MC, feta per Areteu de Capadòcia al segle II a.C., que utilitza la paraula grega *koliakos* per referir-se a problemes intestinals, i que a la vegada deriva de la paraula *koilia*, que significa ventre (Farré & Vilar, 2007).

La primera descripció clara de la malaltia la va realitzar Samuel Gee al 1888, i ja al segle XX, durant la dècada dels cinquanta, es va descriure la toxicitat al gluten, així com les alteracions histològiques en l'intestí prim i el component genètic de la malaltia (Losowsky, 2008). A la dècada dels vuitanta, es van incloure els marcadors serològics de la MC, que van facilitar la detecció de la malaltia i van mostrar que aquesta es podia manifestar en diverses formes clíniques. Poc després, es va descobrir el paper de l'enzim transglutaminasa i la seva relació amb la MC (Farré & Vilar, 2007).

Tot i que la MC era coneguda des de l'Antiguitat, no ha estat fins les últimes dècades que s'ha avançat en la comprensió i diagnòstic d'aquesta malaltia. Avui en dia, tot i la disponibilitat de tests serològics específics, un gran percentatge dels casos romanen encara sense diagnosticar degut a la manca de cribratges serològics, la presentació de símptomes heterogenis i/o una comprensió inadequada de la malaltia (Caio et al., 2019).

Per altra banda, diferents estudis mostren un retard mitjà del diagnòstic d'entre 9 a 13 anys des de l'inici dels símptomes, i d'uns 6 anys des de la primera visita al metge, tenint en compte el temps en derivar el cas des del metge de capçalera

al gastroenteròleg, així com el temps en la realització de proves o l'obtenció de resultats dubtosos (Farré & Vilar, 2007; Norström et al., 2011).

La MC no tractada predisposa a complicacions greus com l'osteoporosi, la infertilitat i altres trastorns autoimmunes. A més, té implicacions negatives en la qualitat de vida dels pacients i suposa un ús augmentat dels serveis sanitaris i dels medicaments (Fuchs et al., 2018). Per tant, la MC continua sent un desafiament en molts aspectes, i la millora en el diagnòstic és clau per fer front a aquesta malaltia.

4.1. La Malaltia Celíaca

La MC és una malaltia inflamatòria crònica d'origen autoimmune que afecta la mucosa de l'intestí prim en individus genèticament susceptibles, on el desencadenant és la ingesta de gluten (Moscoso & Quera, 2015).

El gluten és la principal reserva proteica dels grans de blat, tot i que també està present en altres cereals com l'ordi, el sègol i l'espelta. El gluten està format per una mescla complexa de proteïnes, denominades prolamines, en el cas del blat, principalment per gliadina i glutenina. Aquestes prolamines són insolubles en aigua i es caracteritzen pel seu alt contingut en residus dels aminoàcids glutamina (38%) i prolina (20%) (Biesiekierski, 2017).

La digestió completa del gluten no es pot dur a terme degut a l'elevat contingut de glutamina i prolina i l'alt percentatge d'aminoàcids hidrofòbics, que formen estructures altament compactes que limiten l'accés de les proteases gastrointestinals humanes als llocs de tall de la seqüència peptídica (Wei et al., 2020). La gliadina i la glutenina alberguen almenys 50 seqüències peptídiques immunogèniques.

En condicions normals, la resposta dels individus a les proteïnes de la dieta és de tolerància oral, és a dir, no hi ha resposta immunitària als antígens ingerits (Vallejo, 2013). En el cas de patir la MC, aquests pèptids provoquen una reacció immunitària a l'intestí, ja que són incorrectament reconeguts pel sistema immunitari i provoquen una resposta inflamatòria a nivell de mucosa (Wei et al., 2020).

4.1.1. Epidemiologia

La MC és una malaltia d'impacte a nivell mundial, que afecta tant a individus adults com infants, sent la patologia intestinal crònica genèticament determinada més freqüent (Oxentenko & Rubio-Tapia, 2019).

En la revisió de Lebwohl i Rubio-Tapia (2021) s'evidencia un augment en la prevalença de la MC al llarg del temps. Encara que sembla ser que no existeix una evidència clara d'aquest increment, s'han considerat certs factors que han pogut contribuir-hi, com per exemple: els canvis en el processament i la ingesta de blat en la dieta, el moment d'introducció del gluten en la dieta durant la infància, les millores diagnòstiques, i/o possibles canvis en el microbioma deguts a modificacions en la dieta i els aliments al llarg dels anys, entre d'altres (Oxentenko & Rubio-Tapia, 2019).

La prevalença de la MC a Europa és de l'1%, però varia molt entre països, sent a Espanya del 0,5%, a Alemanya del 0,3% i a Finlàndia del 2,4%. D'altra banda, la prevalença de la MC als Estats Units és del 0,8%. Actualment, la prevalença més elevada reportada és del 5,6% al Sàhara Occidental (Oxentenko & Rubio-Tapia, 2019; Rodríguez-Almagro et al., 2016).

El Document de consens sobre la malaltia celíaca a Catalunya (Castillejo de Villasante et al., 2016) inclou un estudi epidemiològic que mostra una prevalença de la MC del 0,5% en aquesta comunitat autònoma: essent en infants d'1 a 14 anys de l'1,4% i en adults del 0,3%, mentre que s'ha observat una major prevalença en dones que en homes (2,5:1).

Per altra banda, Mariné et al. (2011) mostra que la prevalença de la MC a Espanya era cinc vegades més alta en infants que en adults, mentre que Poddar (2013) indica que la presentació MC clàssica era més freqüent en infants, i la MC no clàssica predominava en adults.

4.1.2. Etiopatogènia

En els individus amb MC es produeix una resposta incorrecta del sistema immunitari als pèptids obtinguts de la digestió parcial del gluten. Aquesta reacció té lloc en individus genèticament susceptibles, és a dir, que presenten els

haplotips HLA-DQ2 i HLA-DQ8 en l'antigen leucocitari humà (HLA) (Wei et al., 2020).

L'HLA és equivalent al complex major d'histocompatibilitat (MHC), però rep aquesta nomenclatura en l'espècie humana. La funció d'aquest tipus de proteïnes és ajudar al sistema immunitari a reconèixer i diferenciar antígens propis i/o nutricionals d'antígens exògens i/o patògens, juntament amb la presentació antigènica (Wei et al., 2020).

Els pèptids immunògens (gliadina i glutenina) pateixen una desamidació per part de la transglutaminasa tissular 2 (TG2). Aquesta desamidació facilita el reconeixement del pèptid per part de l'HLA en les cèl·lules presentadores d'antígens (APC), amb major immunoestimulació en els haplotips HLA-DQ2 i HLA-DQ8 (Wei et al., 2020).

Aquests pèptids immunògens poden arribar a la làmina pròpia del intestí prim a través del transport actiu transepitelial (Figura 4.1.1), on seran captats i presentats per les APC, preferentment amb l'haplotip HLA-DQ2 o HLA-DQ8, entre les quals trobem els macròfags, les cèl·lules dendrítiques i els limfòcits B (Schuppan et al., 2009).

Subseqüentment, té lloc l'activació dels limfòcits T CD4⁺, que alliberen citocines pròpies de la resposta tipus Th1 com l'Interferó γ (IFN- γ), que induiran l'activació dels fibroblasts, i la Interleucina 15 (IL-15), que activarà els limfòcits intraepitelials intestinals (LIEs), causant la remodelació de la lamina pròpia i una atròfia en les vellositats (enteropatia). Per altra banda, també s'alliberen citocines Th2 que estimularan la secreció d'anticossos contra els pèptids desamidats i la TG2 (Schuppan et al., 2009; Wei et al., 2020).

Per tant, en individus genèticament predisposats, que tenen els haplotips HLA-DQ2 i HLA-DQ8 en la presentació antigènica, l'exposició continuada al gluten desencadena una resposta immunitària que afecta les vellositats de la mucosa intestinal. A més, es produeix un augment dels nivells d'antitransglutaminasa tissular (ATGT) en sang, que provocaran una resposta immunitària immediata davant la ingesta de gluten (Wei et al., 2020). Per aquest motiu, és essencial

aturar l'exposició al gluten, per tal d'evitar una progressió de la simptomatologia i danys difícilment reversibles a nivell de la mucosa intestinal.

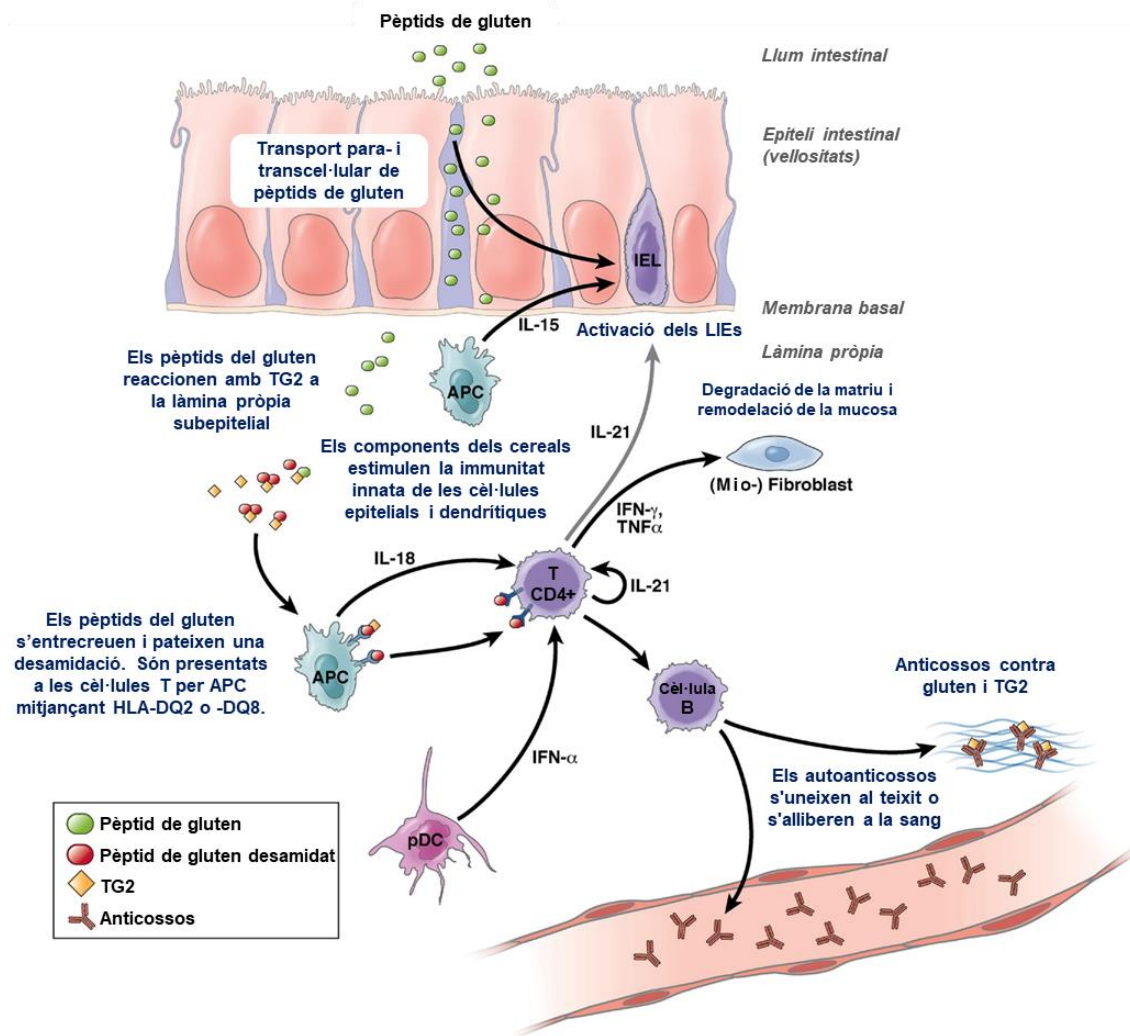


Figura 4.1.1. Patogènesi de la Malaltia Celíaca (MC) (Adaptat de Schuppan et al., 2009).

4.1.2.1. Potencials Factors de Risc

La etiologia de la MC és multifactorial (Husby et al., 2012). Els dos factors principals per a la seva presentació són la susceptibilitat genètica i la ingesta de gluten (Vallejo, 2013).

Els individus que presenten els haplotips HLA-DQ2 i HLA-DQ8, existents en el cromosoma 6, tenen una predisposició genètica a presentar peptíds immunògens del gluten i per tant acabar desenvolupant la enteropatia associada a la MC. Tot i que la presència d'almenys un d'aquests haplotips és necessari, no és suficient per desenvolupar la MC (Lebwohl & Rubio-Tapia, 2021).

Per tant, s'assumeix que existeixen factors ambientals que poden afavorir l'aparició de la malaltia. Entre ells, s'han descrit: el moment d'introducció del gluten i la quantitat d'ingesta de gluten durant la infància, el consum de certs medicaments, infeccions virals digestives, absència de colonització per *Helicobacter pylori*, alteracions en la microbiota digestiva, i la presència d'altres malalties immunitàries o alteracions cromosòmiques (Lebwohl & Rubio-Tapia, 2021). Actualment, els estudis sobre els factors ambientals implicats no són concloents i serien necessaris futurs estudis que mostrin una relació significativa entre els factors de risc descrits i la MC.

4.1.3. Presentació de la malaltia

Les formes de presentació de la MC es poden representar amb el Model del Iceberg (Figura 3.1.2) seguint els criteris establerts per la Societat Europea de Gastroenterologia, Hepatologia i Nutrició Pediàtrica (ESPAGHAN), segons si presenten símptomes i/o lesions intestinals característiques (Husby et al., 2012).

La Figura 4.1.2 mostra que només els individus amb simptomatologia evident són els casos visibles de MC. No obstant, la major part dels individus, amb una simptomatologia inespecífica o absent, són més difícilment identificats i diagnosticats.

