



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Nuevos Marcadores para la Detección Precoz
de la Enfermedad Celiaca**

D. Sergio Caja Galán

2019



NUEVOS MARCADORES PARA LA DETECCIÓN PRECOZ DE LA ENFERMEDAD CELIACA

Tesis doctoral presentada por
D. Sergio Caja Galán

Dirigida por
Dr. D. José Antonio Pons Miñano

UNIVERSIDAD DE MURCIA
Doctorado en Ciencias de la Salud

Murcia 2018

A mi queridísima esposa Keren,
porque sin ella ningún proyecto puede prosperar.

Agradecimientos

Comprender cuando comienza la enfermedad para poder prevenirla es todo un desafío que combina los conocimientos en biología molecular así como la investigación clínica. El contacto con los pacientes y la comprensión de la enfermedad y su dimensión son muy importantes en un trabajo de estas características y todo un reto para un biólogo molecular, como yo. Adquirir un conocimiento tal, con todas las destrezas necesarias para poder finalizar este trabajo, ha requerido de la participación inestimable de mi director y tutor el Dr. José Antonio Pons Miñano, al que quiero expresar mi más sincero agradecimiento. Cuando hablamos por primera vez de este proyecto, tuve la certeza que trabajaríamos muy bien juntos, y la verdad, ha sido así. José Antonio, tiene una manera sencilla de abordar las cuestiones metodológicas y científicas que hace que sea realmente fácil trabajar con él. Quiero resaltar y agradecer su enfoque positivo a la hora de abordar cualquier cuestión, lo que simplifica todo enormemente y ha permitido acelerar la finalización de este trabajo. Además, me gustaría resaltar que es una persona de un trato muy agradable y sin complicaciones que a pesar de sus múltiples responsabilidades, siempre ha estado disponible para ayudarme en todo, lo que es de agradecer. Su dirección ha sido clave, no sólo para desarrollar todos los aspectos formales y metodológicos de mi tesis doctoral, sino además en otros elementos como son el registro de una patente para la utilización de los resultados encontrados en mi tesis, de la que ambos somos inventores. A pesar de todas estas cuestiones, que han tenido un impacto definitivo en mi formación, hay un aspecto que tengo que resaltar sobre todos los demás y es la importancia que José Antonio da a sus pacientes y a su trabajo clínico, por encima de cualquier otra cuestión. Esto es fundamental en el terreno de la biomedicina, además no sólo determina que es un buen profesional, sino una excelente persona. Por todo ello le estoy tremendamente agradecido.

No puedo olvidarme de expresar mi agradecimiento a la OTRI de la Universidad de Murcia y en especial a Francisco José Miñano García. Para mi ha sido difícil conjugar por un lado todo el tramite y documentación a desarrollar en el registro de la patente de los marcadores descritos en el presente trabajo, al mismo tiempo que trabajaba en los aspectos formativos y metodológicos de mi doctorado. Tanto la OTRI y en especial Francisco, han sido de gran ayuda en este proceso, facilitando y agilizando todas las cuestiones, motivo por el que les estoy enormemente agradecido.

En tercer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a los biobancos que han suministrado las muestras para la realización de este trabajo. De una manera muy especial, tengo que agradecer a los padres o tutores de los niños participantes en nuestros estudios, que con sus muestras han permitido que se pueda dar un paso de gigante en el reconocimiento de esta enfermedad tan compleja de diagnosticar.

Tengo y debo agradecer a Roberto Ouro y a Mari Loli Prieto, por la gran relevancia que han tenido en que pueda desarrollar mi tesis doctoral. Ellos me animaron a iniciar estos estudios doctorales. Además, ellos me han motivado durante el arduo proceso de la realización de este doctorado y en especial en la última fase de escritura de esta tesis.

Mis padres Carlos e Isabel por genética y epigenética son motor de lo que yo soy como persona y como científico. No tengo palabras, para expresar mi gratitud a ellos por inculcarme los valores del aprendizaje continuo, la importancia de hacer siempre un buen trabajo o la necesidad de ayudar con mi trabajo a las personas. Ellos han llenado mi vida de tan buenos recuerdos y enseñanzas que me han traído justo donde estoy ahora. Tengo tanto para agradecerles...

Keren, mi esposa, amiga, confidente, compañera, cuanto tengo yo que agradecerte a ti, no solo por este trabajo y en especial por tus dibujos y esquemas que con tanto talento artístico has realizado. Sin ti, nada de esto sería posible, tu eres el porqué de mi carrera como investigador, el motor y el deseo de ayudar a los demás. Llenas de alegría nuestros días y este trabajo se ha hecho breve y ligero gracias a ti, amiga mía. ¡Cuanto te debemos los celiacos!