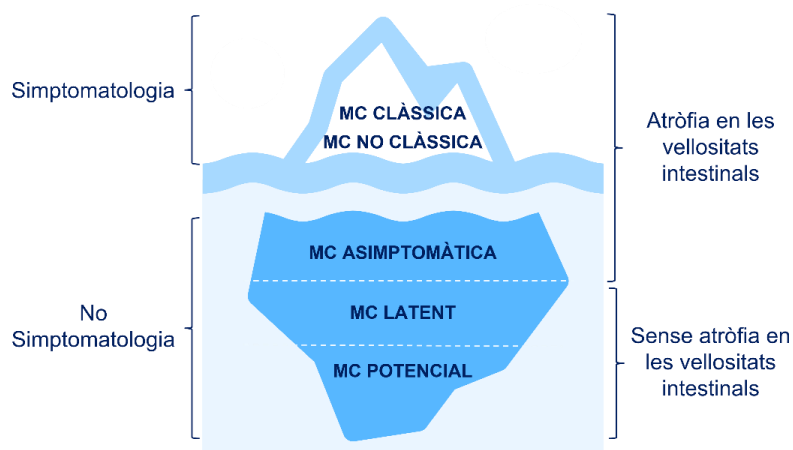


Figura 4.1.2. Formes de presentació de la Malaltia Celíaca (MC): Model del Iceberg (Adaptat de West et al., 2007).

4.1.3.1. Malaltia Celíaca Asimptomàtica

La MC asimptomàtica, o silenciosa, fa referència a aquells pacients que no presenten una simptomatologia associada a la MC, però si presenten una lesió intestinal característica de la malaltia, juntament amb anticossos específics

positius per la MC i HLA permissius. S'acostuma a detectar en estudis poblacionals o en avaluacions de grups de risc genèticament determinats (Castillejo de Villasante et al., 2016; Husby et al., 2012).

4.1.3.2. Malaltia Celíaca Latent

La MC latent es defineix per la presència d'HLA compatibles amb la MC però sense atròfia de les vellositats intestinals en un pacient que, en el passat, ha presentat lesions intestinals causades per la ingesta de gluten (Husby et al., 2012). També s'utilitza aquest terme per referir-se a aquells pacients que presenten una predisposició genètica per la MC i que en el futur poden arribar a patir la malaltia (Castillejo de Villasante et al., 2016).

4.1.3.3. Malaltia Celíaca Potencial

El terme MC potencial és utilitzat per descriure pacients amb una histologia intestinal normal però que tenen risc de desenvolupar MC en el futur, degut a la presència d'anticossos específics per la MC i HLA compatibles (Castillejo de Villasante et al., 2016; Husby et al., 2012). És a dir, a diferència de la MC latent, els individus amb MC potencial presenten serologia positiva.

4.1.3.4. Malaltia Celíaca Simptomàtica

La MC simptomàtica correspon a aquells pacients que presenten evidències gastrointestinals clíniques atribuïdes a la ingesta de gluten (Oxentenko & Rubio-Tapia, 2019). Dins de la MC simptomàtica es troben la presentació clàssica i no clàssica.

Segons el Document de consens sobre la malaltia celíaca a Catalunya (Castillejo de Villasante et al., 2016), el terme MC clàssica s'utilitza per denominar a aquells pacients que presenten signes de malabsorció de macronutrients, incloent diarrea, esteatorrea, pèrdua de pes, anèmia ferropènica i retard en el creixement en el cas dels infants.

Per altra banda, la MC no Clàssica representa aquells pacients que no presenten símptomes de malabsorció de macronutrients i, en canvi, si que poden mostrar una malabsorció selectiva de micronutrients (ferro, calci i/o vitamina D, entre d'altres) i símptomes gastrointestinals (com per exemple reflux gastroesofàgic, dolor i distensió abdominal, vòmits, restrenyiment o símptomes compatibles amb

la síndrome de l'intestí irritable) o extraintestinals (incloent alteració de transaminases, pèrdua de massa òssia, anèmia ferropènica i/o trastorns de fertilitat) (Castillejo de Villasante et al., 2016; Oxentenko & Rubio-Tapia, 2019).

4.1.4. Diagnòstic

Respecte al procediment a realitzar pel diagnòstic de la MC, la sospita de la malaltia en un individu es basa en la presència de símptomes o la pertinença a grups de risc o risc genètic (familiars de pacients diagnosticats, individus amb altres malalties autoimmunes diagnosticades o amb alteracions cromosòmiques).

Com que no existeix cap lesió patognomònica o característica de la MC per establir-ne un diagnòstic definitiu, el diagnòstic d'aquesta malaltia es basa en la combinació de certs criteris clínics i analítics, com són la simptomatologia, les proves serològiques, l'anàlisi histològic de biòpsies duodenals, l'estudi de la predisposició genètica i la resposta a la dieta sense gluten (DSG) (Castillejo de Villasante et al., 2016).

L'estudi de Catassi i Fasano (2010), a partir del qual es basa el Document de consens sobre la malaltia celíaca a Catalunya (Castillejo de Villasante et al., 2016), indica que, per ser confirmat el diagnòstic de la MC, s'han d'obtenir resultats positius o compatibles amb la MC en 4 dels 5 criteris diagnòstics: simptomatologia, serologia, predisposició genètica, histologia i resposta a la DSG, o en 3 de 4 en el cas de que no es disposi d'estudi de predisposició genètica. Els casos dubtosos són aquells que no compleixen 4 dels 5 criteris diagnòstics, però que presenten forts indicis de MC. Aquests casos es mantindran sota vigilància periòdica per poder confirmar o descartar la malaltia en el futur.

Oxentenko i Rubio-Tapia (2019) proposen un algoritme clínic per a l'avaluació de la MC (Figura 4.1.3). Cal destacar que, per tal de dur a terme el diagnòstic, és essencial que el pacient segueixi una dieta amb gluten, i que en cap cas es retiri el gluten de la dieta abans de finalitzar l'estudi diagnòstic (Castillejo de Villasante et al., 2016). Si aquesta condició es compleix (dieta amb gluten), en primer lloc es realitzarà l'estudi serològic.

Si l'estudi serològic es considera positiu, en adults es passa a realitzar un estudi histològic, a partir d'una biòpsia duodenal (Oxentenko i Rubio-Tapia, 2019). En el cas dels infants, per tal d'evitar la biòpsia, es realitza una prova serològica complementària, la detecció d'anticossos antiendomisi (AEM), juntament amb l'estudi de predisposició genètica (Caio et al., 2019). Aquestes dues proves tenen caràcter confirmatori per la MC. En el cas dels adults, l'estudi de predisposició genètica es realitza habitualment en casos dubtosos o grups de risc (Husby et al., 2012).

Davant un estudi serològic negatiu, però amb forts indicis clínics de MC, es realitza un estudi histològic. En cas de que aquest sigui positiu, es realitza finalment un estudi de predisposició genètica per tal de confirmar que l'atròfia digestiva té origen en la MC (Lebwohl & Rubio-Tapia, 2021). Per tant, una serologia negativa en pacients amb atròfia de les vellositats no exclou per complet el diagnòstic de la MC, tot i que el fa menys probable, ja que l'origen de l'atròfia de les vellositats també pot ser deguda a altres patologies, descrites en la Taula 4.1.1 (Rubio-Tapia et al., 2013).

Taula 4.1.1. Altres causes d'atròfia vellositària

(Adaptat de Moscoso & Quera, 2015; Rubio-Tapia et al., 2013).

Desnutrició
Enteritis infecciosa (p.ex., Giardiasis)
Enteritis per radiació
Enteropatia associada a medicaments
Enteropatia autoimmune
Enteropatia per immunodeficiència (p.ex., VIH)
Gastroenteritis eosinofílica
Intolerància alimentària no celíaca
Limfoma intestinal
Malaltia de Crohn
Sobrecreixement bacterià intestinal
Tuberculosis intestinal

En el cas de que el pacient ja segueixi una DSG, es procedeix a realitzar l'estudi de predisposició genètica. Si el resultat és positiu, es contempla la possibilitat de reintroduir el gluten a la dieta per iniciar l'estudi diagnòstic ja descrit.

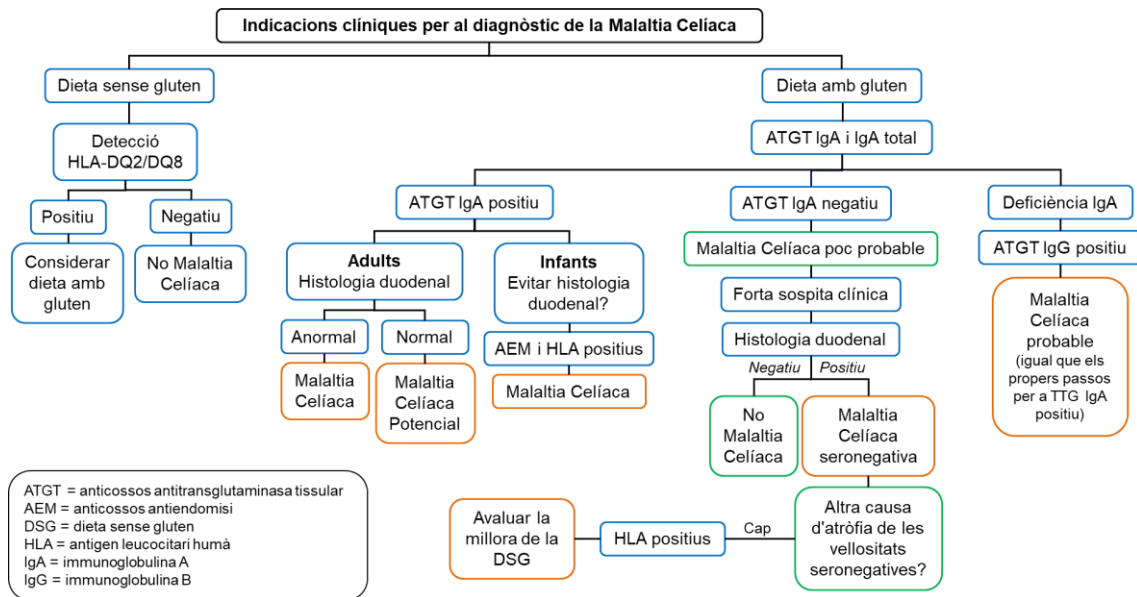


Figura 4.1.3. Algorisme diagnòstic de la Malaltia Celiàca (MC)
(Adaptat de Oxentenko i Rubio-Tapia, 2019).

4.1.4.1. Estudi serològic

L'estudi serològic es basa en la detecció d'anticossos específics de la MC. Són proves amb una elevada sensibilitat i especificitat en casos amb presència d'atròfia de les vellositats de la mucosa intestinal, encara que la seva sensibilitat disminueix en absència d'aquesta atròfia (Castillejo de Villasante et al., 2016).

En l'estudi serològic es poden utilitzar dos marcadors serològics: els anticossos antitransglutaminasa tissular (ATGT) i els anticossos antiendomisi (AEM). Tots dos marcadors poden ser de classe IgA o IgG. Els ATGT de classe IgA són el marcador serològic d'elecció, per la seva elevada sensibilitat (82%) i especificitat (98%). En aquest primer pas s'analitzen els ATGT IgA i els IgA total. Un títol elevat d'ATGT IgA es considera un criteri diagnòstic positiu davant la MC (Oxentenko & Rubio-Tapia, 2019).

De totes formes, en aquesta prova es poden trobar dos altres tipus de resultats possibles: ATGT IgA negatius amb IgA total dins dels valors de referència, o ATGT IgA negatius amb deficiència d'IgA total. En el primer cas, es pot descartar la presència de MC, o seguir amb l'estudi histològic si hi ha una forta sospita de la malaltia (Lebwohl & Rubio-Tapia, 2021). En el segon cas, els pacients presenten un dèficit selectiu d'IgA sèrica total, i són considerats falsos negatius,

pel que caldrà determinar la presència d'ATGT de classe IgG (Rubio-Tapia et al., 2013).

La deficiència d'IgA és la immunodeficiència primària més comú a nivell mundial i està significativament associada a la MC (Poddighe & Capittini, 2021), amb una incidència situada entre el 2 i 3%. Tot i que la majoria d'individus amb dèficit d'IgA són relativament sans, tenen tendència a patir infeccions recurrents, al·lèrgies i malalties autoimmunes (Kumar et al., 2002).

Davant un resultat positiu d'ATGT IgA o ATGT IgG (en cas de dèficit de IgA) en adults, es passa a realitzar l'estudi histològic a partir de biòpsies duodenals. Tanmateix, davant un resultat negatiu d'ATGT IgA o ATGT IgG però amb clars indicis clínics de MC, també es realitza l'estudi histològic (Oxentenko & Rubio-Tapia, 2019).

En infants i adolescents amb resultat positiu d'ATGT IgA o ATGT IgG, s'utilitza el marcador serològic AEM, amb una sensibilitat del 90% i una especificitat del 99%, com a prova confirmatòria, juntament amb l'estudi de predisposició genètica, per evitar l'obtenció d'una biòpsia duodenal per a l'estudi histològic (Oxentenko & Rubio-Tapia, 2019).

4.1.4.2. Estudi histològic

L'estudi histològic de biòpsies duodenals és essencial per confirmar el diagnòstic de la MC en adults (Caio et al., 2019). En infants i adolescents, s'intenta evitar la realització d'una endoscòpia gastrointestinal per obtenir aquestes biòpsies, ja que és una tècnica molt invasiva (Husby et al., 2012).

Per a la realització de l'estudi histològic s'utilitzen tres tipus de classificacions dels criteris histològics: la Classificació Marsh modificada, la Classificació Corazza i la Classificació Ensari (Castillejo de Villasante et al., 2016). Aquest estudi utilitza la Classificació Marsh modificada com a referència.

Les lesions intestinals causades per la MC són un procés dinàmic, en el qual es poden diferenciar diverses etapes i tipus de lesions. Per aquest motiu, la classificació Marsh modificada (Oberhuber, 2000), proposa una distribució en quatre etapes, del tipus 0 al tipus 4.

El tipus 0 correspon a una mucosa sana (Figura 4.1.4), amb un percentatge de limfòcits intraepiteliais intestinals (LIEs) inferior al 40% i una estructura normal de les vellositats i les criptes intestinals. El tipus 1 (Figura 4.1.5A) presenta un percentatge de LIEs superior al 40% i una estructura normal de les vellositats i les criptes. En el tipus 2 s'observa un percentatge de LIEs superior al 40%, una estructura normal de les vellositats i una hiperplàsia de criptes (Corazza & Villanacci, 2005; Oberhuber, 2000).

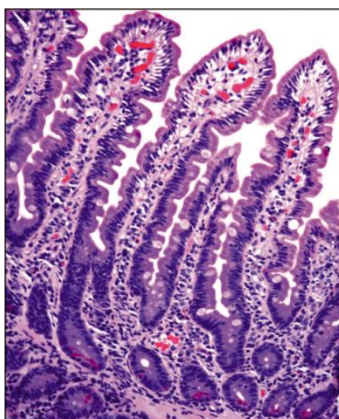


Figura 4.1.4. Tall histològic mucosa duodenal sana (tipus 0)
(Extret de Bao et al., 2012).

El tipus 3 es divideix en tres subgrups diferents depenent del grau d'atròfia de les vellositats. El tipus 3a es caracteritza per un aplanament lleu de les vellositats (atròfia parcial), el tipus 3b per un aplanament marcat (atròfia subtotal) (Figura 4.1.5B) i el tipus 3c per un aplanament total (atròfia total o mucosa plana) (Figura 4.1.5C). A més, els tres subgrups presenten un percentatge de LIEs superior al 40% i una hiperplàsia de criptes (Corazza & Villanacci, 2005; Oberhuber, 2000).

Per últim, el tipus 4, que és molt poc comú, està caracteritzat per una mucosa plana, una estructura normal de les criptes i un percentatge de LIEs dins de la normalitat (inferior al 40%) (Corazza i Villanacci, 2005; Oberhuber, 2000).

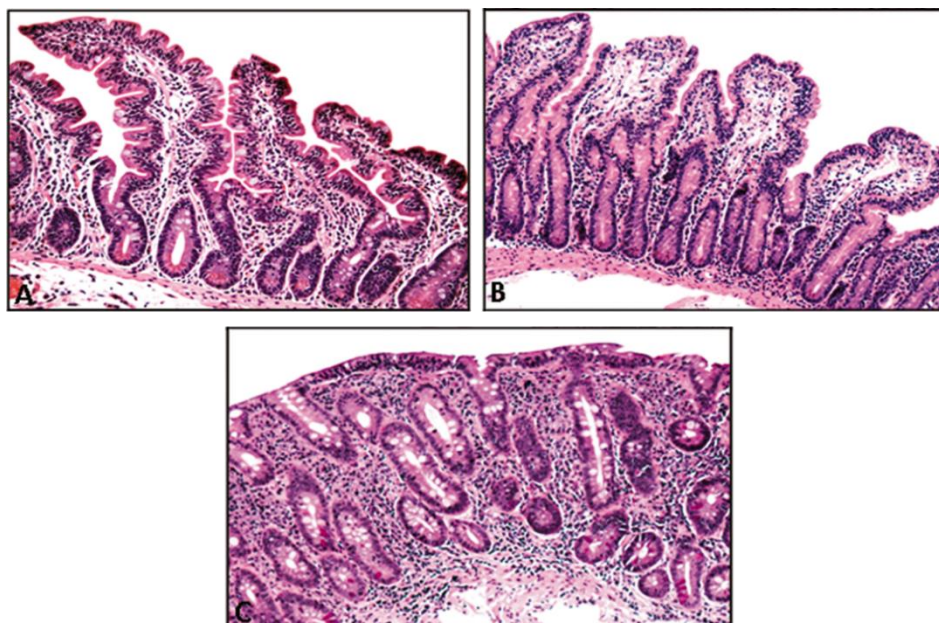


Figura 4.1.5. Tall histològic mucosa duodenal amb lesions de diferents graus de MC: A) Tipus 1, B) Tipus 3b, C) Tipus 3c (Extret de Bao et al., 2012).

4.1.4.3. Estudi predisposició genètica

El risc de presentar MC varia en funció del genotip HLA-DQ present. Hi ha una forta predisposició genètica a patir la MC atribuïda als marcadors genètics específics coneguts com HLA-DQ2 i HLA-DQ8 (Husby et al., 2012).

Les proteïnes presentadores d'antígens del gluten, HLA-DQ2 i HLA-DQ8, són heterodímers constituïts per dues cadenes proteiques diferents, α i β . Els gens que codifiquen per la cadena α i β d'HLA-DQ2 poden variar en funció de la transmissió genètica des dels progenitors. Per altra banda, la transmissió dels gens que codifiquen pel HLA-DQ8 sempre són transmesos de la mateixa manera, a continuació s'exposen els diferents casos segons Castillejo de Villasante et al. (2016):

- Transmissió en *cis* quan la transmissió gènica té lloc des del cromosoma d'un sol progenitor. En el cas de l'HLA-DQ2 (també anomenat HLA-DQ2.5), la cadena α està codificada pel gen *HLA-DQA1*0501* i la cadena β pel gen *HLA-DQB1*0201*. Altrament, en l'HLA-DQ8 la cadena α està codificada pel gen *HLA-DQA1*03* i la cadena β pel gen *HLA-DQB1*0302*.
- Transmissió en *trans* quan la transmissió gènica té lloc des dels dos cromosomes separats dels dos progenitors. En aquest cas, l'HLA-DQ2 (o HLA-DQ2.5) està constituït per una cadena α codificada pel gen *HLA-*

*DQA1*0505* en l'heterodímer HLA-DQ7.5 provinent d'un progenitor i una cadena β codificada pel gen *HLA-DQB1*0202* en l'heterodímer HLA-DQ2.2 provinent de l'altre progenitor. És a dir, es transmeten al·lels procedents dels dos progenitors:

- HLA-DQ2.2: heterodímer constituït per una cadena α codificada pel gen *HLA-DQA1*0201* i una cadena β pel gen *HLA-DQB1*0202*.
- HLA-DQ7.5: heterodímer constituït per una cadena α codificada pel gen *HLA-DQA1*0505* i una cadena β pel gen *HLA-DQB1*0301*.

Per a què l'estudi de predisposició genètica sigui positiu, és necessari que les dues combinacions al·lèliques dels gens *HLA-DQ2* i *HLA-DQ8* que es detallen en la Taula 4.1.2 siguin positives.

Taula 4.1.2. Combinacions al·lèliques dels gens *HLA-DQ2/DQ8* determinades en l'estudi de predisposició genètica (Adaptat de Sollid, 2017).

Al·lels HLA		Haplotip HLA	Resultat	Risc
DQ2.5 <i>cis</i>	<u><i>HLA-DQA1*0501</i></u> - <u><i>HLA-DQB1*0201</i></u>	DR3-DQ2	+	Alt
DQ2.5 <i>trans</i>	<u><i>HLA-DQA1*0505</i></u> - <u><i>HLA-DQB1*0301</i></u>	DR5-DQ7	+	Alt
	<u><i>HLA-DQA1*0201</i></u> - <u><i>HLA-DQB1*0202</i></u>	DR7-DQ2		
DQ2.2	<u><i>HLA-DQA1*0201</i></u> - <u><i>HLA-DQB1*0202</i></u>	DR7-DQ2	+	Baix
DQ7.5	<u><i>HLA-DQA1*0505</i></u> - <u><i>HLA-DQB1*0301</i></u>	DR5-DQ7	+	Molt baix
DQ8	<u><i>HLA-DQA1*0301</i></u> - <u><i>HLA-DQB1*0302</i></u>	DR4-DQ8	+	Baix

L'heterodímer HLA-DQ2.5 està present en el 90-95% dels pacients celíacs, mentre que el 5-10% restant presenta l'heterodímer HLA-DQ8. Per altra banda, un petit percentatge dels pacients celíacs pot portar només un dels al·lels que codifiquen l'heterodímer HLA-DQ2.5, presents en els haplotips HLA-DQ2.2 i HLA-DQ7.5 (Sollid, 2017).

Malauradament, un 30-40% de la població sana també presenta aquests haplotips (HLA-DQ2.5, HLA-DQ8, HLA-DQ2.2 i HLA-DQ7.5), per la qual cosa l'estudi de predisposició genètica és poc específic, ja que la presència d'aquests haplotips no implica el desenvolupament de la malaltia (Sollid, 2017).

L'estudi de predisposició genètica és una prova confirmatòria per la MC en infants i adolescents amb ATGT IgA i AEM IgA positius. Per altra banda, si s'obtenen uns resultats negatius de les proves complementàries, serà necessari

l'estudi histològic per tal de confirmar el diagnòstic (Castillejo de Villasante et al., 2016; Husby et al., 2012).

En el cas dels adults, l'estudi de predisposició genètica es realitza habitualment quan s'obté un resultat negatiu en la determinació d'ATGT IgA. D'aquesta manera, si s'obté un resultat positiu dels haplotips HLA-DQ2 i HLA-DQ8, es pot plantejar realitzar l'estudi histològic per tal d'assegurar el diagnòstic. D'altra banda, un resultat negatiu en l'estudi de predisposició genètica es relaciona amb una baixa probabilitat de MC (Castillejo de Villasante et al., 2016).

4.1.4.4. Resposta a la Dieta Sense Gluten

Per últim, un cop el pacient ha completat l'estudi diagnòstic i aquest ha resultat positiu, es procedeix a iniciar la DSG. Al cap d'uns mesos d'haver retirat el gluten de la dieta, el pacient ha de poder observar una millora en els símptomes gastrointestinals (Castillejo de Villasante et al., 2016).

Per tal de realitzar un control objectiu sobre la resposta a la DSG, s'estableix un protocol de seguiment. En la primera visita de seguiment, que es realitza als 3-6 mesos després d'iniciar la DSG, té lloc una avaluació dels símptomes i l'estat nutricional del pacient, i un estudi serològic. Si els resultats d'aquesta visita són favorables, s'estableix una segona visita 12 mesos després, en la qual es realitzaran una avaluació dels símptomes i l'estat nutricional del pacient, i un estudi serològic i histològic, juntament amb altres proves complementàries, com un hemograma (Rubio-Tapia et al., 2013).

Si la resposta a la DSG al cap d'un any és la esperada, és a dir, no s'observa simptomatologia, s'observa una disminució d'ATGT IgA, i una millor estructura de les vellositats intestinals, es concreta una visita de seguiment anual. Per altra banda, si els resultats de la DSG no són els esperats, s'ha de confirmar si s'està realitzant un adequat compliment de la DSG abans de considerar altres patologies (Rubio-Tapia et al., 2013).

4.1.5. Patró Citomètric de Limfòcits Intraepitelials Intestinals (LIEs) com a mètode de diagnòstic complementari

El diagnòstic de la MC resulta complicat en aquells casos on l'estudi serològic i l'histològic no són concloents. D'aquesta manera, s'ha suggerit l'ús de la

citometria de flux de limfòcits intraepitelials intestinals (LIEs) en els casos dubtosos (Valle et al., 2017).

Els limfòcits intraepitelials intestinals (LIEs) són una població abundant i heterogènia de cèl·lules limfoides que resideixen entre les cèl·lules epitelials intestinals que formen la barrera de la mucosa intestinal (Olivares-Villagómez & Van Kaer, 2017). La població de LIEs es pot determinar mitjançant immunohistoquímica o citometria de flux. Aquesta última tècnica té l'avantatge d'oferir els resultats de forma ràpida i amb una elevada sensibilitat i reproductibilitat (Fernández-Bañares et al., 2014).

La citometria de flux és una tècnica que permet analitzar simultàniament múltiples paràmetres d'una mostra de cèl·lules en suspensió, i ofereix la possibilitat de separar les cèl·lules en funció de les seves característiques fisicoquímiques, com la mida cel·lular, la complexitat cel·lular, la fluorescència i la unió a receptors, entre d'altres (Adan et al., 2017).

Per aquest motiu, la citometria de flux és una eina analítica molt poderosa per a l'estudi de cèl·lules immunitàries intestinals, en concret els limfòcits intraepitelials (LIEs), que han demostrat tenir una gran importància en el diagnòstic de la MC (Fernández-Bañares et al., 2014). La població de LIEs en l'epiteli d'una mucosa intestinal sana està format per més d'un 90% de LIEs amb el receptor TCR $\alpha\beta$, menys d'un 10% de LIEs amb el receptor TCR $\gamma\delta$ i un percentatge significativament elevat de LIEs CD3⁻ (Sánchez-Castañón et al., 2016).

S'ha reportat en nombroses revisions un augment dels LIEs en biòpsies duodenals de pacients amb MC, tot i no presentar una atròfia en les vellositats de la mucosa intestinal (Fernández-Bañares et al., 2014; Saborido et al., 2018; Valle et al., 2017). Per tant, aquest augment en la població de LIEs és considerat un segell distintiu de MC (Sánchez-Castañón et al., 2016), tot i que no és específic de la malaltia, ja que pot observar-se en altres trastorns autoimmunes, infeccions virals i diverses malalties gastrointestinals (Puderecki et al., 2019). D'altra banda, el patró compost per un increment permanent i intens de LIEs TCR $\gamma\delta$ i una disminució de LIEs CD3⁻ confereix especificitat per al diagnòstic de la MC (Fernández-Bañares et al., 2014; Sánchez-Castañón et al., 2016).

Fernández-Bañares et al. (2014) han establert uns valors de referència per tal de diagnosticar la MC mitjançant la citometria de flux a partir dels marcadors LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 $^-$. D'aquesta manera, hi ha 3 possibles patrons citomètrics de LIEs: el patró no celíac, i el patró celíac, que pot ser complet o incomplet. El patró no celíac és aquell que presenta unes poblacions de LIEs CD3 $^-$ i LIEs TCR $\gamma\delta$ dins de l'interval de la normalitat (Figura 4.1.6A). El patró celíac complet correspon a una disminució en la població de LIEs CD3 $^-$ per sota dels valors de referència i un increment en la població de LIEs TCR $\gamma\delta$ per sobre dels valors de referència (Figura 4.1.6B). Per últim, existeix el patró celíac incomplet, on apareix únicament un increment en la població dels LIEs TCR $\gamma\delta$, mentre que la població de LIEs CD3 $^-$ es troba dins de l'interval de la normalitat (Figura 4.1.6C).