Además, quiero agradecer al gran Médico, porque entender la salud y ayudar a los demás a conseguirla, se ha convertido en mi más elevada realización. Porque ¿de qué sirve el conocimiento, sino se usa para hacer de este mundo algo mejor? ¡Gracias!

A ti lector, que has tomado tiempo en leer todo lo que mi corazón quería expresar, también te lo quiero agradecer.

Ahora, ya estamos listos para hablar de ciencia...

Índice de Contenidos

Agradecimientos	5
Abreviaturas.....	10
1. Introducción	11
1. La condición celiaca: todo comienza con el consumo de cereales. 12	
<i>A. Composición del cereal. 12</i>	
<i>B. Los cereales, el gluten y el desarrollo de la celiaquía. 14</i>	
<i>C. Factores de riesgo en la enfermedad celiaca. 18</i>	
2. La celiaquía: clínica y epidemiología. 20	
3. El diagnóstico en la celiaquía: donde estamos y qué nos falta. 24	
<i>3.1 Criterio Diagnóstico Actual. 24</i>	
<i>3.2 Limitaciones en el diagnóstico: la necesidad de nuevos marcadores. 27</i>	
<i>3.3 Nuevos marcadores de identificación: características y objetivos. 30</i>	
<i>3.4 Los vasos sanguíneos en el celíaco: ¿Marcadores de Pronóstico? 32</i>	
2. Hipótesis y Objetivos de la Tesis.....	35
2.1 Hipótesis. 35	
2.2 Objetivos. 35	
3. Material y Métodos	36
1. Descripción de los Pacientes. 37	
2. Descripción de las muestras para estudio de proteómica. 38	
3. Array de proteómica. 39	
<i>3.1 Procesamiento de la muestra de suero. 39</i>	
<i>3.2 Array. 39</i>	
4. Cuantificación de los resultados. 40	
<i>4.1 Analysis y obtención de los datos. 43</i>	
<i>4.2 Representación de los resultados por un “heat map” y diagramas de Venn. 44</i>	
5. Test de Enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) en suero de pacientes: Fases clínicas 2 y 3. 45	
<i>5.1 Grupos experimentales, preparación de muestras y protocolos específicos de los ELISA usados para cada marcador. 45</i>	

- 5.1.1 ELISA para "Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4" TIMP-4. 47
- 5.1.2 ELISA para "Neuregulin" o NRG1- β 1. 49
- 5.1.3 ELISA frente a "Pentraxin-3". 50
- 5.1.4 ELISA para "A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin 1" (ADAMTS-1). 50
- 5.1.5 ELISA para "Angiostatin". 51
- 5.2 Análisis estadístico de los resultados de los ELISA. 52

6. Células. 53

- 6.1 Obtención de Fibroblastos a partir de Biopsias Digestivas. 53
- 6.2 Obtención de células de riesgo. 54

4. Resultados56

1. Proteómica del suero de pacientes: Fase clínica 1. 57

- 1.1 Estudio de marcadores angiogénicos en celíacos. 57
- 1.2. Análisis de los candidatos potenciales para el reconocimiento precoz de la enfermedad celíaca. 62
 - A. Mapas de Expresión o "heat map". 62
 - B. Diagramas de Venn. 64
- 1.3. Estudio de los marcadores angiogénicos en cultivos celulares privados de las acciones del sistema inmunitario. 66

2. Estudio de las proteínas candidatas encontradas en el suero de celíacos: fases clínicas 2-3. 69

- 2.1 Validación de las proteínas que aparecen en celíacos independiente de la fase de la enfermedad: su adecuación como marcadores de pronóstico. 69
 - A. Validación de TIMP-4. 69
 - B. Validación de NRG1- β 1. 70
 - C. Validación de "Pentraxin-3". 74
 - D. Validación de ADAMTS-1. 76
- 2.2 Validación de los marcadores en células endoteliales de cordones umbilicales. 79

3. Estudio de "Angiostatin" como marcador de celiaquía. 80

5. Discusión de los resultados84

1. Proteómica del suero de pacientes: Fase clínica 1. 85

- 1.1 Estudio de marcadores angiogénicos en celíacos. 85
- 1.2. Análisis de los candidatos potenciales para el reconocimiento precoz de la enfermedad celíaca: Mapas de Expresión o "heat map" y diagramas de Venn. 88
- 1.3. Estudio de los marcadores angiogénicos en cultivos celulares privados de las acciones del sistema inmunitario. 91