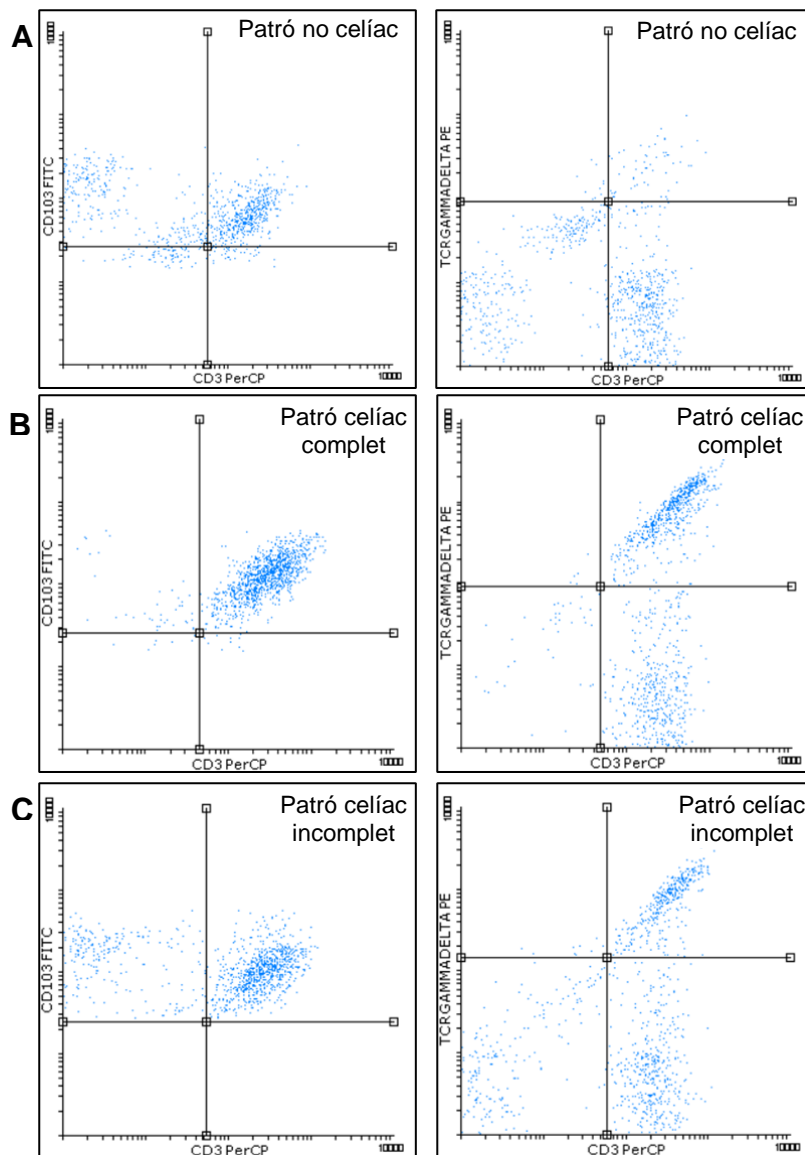


Figura 4.1.6. Representació de la citometria de flux del patró no celíac (A), patró celíac complet (B) i patró celíac (C). Esquerra: LIEs CD3 $^-$. Dreta: LIEs TCR $\gamma\delta$.

5. JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

Els casos dubtosos en la MC limiten l'eficiència del sistema sanitari. Existeixen múltiples publicacions sobre la presentació i el diagnòstic de la MC (Castillejo de Villasante et al., 2016; Oxentenko & Rubio-Tapia, 2019), però la informació sobre com concloure un diagnòstic definitiu en aquells casos on les troballes serològiques, genètiques i/o histològiques no coincideixen totalment amb la MC no estan completament establertes.

Tanmateix, al Laboratori d'Anàlisis Clínics de l'Hospital Universitari Sant Joan de Reus (HUSJR), la citometria de flux s'ha inclòs com a eina diagnòstica en la MC, ja que és una tècnica automatitzada, ràpida i amb una elevada sensibilitat i reproductibilitat, que proporciona informació sobre la població limfocitària de la mucosa intestinal (Fernández-Bañares et al., 2014). La citometria de flux intervindria millorant l'eficiència del diagnòstic de la MC, cosa que suposaria una reducció dels casos dubtosos.

Per tot això, s'ha considerat necessari realitzar aquest estudi, que té com a objectiu principal establir un valor de referència per edat del percentatge de LIEs. Els objectius secundaris són establir un valor de referència per edat de LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 $^{-}$ i relacionar els valors de referència dels LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 $^{-}$ en alteracions no celíiques. Addicionalment, esbrinar quin paper juga el dèficit d'IgA en la MC.

6. MATERIALS

Els materials utilitzats són els arxius d'històries clíniques dels pacients sotmesos a una endoscòpia gastrointestinal amb l'objectiu d'obtenir una biòpsia duodenal del HUSJR entre els anys 2017 i 2022.

- Nombre de pacients estudiats: 282
 - Any 2017: 33 pacients
 - Any 2018: 75 pacients
 - Any 2019: 57 pacients
 - Any 2020: 27 pacients
 - Any 2021: 41 pacients
 - Any 2022: 49 pacients

Cada història clínica conté informació en referència a:

- Informe d'Immunologia i Autoimmunitat. L'estudi serològic inclou les següents determinacions: immunoglobulina A (IgA) total, anticossos

antitransglutaminasa (ATGT) tipus IgA i IgG, anticossos antiendomisi (AEM) tipus IgA i IgG.

- Informe Genètic. L'estudi de la predisposició genètica inclou les determinacions dels HLA-DQ associats a la MC.
- Informe d'Anatomia Patològica. L'estudi anatomopatològic inclou una descripció macroscòpica i microscòpica de les lesions observades en la biòpsia duodenal, juntament amb un diagnòstic histològic a partir de la classificació Marsh modificada.
- Informe de Citometria de Flux per l'estudi de la MC. L'informe de l'anàlisi citomètric inclou l'estudi de les poblacions limfocitàries en la biòpsia duodenal: LIEs TCR $\gamma\delta$ i i LIEs CD3⁻.
- Diagnòstic definitiu. Un cop revisats els resultats de cada informe, es confirma el diagnòstic de MC o, en cas de ser possible, es proposa un diagnòstic alternatiu.

7. METODOLOGIA I PLA DE TREBALL

La elaboració d'aquest Treball Final de Grau es basa en una revisió bibliogràfica a partir de l'ús de diversos recursos bibliogràfics com: revistes, com *The American Journal of Gastroenterology*, i bases de dades, que inclouen Pubmed, Web of Science, ResearchGate, ScienceDirect i Google Scholar, utilitzant com a paraules clau: celiac disease/coeliac disease, gluten, celiac disease diagnosis, celiac disease flow cytometry, intestinal intraepithelial lymphocytes, histopathology celiac disease, entre d'altres.

Posteriorment, el treball s'ha dut a terme en diferents fases:

- Revisió de les històries clíniques dels pacients sotmesos a biòpsia duodenal entre els anys 2017 i 2022, realitzada al HUSJR.
- Classificació de les històries clíniques segons les patologies diagnosticades després de l'estudi serològic, genètic, histològic i citomètric.
- Registre de dades de les poblacions limfocitàries de LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻, així com del percentatge de LIEs, a partir de la citometria de flux de les biòpsies duodenals de cada història clínica.

- Estudi estadístic de tota la informació recollida i avaluació del percentatge de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻ segons diagnòstic i grup d'edat.

7.1.Històries clíniques

En el primer pas per a l'estudi estadístic, s'ha dut a terme una revisió de les històries clíniques dels pacients sotmesos a una biòpsia duodenal entre els anys 2017-2022. A continuació, s'han classificat en funció del diagnòstic compatible amb la MC a través dels resultats de l'estudi serològic, de predisposició genètica, histològic i de citometria de flux.

Els resultats de l'estudi serològic s'han classificat segons els valors de referència descrits en la Taula 7.1.1. En el cas d'IgA total, s'ha indicat un rang de referència com a valor fisiològic, per sota del qual es considera una deficiència en la producció d'IgA. Per altra banda, els valors d'ATGT IgA, ATGT IgG, AEM IgA i AEM IgG s'han classificat com a negatiu, positiu o dubtós, respectivament.

Únicament s'han inclòs les dades de l'estudi serològic que han estat determinades en un període de menys de 2 mesos entre l'extracció de la biòpsia duodenal i l'anàlisi serològic, per tal d'assegurar la màxima correlació entre les dues proves.

La prova serològica AEM s'ha inclòs dins del protocol del Laboratori d'Anàlisis Clíniques del HUSJR com a prova complementària a realitzar en casos negatius o dubtosos de ATGT amb forts indicis de MC, independentment de l'edat, o sota demanda del metge responsable.

Taula 7.1.1. Valors de referència dels paràmetres determinats en l'estudi serològic (Extret del protocol del Laboratori d'Anàlisis Clíniques del HUSJR).

	Negatiu	Dubtós	Positiu
IgA total (mg/dL)	Rang fisiològic: 41-297 mg/dL. Deficiència de IgA: <41 mg/dL.		
ATGT IgA (U/mL)	<3	3-10	>10
ATGT IgG (U/mL)	<10	-	10-15
AEM IgA (Títol)	<1/10	-	>1/10
AEM IgG (Títol)	<1/10	-	>1/10

¹Si el valor de IgA total es troba dins del rang fisiològic, es considera vàlid el resultat de ATGT IgA.

Els resultats de l'estudi histològic s'han classificat seguint el criteri histològic de la classificació Marsh modificada (Taula 7.1.2), seguint el protocol establert pel Servei d'Anatomia Patològica del HUSJR.

Taula 7.1.2. Criteri histològic de la classificació Marsh modificada (Oberhuber, 2000).

	% LIEs	Hiperplàsia de criptes	Atròfia de les vellositats
Marsh 0	<40%	No	No
Marsh 1	>40%	No	No
Marsh 2	>40%	Si	No
Marsh 3	a	Si	Lleu
	b	Si	Marcada
	c	Si	Total
Marsh 4	<40%	No	No

Els resultats del l'estudi de predisposició genètica s'han classificat en funció de la positivitat dels haplotips mostrats prèviament en la Taula 4.1.2.

7.2. Determinació del percentatge de LIEs

Per dur a terme l'anàlisi de resultats del citòmetre de flux i determinar el percentatge de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 $^{-}$, s'utilitza el programa Flowing Software 2.5.1 de Turku Bioscience Centre (departament conjunt de la Universitat de Turku i la Universitat Åbo Akademi).

Per a la realització d'aquest treball van ser revisats novament tot els estudis citomètrics dels pacients inclosos en l'estudi i la seva classificació per patrons, per tal d'evitar possibles desviacions derivades de la interpretació dels resultats de diferents analistes clínics.

En primer lloc, es van recopilar tots els arxius generats en el citòmetre de flux corresponents a l'anàlisi de biòpsies duodenals entre els anys 2017 i 2022. El recompte de les cèl·lules epitelials d'interès, així com el càlcul de la seva relació sobre el total de la població cel·lular, es realitza amb l'eina de visualització Dot Plot del programa Flowing Software 2.5.1.

A través d'aquesta eina de visualització, es seleccionen els marcadors SSC (complexitat cel·lular) en l'eix Y i CD45 en l'eix X (detecció de poblacions de limfòcits). Per tant, en aquest Dot Plot (1) es classifiquen les cèl·lules en funció de dos paràmetres, la complexitat cel·lular i la presència del antigen CD45, únicament present en els limfòcits. A continuació, es selecciona una regió d'aquest Dot Plot (1), que agrupa les cèl·lules ubicades en el quadrant inferior dret, considerant que aquestes cèl·lules amb menor complexitat i major expressió de CD45 corresponen a la població de limfòcits (Figura 7.2.1).

A partir del Dot Plot (1) és possible determinar el percentatge de LIEs (Figura 7.2.1), ja que es considera que la població de limfòcits seleccionada en el Dot Plot (1) està formada majoritàriament per LIEs.

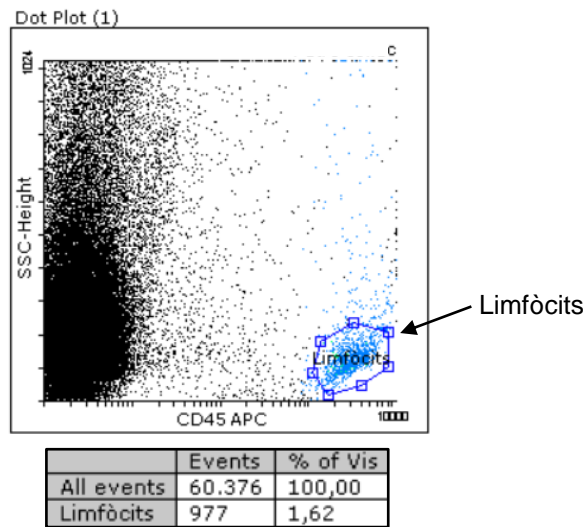


Figura 7.2.1. Visualització de l'arxiu generat en el citòmetre de flux a través de l'eina Dot Plot, utilitzant el marcatge SSC i CD45 per seleccionar la població de limfòcits i determinar el percentatge de LIEs.

Posteriorment, es crea un segon Dot Plot, seleccionant els marcadors CD103 i CD45. L'antigen CD103 s'expressa en limfòcits T associats a mucosa i és utilitzat com a marcadore de LIEs. En el Dot Plot (2) es restringeix la visualització a la regió corresponent a la població de limfòcits prèviament definida al Dot Plot (1). D'aquesta manera, s'obté una visualització clara de la distribució dels limfòcits, que permetrà seleccionar una nova regió concentrada en el centre de la banda dreta. Aquesta nova regió agrupa cèl·lules amb un marcatge positiu per CD103 i CD45 i correspon únicament als LIEs (Figura 7.2.3). Aquest Dot Plot (2) és un pas intermediari per a poder crear dos posteriors Dot Plot i determinar el patró citomètric de LIEs.

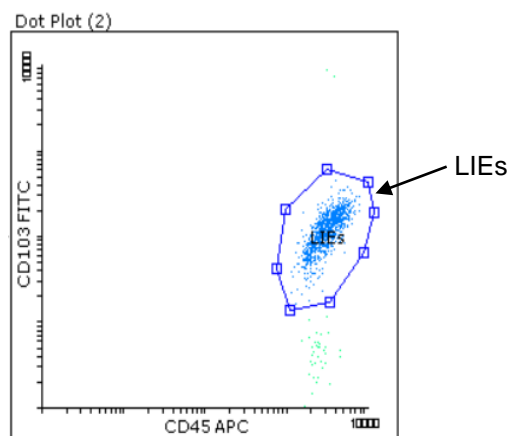


Figura 7.2.3. Visualització de l'arxiu generat en el citòmetre de flux a través de l'eina Dot Plot, utilitzant el marcatge CD103 i CD45 per seleccionar la població de LIEs.

Per tant, el pas següent es basa en crear els Dot Plot (3) i (4), per tal de determinar el patró citomètric de LIEs: en el Dot Plot (3) es seleccionen els marcadors CD103 i CD3 i en el Dot Plot (4) els marcadors LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3. L'eina de visualització Dot Plot permet la creació de quadrants per tal d'agrupar la població cel·lular majoritària de la mostra. La delimitació dels quadrants ens proporciona els límits regionals per al càlcul dels percentatges de les poblacions de LIEs CD3⁻ i LIEs TCR $\gamma\delta$ (Figura 7.2.4).

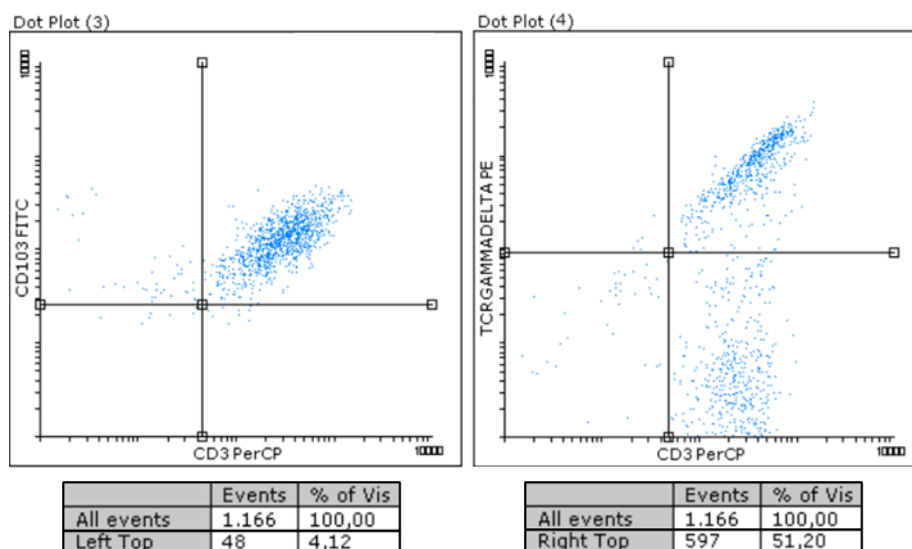


Figura 7.2.4. Visualització de l'arxiu generat en el citòmetre de flux a través de l'eina Dot Plot utilitzant els marcadors CD103 i CD45 en el Dot Plot (3) i TCR $\gamma\delta$ i CD3 en el Dot Plot (4) per determinar el percentatge de LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻.

A partir dels valors de referència establerts per Fernández-Bañares et al. (2014), descrits en la Taula 7.2.1, es pot classificar el patró citomètric de LIEs en patró no celíac, patró celíac complet i patró celíac incomplet, en funció del percentatge de LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻ que presentin les mostres de biòpsia duodenal.

Taula 7.2.1. Valors de referència dels percentatges de LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻ segons el patró citomètric de LIEs (Extret de Fernández-Bañares et al., 2014).

	LIEs TCR $\gamma\delta$	LIEs CD3 ⁻	Diagnòstic celíac
Patró no celíac	$\leq 8,5\%$	$\geq 10\%$	No
Patró celíac complet	$\geq 8,5\%$	$\leq 10\%$	Si
Patró celíac incomplet	$\geq 8,5\%$	$\geq 10\%$	Si

7.3. Estudi estadístic

Per a l'estudi estadístic s'utilitza el programa SPSS STATISTICS software 26.0, de l'empresa IBM.

Tota la informació recollida en les històries clíniques dels pacients estudiats s'ha integrat en una matriu estadística d'aquest programa, per poder avaluar la relació estadística entre els diferents anàlisis realitzats.

En primer lloc, els resultats s'han presentat mitjançant estadístiques descriptives, que ens permeten observar a nivell poblacional les dades relacionades amb el diagnòstic: l'estudi serològic, l'estudi de predisposició genètica, l'estudi histològic i l'estudi mitjançant citometria de flux.

Les dades corresponents a la simptomatologia i la classificació de la presentació de la malaltia no s'han inclòs en l'estudi ja que el Laboratori d'Anàlisis Clínics del HUSJR no disposa d'aquesta informació. Tampoc hi ha disponible la resposta del pacient a la DSG. Per tant, la valoració de cada cas s'ha realitzat en funció dels tres estudis clínics disponibles als arxius i considerats com a criteris diagnòstics (serologia, predisposició genètica i histologia).

S'han classificat els pacients en tres grups (Figura 7.3.1), segons si presenten un diagnòstic compatible amb la MC (Grup MC), un diagnòstic incompatible amb la MC (Grup No-MC) o si el diagnòstic està en curs (Grup Dx en curs), per tal de mostrar l'edat, el sexe i els resultats dels estudis serològics, histològics, genètics i citomètrics sobre el total de la població i per cada grup. L'estadística descriptiva inclou els pacients amb el diagnòstic en curs, tot i que no es valoren els resultats analítics obtinguts perquè la seva interpretació quedaria pendent d'un diagnòstic definitiu.

En segon lloc, s'han inclòs les dades referents a les medianes dels LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻ dels Grups MC i No-MC, així com la diferenciació en aquestes medianes en el Grup MC segons si els pacients presentaven o no dèficit d'IgA. També s'ha especificat dins del Grup No-MC, els resultats per certes patologies no cel·laques (Figura 7.3.1). Posteriorment, es realitza l'estudi estadístic de les dades obtingudes respecte als marcadors citomètrics.

Totes les variables corresponents a l'estudi citomètric són numèriques o d'escala. Aquestes s'han analitzat mitjançant les proves de Kolmogorov-Smirnov per saber si compleixen o no el criteri de la normalitat. En les variables que no complien el criteri de la normalitat, s'han analitzat les dades amb proves no paramètriques: seleccionant la Prova U de Mann-Whitney si aquestes dades es

relacionaven amb una variable amb dos categories, com per exemple “MC/No-MC”, o mitjançant la Prova de Kruskal-Wallis si la variable tenia més de dues categories, com ara “patologies no celíaques”. A totes les anàlisis s'ha assumit com a significatiu un resultat amb una $p < 0.05$.

Finalment, s'han calculat els valors de referència com a punt de tall dels percentatges de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 $^+$ dels Grups MC i No-MC, obtinguts a través de l'anàlisi de la Corba ROC, per tal de poder utilitzar-los com a eina diagnòstica en la MC. Primer, considerant tota la població d'estudi, i després, acotant-los per rang d'edat (Figura 7.3.1). Els punts de talls obtinguts dels percentatges de LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 $^+$ s'han comparat amb la bibliografia prèvia, en canvi, els de LIEs no han estat descrit prèviament com a eina diagnòstica.

El rang d'edat seleccionat ha estat “menors o majors de 14 anys”. Aquesta edat ha estat escollida perquè és en la qual finalitza l'edat pediàtrica segons el Real Decret 1575/1993, moment en que els pacients passen a ser atesos pel metge de família.

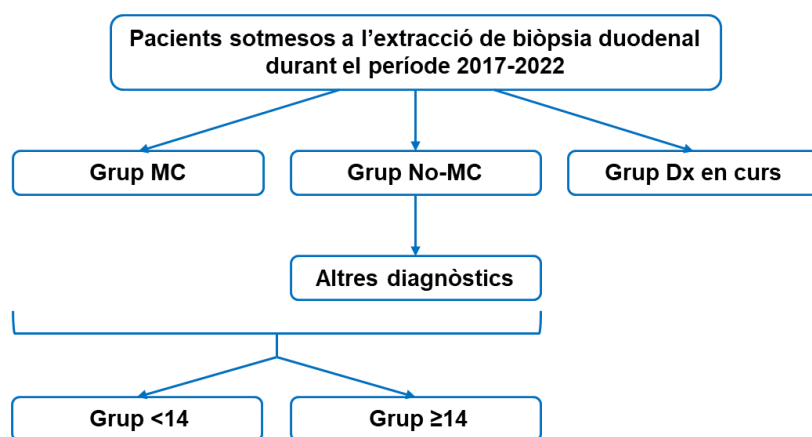


Figura 7.3.1. Classificació dels pacients sotmesos a biòpsia duodenal en l'estudi.

La corba ROC és un gràfic que ens mostra els parells de sensibilitat i especificitat per cada punt de tall a partir dels resultats observats. Aquesta prova és utilitzada per a escollir el punt de tall que presenta una major sensibilitat i especificitat per a cada variable estudiada.

La prova diagnòstica ideal és aquella que presenta una sensibilitat i especificitat tant pròxima al 100% com sigui possible. Es considera una bona eina diagnòstica

la prova que presenta una sensibilitat i especificitat igual o superior al 80% (Burgueño et al., 1995).

La sensibilitat mesura la capacitat d'un marcador de detectar quan la malaltia està present. Per altra banda, l'especificitat mesura la capacitat de descartar una malaltia quan no està present. En aquest estudi s'ha escollit el punt de tall prioritant la millor dada d'especificitat entre parells semblants, ja que es considera prioritari detectar tots els malalts, degut al impacte a nivell alimentari, psicològic i social que té la MC en la vida del pacient (Burgueño et al., 1995).

Per avaluar la fiabilitat de la sensibilitat i l'especificitat dels punts de talls obtinguts, s'ha tingut en compte l'àrea sota la corba (ASC) que mostra la variable analitzada (Figura 7.3.2). Aquesta ASC ens informa sobre la probabilitat de classificar correctament un individu sa o malalt. Per tant, com més proper a 1 és el valor d'aquesta àrea, més fiables són els punts de talls obtinguts (Burgueño et al., 1995).

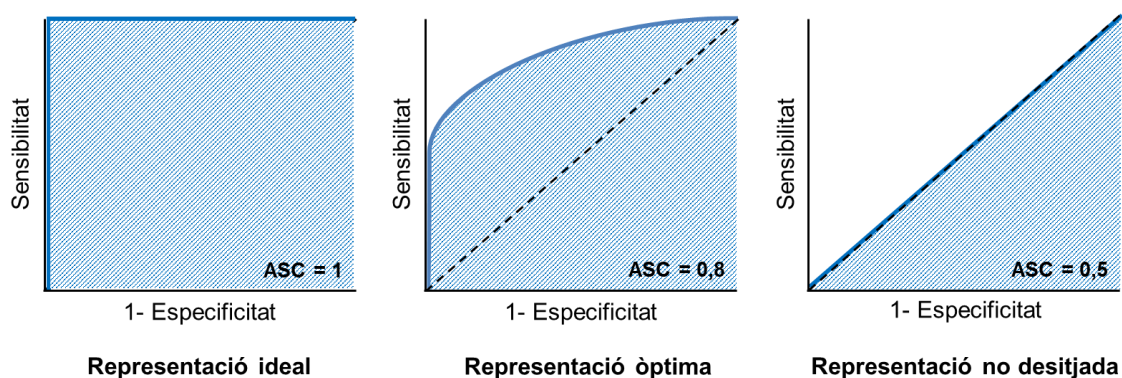


Figura 7.3.2. Exemples de possibles resultats del càlcul de l'àrea sota la corba ROC (ASC) (Adaptat de Janssens & Martens, 2020).

8. RESULTATS I DISCUSSIÓ

8.1. Estudi poblacional

Tal i com es mostra en la Taula 8.1.1, dels 282 pacients inclosos en l'estudi, sotmesos a biòpsia duodenal, un 61,7% corresponia a dones (174 pacients) i un 38,3%, a homes (108 pacients). El rang d'edat era d'entre 1 i 72 anys, amb una mediana de 11 (8-14) anys. S'ha utilitzat la mediana i els percentils 25 i 75, entre parèntesis, per exposar més fàcilment les edats més representatives de cada grup, ja que hi havia una gran dispersió de dades dins dels grups d'estudi.

Aquests resultats ens mostren que la majoria de casos estudiats són de pacients infants i adolescents.

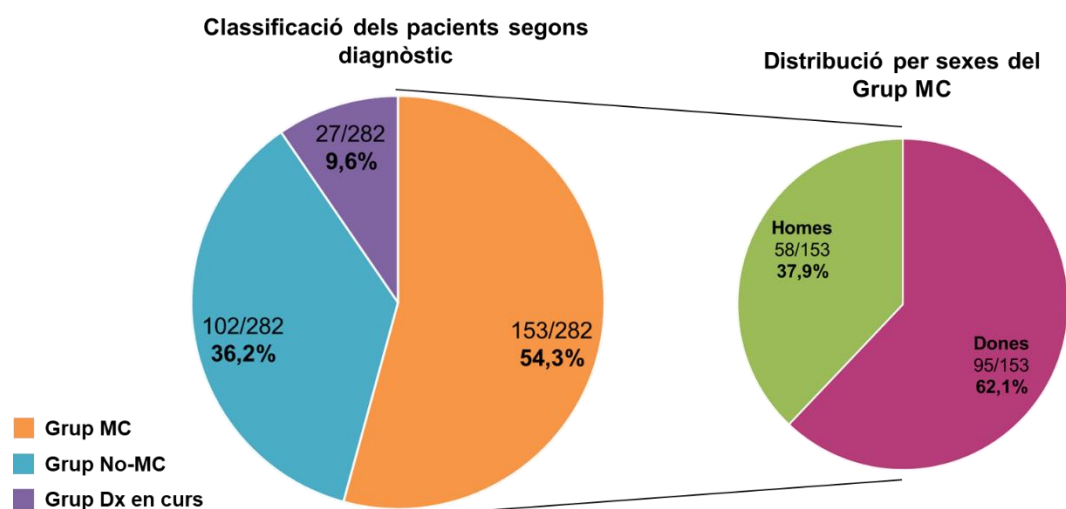
Taula 8.1.1. Distribució segons sexe i edat de la població estudiada.