2. Estudio de las proteínas candidatas encontradas en el suero de celíacos: fases clínicas 2-3. 96

2.1 Validación de las proteínas que aparecen en celíacos independiente de la fase de la enfermedad: su adecuación como marcadores de pronóstico. 96

A. Validación de TIMP-4. 96

B. Validación de NRG1- β 1. 97

C. Validación de "Pentraxin-3". 101

D. Validación de ADAMTS-1. 104

2.2 Limitaciones de nuestro estudio de validación. 108

3. Estudio de "Angiostatin" como marcador de celiaquía. 109

4. Implicaciones de nuestro estudio. 112

4.1 Implicaciones diagnósticas. 112

4.2 Implicaciones en la patogenia y tratamiento de los celíacos. 115

6. Conclusiones120

7. Bibliografía121

Abreviaturas

ADAMTS-1: A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin 1.

anti-TG2: Autoanticuerpo anti-transglutaminasa 2.

APC: Célula presentadora de antígeno.

ARA: Anticuerpo anti-reticulina.

AV: Altura de la vellosidad

DC: Célula dendrítica.

DGP: Anticuerpos anti-gliadina deamidada.

EC: Célula endotelial.

ECM: Matriz Extracelular.

ELISA: Enzimoinmunoanálisis de adsorción.

EMA: Aticuerpos anti-endomisio.

ESPGHAN: Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición
Pediátrica.

HLA: Complejo de histocompatibilidad.

HUVECS: Células endoteliales de cordón umbilical humano.

IELs: Linfocitos intra-epiteliales.

IgA: Inmunoglobulina A.

IgG: Inmunoglobulina G.

NRG1-β1: Neuregulin.

PC: Profundidad de las criptas.

ROC: Curva de característica operativa del receptor.

SNIPs: Single nucleotide polymorphisms.

TG2: Transglutaminasa 2.

TIMP-4: Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4.

TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzine.

1. Introducción

En la sociedad moderna la comida juega un papel muy importante, además de por sus propiedades nutricionales, por su valor socio-cultural. En un mundo globalizado, la dieta occidental de los países industrializados se está imponiendo sobre los modos tradicionales. Además, se estima que en los próximos años se necesitará un aumento en la producción de alimentos alrededor del 70% para cubrir las necesidades de un mundo en continuo crecimiento [1]. Todo esto, ha sido el caldo de cultivo perfecto para el enorme desarrollo que la industria alimentaria ha experimentado en los últimos años. La industrialización de la comida es el detonante de una revolución alimentaria, donde los usuarios están expuestos a nuevas formas de comer y sobre todo a nuevos alimentos. En este contexto, existe un incremento alarmante de las intolerancias alimentarias (definidas como condición no dependiente de IgE y donde interviene el sistema inmune además de otros procesos moleculares asociados). Este incremento en las intolerancias tiene una prevalencia del 20% en la población general, siendo incluso mayor que la de las alergias alimentarias [2, 3]. Pero es que además dichas intolerancias, representan un problema médico severo ya que por ejemplo, el número de hospitalizaciones debidas a esta causa, se ha disparado en un 500% desde 1990 [4]. Esto no solo refleja un incremento en la prevalencia de las intolerancias, sino también una mayor concienciación por parte de la población [5].

Una de las intolerancias alimentarias más graves, porque representa un problema socio-sanitario relevante, es la enfermedad celiaca, definida como una enteropatía inmunomediada cuyo detonante es la existencia del gluten presente en los cereales de la dieta. Por un lado, los pacientes pueden tardar años en ser diagnosticados, lo que afecta de una manera muy importante a su calidad de vida. Por otro lado, los costes médicos asociados con la enfermedad, especialmente antes del diagnóstico, son muy elevados [6]. Es por ello que debido a las consecuencias tan importantes de la enfermedad celiaca en la salud y calidad de vida de los pacientes especialmente de los niños, así como sus implicaciones económicas en el coste sanitario, en los próximos apartados nos detendremos en aspectos tales como la etiología, patogenia o pronóstico para realizar un estudio de los métodos diagnósticos actuales.