		Total n=282	Grup MC n=153	Grup No-MC n=102	Grup Dx en curs n=27
Sexe	Dones	174 (61,7%)	95 (62,1%)	57 (55,9%)	22 (81,5%)
	Homes	108 (38,3%)	58 (37,9%)	45 (44,1%)	5 (18,5%)
Edat ¹		11 (8-14) anys	10 (7-13) anys	12 (9-15) anys	13 (8-18) anys

¹ El valor de l'edat es mostra amb la mediana, i entre parèntesi, els percentils 25 i 75.

El 54,3% dels individus (153 pacients) presentava un diagnòstic definitiu de MC (Grup MC), el 36,2% (102 pacients) no presentava un diagnòstic compatible amb la MC (Grup No-MC) i la resta (9,6%), romanien sense un diagnòstic definitiu (Grup Dx en curs) (Gràfic 8.1.1).

Dins del mateix gràfic, s'inclou la distribució per sexes del Grup MC, en que un 62,1% corresponia a dones (95 pacients) i un 37,9%, a homes (58 pacients). Aquestes dades evidencien una major prevalença d'aquesta malaltia en el sexe femení que en el sexe masculí, tal i com ja havien descrit Castillejo de Villasante et al. (2016), tot i que la ràtio en aquesta població d'estudi és inferior (1,6:1). El rang d'edat en aquest grup era d'entre 1 i 40 anys, amb una mediana de 10 (7-13) anys (Taula 8.1.1). El Grup No-MC estava format en un 55,9% per dones (57 pacients) i un 44,1%, d'homes (45 pacients). El rang d'edat en aquest grup era d'entre 2 i 72 anys, amb una mediana de 12 (9-15) anys (Taula 8.1.1).



Gràfic 8.1.1. Representació per percentatges del nombre de pacients per cada grup, i la distribució per sexes del Grup MC.

En la següent taula (Taula 8.1.2), es mostra la presència de gluten a la dieta dels pacients estudiats. Gairebé el total dels casos (97,9%), complien el requisit de seguir una dieta amb gluten per tal d'iniciar l'estudi diagnòstic. Per altra banda, un 2,1% dels pacients ja seguien una dieta sense gluten.

Taula 8.1.2. Distribució de la població estudiada segons la presència de gluten en la dieta.

		Total n=282	Grup MC n=153	Grup No-MC n=102	Grup Dx en curs n=27
Dieta amb gluten	Si	276 (97,9 %)	149 (97,4%)	101 (99%)	26 (96,3%)
	No	6 (2,1%)	4 (2,6%)	1 (1%)	1 (3,7%)

A continuació, es descriuen els resultats serològics i de predisposició genètica realitzats en els pacients sotmesos a biòpsia. Aquests dos estudis no s'han realitzat en el total de pacients del estudi (n=282) degut a criteris mèdics o, tal i com s'ha mencionat en la metodologia, perquè han estat exclosos aquells resultats serològics que tienen una diferència de temps major de 2 mesos entre l'extracció de la biòpsia duodenal i l'anàlisi serològic.

En els estudis serològics corresponents al Grup MC (Taula 8.1.3), els ATGT IgA van ser analitzats en 142 pacients. Es van obtenir resultats positius en el 80,3% dels casos, mentre que el 9,2% corresponia a resultats dubtosos i el 6,3% restant presentava negativitat en els anticossos amb un valor total de IgA dins de la normalitat. D'aquests 9 casos negatius, 6 presentaven histologia compatible amb la MC i tots presentaven predisposició genètica. En el cas dels resultats dubtosos, mostraven també histologia compatible amb la MC en 9 dels 13 casos, i en tots els casos predisposició genètica.

A més, es van detectar 6 casos amb dèficit d'IgA (4,2%), 5 dels quals presentaven positivitat per a l'isotip IgG, i un últim cas amb resultat negatiu per ATGT IgG, que només presentava positivitat per a la prova de predisposició genètica. No es disposa de l'historial clínic complet d'aquest cas per valorar perquè es va considerar un diagnòstic celíac definitiu, tot i no complir la regla 4 de 5.

En els estudis serològics corresponents al Grup No-MC (Taula 8.1.3), els ATGT IgA van ser analitzats en 54 pacients. Es van obtenir resultats negatius en el 77,8% dels casos, el 11,1% corresponia a resultats dubtosos, i el 7,4% restant

presentava un resultat positiu. No es disposa de l'historial clínic complet d'aquests casos positius per valorar perquè es van considerar No-MC, tot i presentar lesions histològiques compatibles. A més, es van detectar 2 casos amb dèficit d'IgA (3,7%), els quals presentaven negativitat per a l'isotip IgG.

Taula 8.1.3. Distribució dels resultats de l'estudi serològic d'ATGT IgA de la població estudiada.

		Total n=217	Grup MC n=142	Grup No-MC n=54	Grup Dx en curs n=21
ATGT IgA	Negatiu	57 (26,3%)	9 (6,3%)	42 (77,8%)	6 (28,6%)
	NV ¹	9 (4,1%)	6 (4,2%)	2 (3,7%)	1 (4,8%)
	Dubtós	24 (11,1%)	13 (9,2%)	6 (11,1%)	5 (23,8%)
	Positiu	127 (58,5%)	114 (80,3%)	4 (7,4%)	9 (42,9%)

¹ NV: casos on les ATGT IgA no són valorables, degut a que el pacient presenta un dèficit en la producció d'IgA totals.

També van ser analitzats els AEM IgA de 130 pacients (Taula 8.1.4), i es van obtenir resultats positius en el 90% dels casos del Grup MC. En els 21 pacients del Grup No-MC, el 95,2% dels casos van ser negatius.

Taula 8.1.4. Distribució dels resultats de l'estudi serològic d'AEM IgA de la població estudiada.

		Total n=165	Grup MC n=130	Grup No-MC n=21	Grup dx en curs n=14
AEM IgA	Negatiu	37 (22,4%)	13 (10%)	20 (95,2%)	4 (28,6%)
	Positiu	128 (77,6%)	117 (90%)	1 (4,8%)	10 (71,4%)

En els estudis histològics corresponents al Grup MC (Taula 8.1.5), es van revisar 153 biòpsies duodenals. El 88,2% van ser catalogades com Marsh 3, amb 23 pacients amb atròfia parcial (Marsh 3a), 64 pacients amb atròfia subtotal (Marsh 3b) i 48 pacients amb atròfia total (Marsh 3c). El 11,8% restant corresponia a 7 pacients amb Marsh 1 i 11 pacients amb Marsh 0. D'aquests 11 pacients amb Marsh 0, 4 individus mostraven resultats serològics i de predisposició genètica positius, la resta no poden valorar-se sense la història clínic completa.

En el cas del Grup No-MC, es van revisar 102 biòpsies duodenals (Taula 8.1.5), i el 90,2% van ser catalogades com Marsh 0. El 9,8% restant corresponia a 8 pacients amb Marsh 1, 1 pacient amb Marsh 3a i 1 pacient amb Marsh 3c. Aquests dos pacients amb atròfia intestinal severa no havien estat diagnosticats amb cap altra patologia no celíaca. No es valora el seu diagnòstic com No-MC per la falta d'historial clínic complet.

Taula 8.1.5. Distribució dels resultats de l'estudi histològic de la població estudiada.

	Total n=282	Grup MC n=153	Grup No-MC n=102	Grup Dx en curs n=27
Marsh 0	119 (42,2%)	11 (7,2%)	92 (90,2%)	16 (59,3%)
Marsh 1	21 (7,4%)	7 (4,6%)	8 (7,8%)	6 (22,2%)
Marsh 2	0	0	0	0
Marsh 3a	24 (8,5%)	23 (15%)	1 (1%)	0
Marsh 3b	68 (54,1%)	64 (41,8%)	0	4 (14,8%)
Marsh 3c	50 (17,7%)	48 (31,4%)	1 (1%)	1 (3,7%)
Marsh 4	0	0	0	0

En els estudis de predisposició genètica (Taula 8.1.6) es van analitzar els genotips HLA-DQ2 i HLA-DQ8 en 180 pacients. En el Grup MC, de 123 pacients, l'haplotip DR3-DQ2 estava present en el 76,4% dels pacients, el DR5-DQ7/DR7-DQ2 en el 9,8%, el DR7-DQ2 en el 4,9%, el DR5-DQ7 en el 0,8%, el DR4-DQ8 en el 5,7% i el 2,4% restant presentava el DR7-DQ2/DR4-DQ8. Aquests resultats demostren que gran part del Grup MC (86,2%) presenten els haplotips de major risc (DR3-DQ2 i DR5-DQ7/DR7-DQ2), demostrant la importància d'aquest factor de risc en l'aparició d'aquesta malaltia, tal i com va descriure Sollid (2017).

En el cas del Grup No-MC, l'haplotip DR3-DQ2 estava present en el 55,6% dels pacients, el DR5-DQ7/DR7-DQ2 en el 8,3%, el DR7-DQ2 en el 5,6%, el DR5-DQ7 en el 2,8% i el DR4-DQ8 en el 19,4% (Taula 8.1.6). De la mateixa forma, la presentació dels haplotips d'alt risc en el Grup No-MC (63,9%), mostra com la predisposició genètica no implica directament el desenvolupament de la malaltia, com ja s'havia observat en estudis previs (Sollid, 2017).

Aquests resultats evidencien, un cop més, que és necessària una recerca més profunda per identificar i quantificar altres factors de risc que, juntament amb la predisposició genètica, indueixen l'aparició de la MC.

Taula 8.1.6. Distribució dels resultats de l'estudi de la predisposició genètica de la població estudiada.

		Total n=180	Grup MC n=123	Grup No-MC n=36	Grup Dx en curs n=21
Haplotips DQ2/DQ8	DR3-DQ2	129 (71,7%)	94 (76,4%)	20 (55,6%)	15 (71,4%)
	DR5-DQ7/DR7-DQ2	17 (9,4%)	12 (9,8%)	3 (8,3%)	2 (9,5%)
	DR7-DQ2	9 (5%)	6 (4,9%)	2 (5,6%)	1 (4,8%)
	DR5-DQ7	2 (1,1%)	1 (0,8%)	1 (2,8%)	0
	DR4-DQ8	16 (8,9%)	7 (5,7%)	7 (19,4%)	2 (9,5%)
	DR7-DQ2/DR4-DQ8 ¹	4 (2,2%)	3 (2,4%)	0	1 (4,8%)
	DR5-DQ7/DR4-DQ8 ²	3 (1,7%)	0	3 (8,3%)	0

¹ L'haplotip DR7-DQ2/DR4-DQ8 representa la combinació dels haplotips DR7-DQ2 (DQ2.2) i DR4-DQ8 (DQ8).

² L'haplotip DR5-DQ7/DR4-DQ8 representa la combinació dels haplotips DR5-DQ7 (DQ7.5) i DR4-DQ8 (DQ8).

En l'estudi de citometria de flux de la població de LIEs (Taula 8.1.7), es van analitzar 153 arxius del Grup MC, on el 86,9% dels pacients van mostrar un patró celíac, mentre que un 7,8% va mostrar un patró incomplet i el 5,3% restant un patró no celíac. Dels 8 casos amb patró no celíac, 6 presentaven histologia compatible amb MC i predisposició genètica, mentre que els altres 2 casos restants no poden ser valorats al no disposar de la història clínica completa.

Respecte al Grup No-MC, es van analitzar 102 arxius (Taula 8.1.7), on el 70,5% dels pacients van mostrar un patró no celíac, mentre que un 29,4% va mostrar un patró celíac, sent 25 pacients amb patró celíac incomplet i 5 amb patró celíac complet. D'aquests 30 casos amb patró celíac, 28 presentaven una histologia normal, i 10 han estat diagnosticats amb altres patologies no celíaques.

Taula 8.1.7. Distribució dels resultats de l'estudi de citometria de flux de la població de LIEs de la població estudiada.

	Total n=282	Grup MC n=153	Grup No-MC n=102	Grup Dx en curs n=21
Patró no celíac	92 (32,6%)	8 (5,3%)	72 (70,5%)	12 (44,4%)
Patró celíac incomplet	45 (16%)	12 (7,8%)	25 (24,5%)	8 (29,6%)
Patró celíac complet	145 (54,4%)	133 (86,9%)	5 (4,9%)	7 (25,9%)

A continuació, s'ha considerat convenient fer un resum gràfic dels resultats dels anàlisi clínics descrits anteriorment, per al Grup MC (Gràfic 8.1.2) i per al Grup No-MC (Gràfic 8.1.3), per facilitar-ne la comparació.

En primer lloc, en termes de proporcions de gènere, es va observar que al Grup MC hi ha un major percentatge de dones diagnosticades en comparació amb els homes. La diferència entre gèneres en la prevalença de la MC ha estat

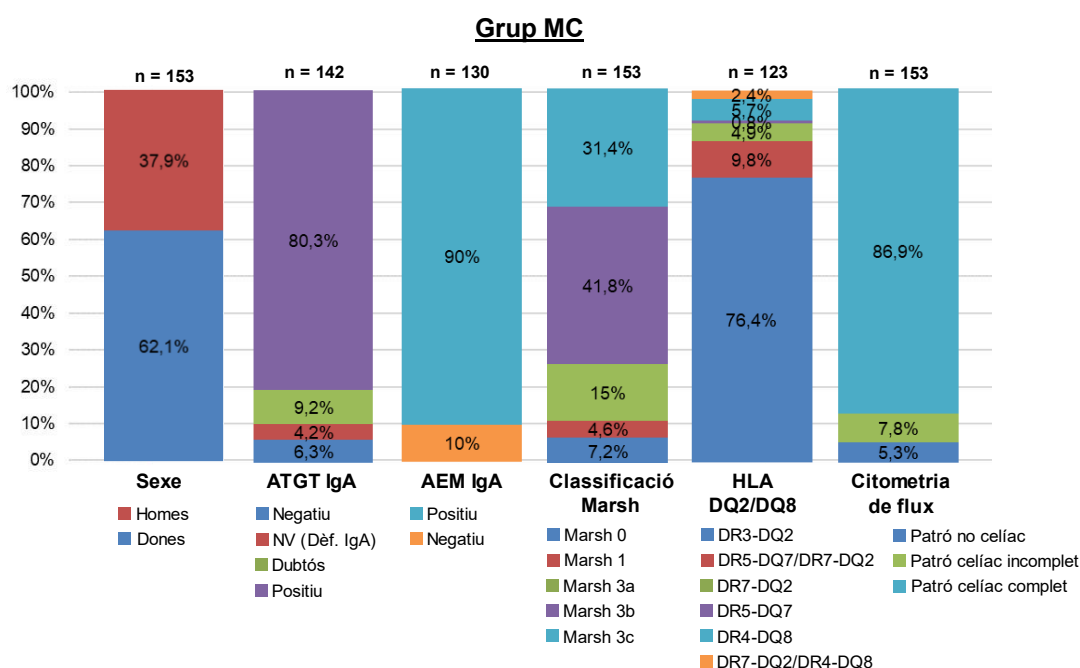
documentada prèviament en estudis epidemiològics (Castillejo de Villasante et al., 2016) i no s'ha observat en el Grup No-MC, on les proporcions entre els gèneres femení i masculí eren similars.

Pel que fa als resultats dels test serològics, es va identificar que la majoria dels individus (més del 80%) del Grup MC presentaven un resultat positiu en les dues proves (ATGT i AEM IgA). Per contra, el Grup No-MC presentava una tendència inversa, amb un nombre més gran de pacients que van obtenir resultats serològics negatius (més del 75%).

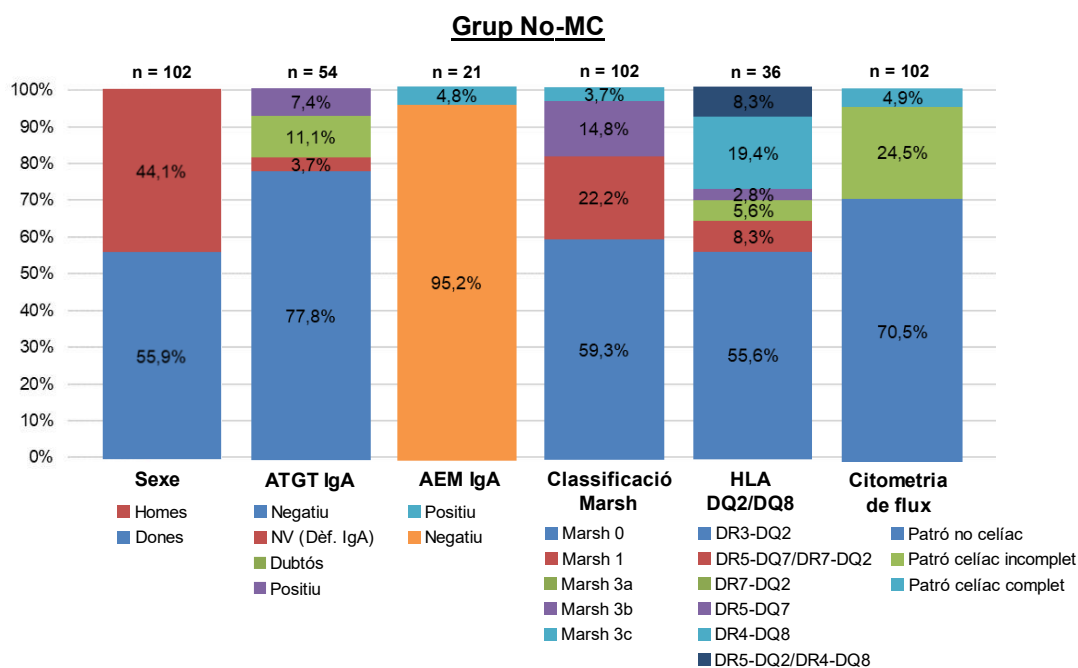
En referència a l'estudi histològic, el Grup MC presentava una histologia compatible amb la MC en el 92,8% dels casos, mentre que un 59,3% dels pacients del Grup No-MC mostraven una histologia sense lesions característiques de la MC.

Finalment, els estudis per citometria de flux al Grup MC van revelar una presència majoritària del patró celíac (94,7%). En contrast, el Grup No-MC va mostrar un percentatge alt d'individus amb un patró no celíac (70,5%).

Per tant, aquests tres anàlisis mostren un gran contrast entre els dos grups d'estudi, mentre que la predisposició genètica no mostra una variació tant acusada.



Gràfic 8.1.2. Distribució per freqüències dels pacients MC segons sexe i estudis serològics, histològics, de predisposició genètica i de citometria de flux.



Gràfic 8.1.3. Distribució per freqüències dels pacients No-MC segons sexe i estudis serològics, histològics, de predisposició genètica i de citometria de flux.

Dins del Grup No-MC (102 pacients), un 46,1% han estat diagnosticats amb altres patologies no celíaques. Aquests 47 pacients han estat classificats en 5 grups (Taula 8.1.8), destacant les quatre malalties que s'han descrit com a causants d'un increment del nombre de LIEs en la mucosa digestiva (Puderecki et al., 2019), que són: Gastritis per *Helicobacter pylori* (37,5%), Intolerància al gluten no celíaca (8,3%), Esofagitis eosinofílica (14,6%), Gastritis (6,3%) i Altres (33,3%).

Taula 8.1.8. Distribució de les patologies digestives no celíaques en pacients del Grup No-MC.

	Freqüència	Percentatge (%)
Gastritis per <i>Helicobacter pylori</i>	18	37,5
Intolerància al gluten no celíaca	4	8,3
Esofagitis eosinofílica ¹	7	14,6
Gastritis ²	3	6,3
Altres ³	16	33,3

¹ Hi ha un individu que presenta dos diagnòstics: Gastritis per *H. pylori* i Esofagitis eosinofílica.

² El grup "Gastritis" consta de dues gastritis cròniques i una gastritis per medicaments antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs).

³ El grup "Altres" està format per: 5 individus amb intolerància alimentària (no al gluten), 4 individus amb epigastràlgia, 3 individus amb reflux gastroesofàgic (GERD), 1 individu amb infecció bacteriana, 1 pacient amb parasitosis, 1 pacient amb duodenitis crònica i 1 pacient amb síndrome de l'intestí irritable (SII).

8.2. Estudi comparatiu dels percentatges de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁺

Continuant la comparativa entre els grups MC i No-MC, es valoren els resultats dels marcadors citomètrics (Taula 8.2.1), on s'ha observat que el Grup MC mostrava unes medianes dels percentatges de LIEs TCR $\gamma\delta$ de 30,90 (21,10-38,17) i LIEs CD3⁺ de 1,94 (1,09-3,77), compatibles amb un patró celíac. A més, existien diferències significatives entre els percentatges de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁺ entre pacients celíacs i no celíacs ($p < 0,05$).

Taula 8.2.1. Mediane dels percentatges de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁺ dels grups MC i No-MC.

	LIEs			LIEs TCR $\gamma\delta$		LIEs CD3 ⁺	
	N	%	p	%	p	%	p
Grup MC	153	1,95 (0,79-4,09)	0,002	30,90 (21,10-38,17)	<0,001	1,94 (1,09-3,77)	<0,001
Grup No-MC	102	1,16 (0,58-2,06)		7,44 (3,56-11,99)		25,41 (14,07-37,94)	

¹ El valor del percentatge de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁺ es mostra amb la mediana, i entre parèntesi, els percentils 25 i 75.

En el Grup No-MC, s'han valorat els marcadors citomètrics per les quatre malalties identificades com a causants d'un increment del nombre de LIEs en la mucosa digestiva (Taula 8.2.2), i s'han observat diferències significatives en el percentatge de LIEs entre la gastritis per *H. pylori* i la intolerància al gluten ($p < 0,05$), i entre la gastritis per *H. pylori* i la gastritis (crònica o per AINEs) ($p < 0,05$). No s'han descobert diferències significatives entre els altres tipus de patologies no celíacues.

Taula 8.2.2. Medianeles dels percentatges de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻ de diferents patologies no celíaqes a l'estudi.

	LIEs			LIEs TCR $\gamma\delta$		LIEs CD3 ⁻	
	N	%	p	%	p	%	p
Gastritis per <i>H. pylori</i>	18	1,04a (0,56-1,26)	0,04	7,91 (5,59-10,88)	0,052	27,80 (21,52-41,12)	0,06
Intolerància al gluten no celíaca	4	1,94b (1,79-2,26)		8,15 (4,56-14,44)		27,92 (17,23-36,13)	
Esofagitis eosinofílica	7	1,15ab (0,28-4,67)		2,81 (0,95-4,20)		24,40 (9,30-57,08)	
Gastritis	3	3,41b (1,19-5,96)		7,03 (5,65-54,07)		2,42 (0,41-25,65)	
Altres	16	1,20ab (0,87-1,71)		5,51 (3,39-9,34)		18,68 (11,46-23,60)	

¹ El valor del percentatge de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻ es mostra amb la mediana, i entre parèntesi, els percentils 25 i 75.

² El percentatge del grup Gastritis és representat amb la mediana i, entre parèntesis, el mínim i el màxim del grup. No s'han pogut calcular els percentils 25 i 75 degut al petit nombre de mostres.

³ Lletres diferents dins de la mateixa columna representen diferències estadísticament significatives (p<0,05).

Per tal d'esbrinar quin impacte tenia el dèficit d'IgA en el diagnòstic dels pacients celíacs es va dur a terme una comparació de les medianes de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻ entre els pacients amb MC amb i sense dèficit d'IgA (Taula 8.2.3). Els resultats han revelat diferències numèriques entre els dos grups d'estudi en les medianes dels tres marcadors, però no s'han observat diferències significatives entre els pacients amb MC que presenten o no dèficit d'IgA.

Cal destacar que en la variable "percentatge de LIEs TCR $\gamma\delta$ " existia una forta tendència estadística (p=0,065) entre els pacients amb MC amb i sense dèficit d'IgA, per lo que seria convenient analitzar un major nombre de casos en estudis futurs per corroborar aquesta troballa.

Taula 8.2.3. Medianeles del percentatge de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻ del grup MC segons si presenten o no dèficit de IgA.

	LIEs		LIEs TCR $\gamma\delta$	LIEs CD3 ⁻
	N	%	%	%
Grup MC sense dèficit IgA	136	1,93 (0,62-4,02)	31,11 (21,56-38,19)	2,08 (1,24-3,79)
Grup MC amb dèficit IgA	6	2,22 (1,13-3,70)	13,30 (8,95-36,75)	1,13 (0,55-8,99)

¹ El valor del percentatge de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻ es mostra amb la mediana, i entre parèntesi, els percentils 25 i 75

8.3. Valors de referència dels percentatges de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 $^{-}$

La Taula 8.3.1 mostra els punts de talls seleccionats de la Corba ROC dels percentatges de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 $^{-}$ de la població MC/No-MC total i d'aquesta mateixa població segons el rang d'edat.

Els punts de tall dels percentatges de LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 $^{-}$ en el total de la població d'estudi van ser de 16,18% i 7,92%, respectivament, amb una especificitat del 88% per al primer, i un 90% per al segon. Aquests punts de talls ja havien estat descrits prèviament per Fernández-Bañares et al. (2014) per cada patró citomètric, mostrant en el seu estudi que aquests marcadors oferien un 85% de sensibilitat i un 100% d'especificitat per al patró celíac complet (valors descrits en l'apartat de metodologia). Els valors d'especificitat no coincideixen entre ambdós estudis, això pot ser degut a diferències en determinacions prèvies, com en la selecció de l'àrea de LIEs en els Dot Plots, o la selecció del punt de tall en la Corba ROC.

Poddar (2013) menciona les diferències en la simptomatologia de la MC entre infants i adults, i en aquest estudi s'ha investigat si aquestes diferències són presents també en els marcadors utilitzats en l'anàlisi per citometria de flux. Només s'ha observat una tendència estadística en la variable LIEs TCR $\gamma\delta$ entre infants i adults ($p=0,099$). De totes formes, s'han valorat els punts de talls dels percentatges de LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 $^{-}$ per edat, i s'ha observat que, degut a la mediana d'edat dels pacients de l'estudi, els percentatges de LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 $^{-}$ del total de població eren molt similars al Grup <14 anys, mentre que en els punts de tall del grup d'adults, els LIEs TCR $\gamma\delta$ es trobaven augmentats (+2,36) i els LIEs CD3 $^{-}$ disminuïts (-0,91), sent la especificitat i la sensibilitat superiors al 80%.

Finalment, centrant l'atenció en la variable percentatge de LIEs, que no ha estat determinada prèviament com a eina diagnòstica, s'ha observat en el total de la població estudiada, així com en la classificació per edats, una especificitat superior al 80%, però una sensibilitat molt baixa ($\leq 40\%$), i una ASC llunyana a 1 ($\leq 0,64$). Per tot l'esmentat, es pot establir que aquest paràmetre no pot ser considerat un bon marcador o eina diagnòstica per la MC.

Taula 8.3.1. Punts de tall de la Corba ROC dels percentatges de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3⁻ de la població MC/No-MC i per grup d'edat.

Variables de resultat de prova		Àrea sota la corba (ASC)	Punt de tall %	Sensibilitat %	Especificitat %
MC/No-MC	LIEs	0,62 (0,55-0,68)	2,71	37	85
	LIEs TCR $\gamma\delta$	0,92 (0,88-0,96)	16,18	87	88
	LIEs CD3 ⁻	0,91 (0,88-0,95)	7,92	88	90
MC/No-MC <14	LIEs	0,64 (0,56-0,72)	2,73	40	90
	LIEs TCR $\gamma\delta$	0,92 (0,88-0,97)	16,18	90	86
	LIEs CD3 ⁻	0,93 (0,89-0,97)	8,32	90	94
MC/No-MC \geq 14	LIEs	0,54 (0,40-0,68)	2,57	34	80
	LIEs TCR $\gamma\delta$	0,91 (0,83-0,99)	18,54	80	97
	LIEs CD3 ⁻	0,87 (0,78-0,96)	7,41	83	83

¹ Els valors indicats com a punt de tall de les variables LIEs i LIEs TCR $\gamma\delta$ indiquen positivitat pel diagnòstic de MC si el pacient presenta un resultat major o igual al punt de tall.

² El valor indicat com a punt de tall de la variable LIEs CD3⁻ indica positivitat pel diagnòstic de MC si el pacient presenta un resultat menor o igual al punt de tall.

³ L'ASC es presenta amb un límit inferior i superior amb un 95% d'interval de confiança entre parèntesi.

9. CONCLUSIONS

- I. Dels 282 pacients inclosos en l'estudi, sotmesos a biòpsia duodenal, el 54,3% dels individus presentava un diagnòstic definitiu de MC, el 36,2% no presentava un diagnòstic compatible amb la MC i el 9,6% restant no disposava d'un diagnòstic definitiu.
- II. En el grup de pacients celíacs, un 80,3% dels individus presentaven ATGT IgA positiu i un 90% AEM IgA positiu, un 92,8% mostrava histologia compatible amb MC i un 94,7% exhibia un patró citomètric celíac, així com una forta predisposició genètica, amb un 86,2% d'individus amb els haplotips HLA de major risc.
- III. Per contra, el grup de pacients no celíacs presentava una tendència inversa en els resultats dels anàlisis clínics: un 77,8% dels pacients mostraven ATGT IgA negatiu i un 95,2% AEM IgA negatiu, un 90,2% presentava histologia normal, un 70,5% indicava un patró no celíac en la citometria de flux, i la predisposició genètica, considerant la prevalença dels haplotips HLA de major risc, era d'un 63,9%.
- IV. Els pacients celíacs i no celíacs mostraven diferències significatives en els percentatges de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 $^{-}$ ($p < 0,05$). En el grup de pacients no celíacs apareixien diferències significatives en el percentatge de LIEs entre la gastritis per *H. pylori* i la intolerància al gluten ($p < 0,05$), i entre la gastritis per *H. pylori* i la gastritis crònica o per AINEs ($p < 0,05$).
- V. No s'han observat diferències significatives entre l'absència o presència de dèficit d'IgA en pacients celíacs en relació als percentatges de LIEs, LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 $^{-}$, tot i que la variable "percentatge de LIEs TCR $\gamma\delta$ " mostrava una forta tendència estadística ($p = 0,065$) entre els pacients celíacs que presentaven o no dèficit d'IgA.
- VI. Els punts de tall de la Corba ROC dels percentatges de LIEs TCR $\gamma\delta$ i LIEs CD3 $^{-}$ en el total de la població d'estudi, i per rangs d'edats (infants o adults), mostraven una sensibilitat i especificitat superior al 80%. S'ha observat una

tendència estadística en la variable “percentatge de LIEs TCR $\gamma\delta$ ” entre infants i adults del total de la població estudiada ($p=0,099$).

- VII. No es considera que el percentatge de LIEs sigui una bona eina diagnòstica per la MC degut a que, tot i presentar una especificitat superior al 80%, mostra una sensibilitat molt baixa ($\leq 40\%$), i una ASC llunyana a 1 ($\leq 0,64$).

10. AUTOAVALUACIÓ

El desenvolupament d'aquest treball m'ha permès, a nivell teòric, assentar els coneixements adquirits durant l'estudi de les assignatures curriculars ja cursades del Grau en Biotecnologia, integrant la informació de diferents camps, com la immunologia, la bioquímica i l'estadística. També he pogut endinsar-me en la branca de la Medicina, i conèixer la metodologia per descriure una malaltia, havent inclòs l'epidemiologia, la simptomatologia i el diagnòstic d'aquesta.

A nivell pràctic, m'ha permès aprendre de primera mà com orientar les diferents etapes d'un estudi científic, incloent el plantejament d'objectius, la cerca d'informació, la gestió i la interpretació de la informació recollida, així com el seu estudi estadístic, on he pogut familiaritzar-me amb un programari especialitzat en estadística, essencial per a qualsevol estudi científic.

Alhora, crec que l'anàlisi clínic és un camp crucial en el diagnòstic de malalties, on queda molt per explorar, i es disposa d'una gran base de dades per aprofundir en la utilització de tècniques, com la citometria de flux, que siguin ràpides i automatitzades, per arribar més fàcilment a un diagnòstic definitiu.

Finalment, voldria agrair a la meva tutora, Marta Sanchis Talón, i els meus supervisors, Xavier Gabaldó Barrios i Màrius Juanpere Aixalà, per la seva paciència, atenció i col·laboració durant la realització d'aquest treball.

11. BIBLIOGRAFIA

- Adan, A., Alizada, G. I., Kiraz, Y., Baran, Y., i Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163-176.
<https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- Bao, F., Green, P. H., i Bhagat, G. (2012). An Update on Celiac Disease Histopathology and the Road Ahead. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 136(7), 735-745. <https://doi.org/10.5858/arpa.2011-0572-ra>
- Biesiekierski, J. R. (2017). What is gluten? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 32, 78-81. <https://doi.org/10.1111/jgh.13703>
- Burgueño, M. J., García-Bastos, J. L., & González-Buitrago, J. M. (1995). Las curvas ROC en la evaluación de las pruebas diagnósticas. *Medicina Clínica*, 104(17), 661-670.
<http://ferran.torres.name/download/shared/roc/ROC%20M1041707.PDF>
- Castillejo de Villasante, G., Fernández-Bañares, F., Esteve, M., Mascort, J.J., Ortola, E., Villar-Balboa, I., Farré-Masip, C., Segarra-Cantón, O., Pujol-Borrell, R., Serra-Farró, J., Carrillo, R., Lozano Fernández, J., & Vílchez, E. (2016). *Document de consens sobre la malaltia celíaca a Catalunya*. gencat.cat. <https://scientiasalut.gencat.cat/handle/11351/2712>
- Catassi, C., i Fasano, A. (2010). Celiac Disease Diagnosis: Simple Rules Are Better Than Complicated Algorithms. *The American Journal of Medicine*, 123(8), 691-693. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2010.02.019>
- Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D. A., De Giorgio, R., Catassi, C., & Fasano, A. (2019). Celiac disease: a comprehensive current review. *BMC Medicine*, 17(142). <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1380-z>
- Corazza, G. R., i Villanacci, V. (2005). Coeliac disease. *Journal of Clinical Pathology*, 58(6), 573-574. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.023978>
- Farré, C., & Vilar, P. (2007). *La malaltia celíaca pas a pas* (2a ed.). Edebé.

- Fernández-Bañares, F., Carrasco, A. M. V., García-Puig, R., Rosinach, M., González, C., Alsina, M. G., Loras, C., Salas, A., Viver, J. M., i Esteve, M. (2014). Intestinal Intraepithelial Lymphocyte Cytometric Pattern Is More Accurate than Subepithelial Deposits of Anti-Tissue Transglutaminase IgA for the Diagnosis of Celiac Disease in Lymphocytic Enteritis. *PLOS ONE*, 9(7), e101249.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101249>
- Fuchs, V., Kurppa, K., Huhtala, H., Mäki, M., Kekkonen, L., & Kaukinen, K. (2018). Delayed celiac disease diagnosis predisposes to reduced quality of life and incremental use of health care services and medicines: A prospective nationwide study. *United European gastroenterology journal*, 6(4), 567-575. <https://doi.org/10.1177/2050640617751253>
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I., Mearin, M., Phillips, A., Shamir, R., Troncone, R., Giersiepen, K., Branski, D., Catassi, C., Lelgeman, M., Mäki, M., Ribes-Koninckx, C., Ventura, A., i Zimmer, K. (2012). European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition Guidelines for the Diagnosis of Coeliac Disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*, 54(1), 136-160.
<https://doi.org/10.1097/mpg.0b013e31821a23d0>
- Janssens, A. C. J., & Martens, F. K. (2020). Reflection on modern methods: Revisiting the area under the ROC Curve. *International Journal of Epidemiology*, 49(4), 1397-1403. <https://doi.org/10.1093/ije/dyz274>
- Kumar, V., Jarzabek-Chorzelska, M., Sulej, J., Karnewska, K., Farrell, T., & Jablonska, S. (2002). Celiac Disease and Immunoglobulin A Deficiency: How Effective Are the Serological Methods of Diagnosis? *Clinical and Vaccine Immunology*, 9(6), 1295-1300.
<https://doi.org/10.1128/cdli.9.6.1295-1300.2002>
- Lebwohl, B., i Rubio-Tapia, A. (2021). Epidemiology, Presentation, and Diagnosis of Celiac Disease. *Gastroenterology*, 160(1), 63-75.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.06.098>

- Losowsky. (2008). A History of Coeliac Disease. *Digestive Diseases*, 26(2), 112-120. <https://doi.org/10.1159/000116768>
- Mariné, M., Farré, C., Alsina, M. G., Vilar, P., Cortijo, M., Salas, A., Fernández-Bañares, F., Rosinach, M., Santaolalla, R., Loras, C., Marques, T., Cusí, V., Hernández, M. H., Carrasco, A. M. V., Ribes, J., Viver, J. M., & Esteve, M. (2011). The prevalence of coeliac disease is significantly higher in children compared with adults. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 33(4), 477-486. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04543.x>
- Moscoso, F., & Quera, R. (2015). ENFERMEDAD CELIACA: REVISIÓN. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 26(5), 613-627. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.09.007>
- Norström, F., Lindholm, L. H., Sandström, O., Nordyke, K., & Ivarsson, A. (2011). Delay to celiac disease diagnosis and its implications for health-related quality of life. *BMC Gastroenterology*, 11(118). <https://doi.org/10.1186/1471-230x-11-118>
- Oberhuber, G. (2000). Histopathology of celiac disease. *Biomedicine i Pharmacotherapy*, 54(7), 368-372. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(01\)80003-2](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(01)80003-2)
- Olivares-Villagómez, D., i Van Kaer, L. (2017). Intestinal Intraepithelial Lymphocytes: Sentinels of the Mucosal Barrier. *Trends in Immunology*, 39(4), 264-275. <https://doi.org/10.1016/j.it.2017.11.003>
- Oxentenko, A. S., i Rubio-Tapia, A. (2019). Celiac Disease. *Mayo Clinic Proceedings*, 94(12), 2556–2571. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2019.02.019>
- Poddar, U. (2013). Pediatric and adult celiac disease: similarities and differences. *Indian Journal of Gastroenterology*, 32(5), 283-288. <https://doi.org/10.1007/s12664-013-0339-9>

- Poddighe, D., & Capittini, C. (2021). The Role of HLA in the Association between IgA Deficiency and Celiac Disease. *Disease Markers*, 2021, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2021/8632861>
- Puderecki, M., Wronecki, L., Ciężczyk, K., & Szumiło, J. (2019). Lymphocytic gastritis. *Polish Journal of Pathology*, 70(3), 155-161. <https://doi.org/10.5114/pjp.2019.90391>
- Rodríguez-Almagro, J., Lucas-Borja, M. E., Lucendo, A. J., Casellas, F., Solano-Ruiz, M. C. M. C., & González, J. S. (2016). Health-related quality of life and determinant factors in celiac disease. A population-based analysis of adult patients in Spain. *Revista Espanola De Enfermedades Digestivas*, 108(4), 181-189. <https://doi.org/10.17235/reed.2016.4094/2015>
- Rubio-Tapia, A., Hill, I. D., Kelly, C. P., Calderwood, A. H., i Murray, J. A. (2013). ACG Clinical Guidelines: Diagnosis and Management of Celiac Disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 108(5), 656-676. <https://doi.org/10.1038/ajg.2013.79>
- Saborido, R., Martínón, N., Regueiro, A., Crujeiras, V., Eiras, P., i Leis, R. (2018). Intraepithelial lymphocyte immunophenotype: a useful tool in the diagnosis of celiac disease. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 74(1), 153-158. <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0586-9>
- Sánchez-Castañón, M., Castro, B. G., Del Carmen Toca, M., Santacruz, C., Loste, M., Iruzubieta, P., Crespo, J. M., i López-Hoyos, M. (2016). Intraepithelial lymphocytes subsets in different forms of celiac disease. *Auto-immunity Highlights*, 7(14). <https://doi.org/10.1007/s13317-016-0085-y>
- Schuppan, D., Junker, Y., i Barisani, D. (2009). Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies. *Gastroenterology*, 137(6), 1912-1933. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.09.008>

- Sollid, L. M. (2017). The roles of MHC class II genes and post-translational modification in celiac disease. *Immunogenetics*, 69, 605-616. <https://doi.org/10.1007/s00251-017-0985-7>
- Valle, J., Morgado, J. A. P., Ruiz-Martín, J., Guardiola, A., Lopes-Nogueras, M., García-Vela, A., Martín-Sacristán, B., i Sánchez-Muñoz, L. (2017). Flow cytometry of duodenal intraepithelial lymphocytes improves diagnosis of celiac disease in difficult cases. *United European gastroenterology journal*, 5(6), 819-826. <https://doi.org/10.1177/2050640616682181>
- Vallejo, S. (2013). *Degradación específica del gluten por la mucosa intestinal de los pacientes celíacos: posible papel en la patogenia y en el diagnóstico de la enfermedad* (Tesi doctoral, Universidad de Valladolid, Castilla y León). <https://uvadoc.uva.es/handle/10324/4077>
- Wei, G., Helmerhorst, E. J., Darwish, G., Blumenkranz, G., i Schuppan, D. (2020). Gluten Degrading Enzymes for Treatment of Celiac Disease. *Nutrients*, 12(7), 2095. <https://doi.org/10.3390/nu12072095>
- West, J., Logan, R. F. A., Hill, P. S., & Khaw, K. (2007). The Iceberg of Celiac Disease: What Is Below the Waterline? *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(1), 59-62. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.10.020>