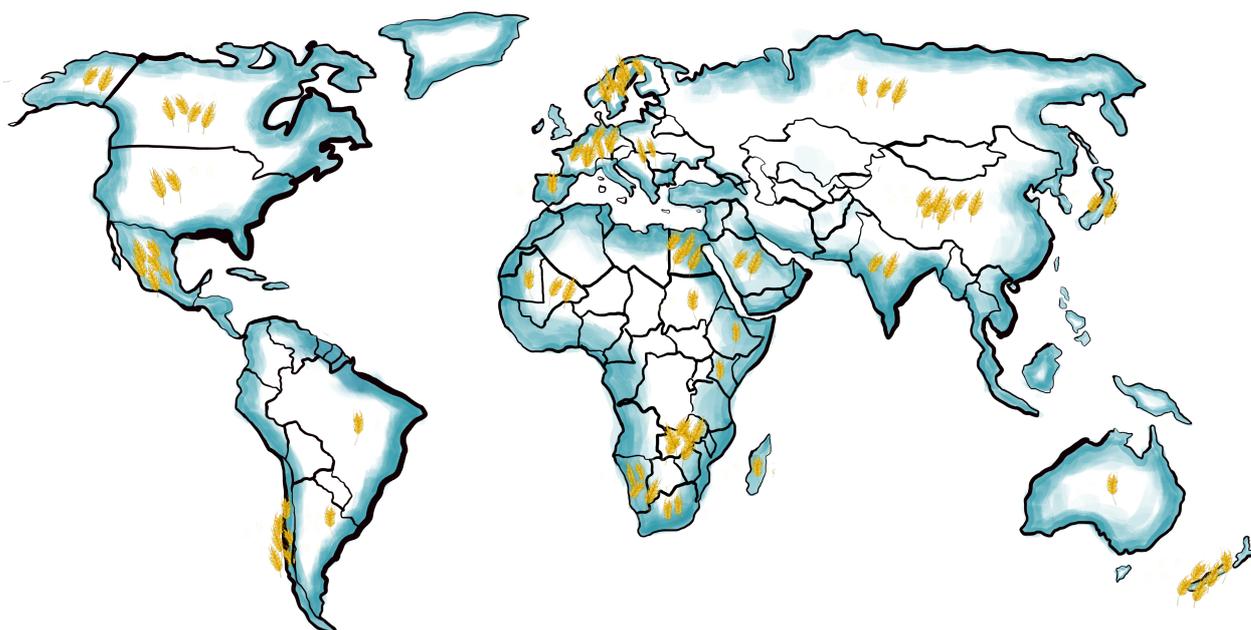
1. La condición celiaca: todo comienza con el consumo de cereales.

A. Composición del cereal.

Los cereales, principalmente el trigo, cebada, centeno y avena, se encuentran de manera continua en nuestra dieta. Aportan buena parte de la ingestión de calorías, por

su consumo directo, o porque se ingieren como constituyentes de buena parte de los alimentos procedentes de la industria. Esta utilización tan masiva del cereal conlleva que exista una producción media de entre 3 a 10 toneladas por hectárea cultivada en los países industrializados, para más información, ver panel 1 [7].

Panel 1. Producción de trigo mundial por países en toneladas por hectárea según datos de 2014. Una mayor producción de cereal, se indica en el mapa por un mayor número de espigas de trigo. Información extraída de [7]. Dibujo realizado por Art Keepers (usado con permiso).



Un grano de cereal, está compuesto en su mayoría por hidratos de carbono, agua, minerales y vitaminas y en menor proporción grasas [8]. Su contenido proteico, varía entre el 8 y el 15% [9], donde el gluten, se correspondería con el 75 al 85% del contenido total de proteína en un grano de cereal [10]. Así pues, lo que solemos llamar gluten se corresponde con una matriz muy compleja de proteínas clasificadas en dos grandes grupos, por un lado la gliadina o porción soluble (50%) y por el otro la porción insoluble o glutenina (50%) [10]. Estas dos porciones, que también se denominan prolaminas, tienen un alto contenido en los aminoácidos prolina (38%) y glutamina (20%) lo que confiere al gluten la capacidad de generar la intolerancia digestiva en los celíacos, además de ser muy apreciado por la industria ya que aporta a los alimentos propiedades aglutinantes y elásticas [9, 10]; (para una mayor información sobre el uso

del gluten en la industria ver el Panel 2). Otras proteínas similares a la gliadina del trigo se encuentran en la secalina del centeno, hordeina en la cebada y todas son responsables de la intolerancia de los celíacos [11]. La porción similar a la gliadina existente en la avena, que se denomina avenina, probablemente porque está presente en una menor proporción, suele presentarse segura para la mayoría de los celíacos, según se ha mostrado en un meta-análisis de casos clínicos [12].

Panel 2: El uso del gluten por la industria alimentaria

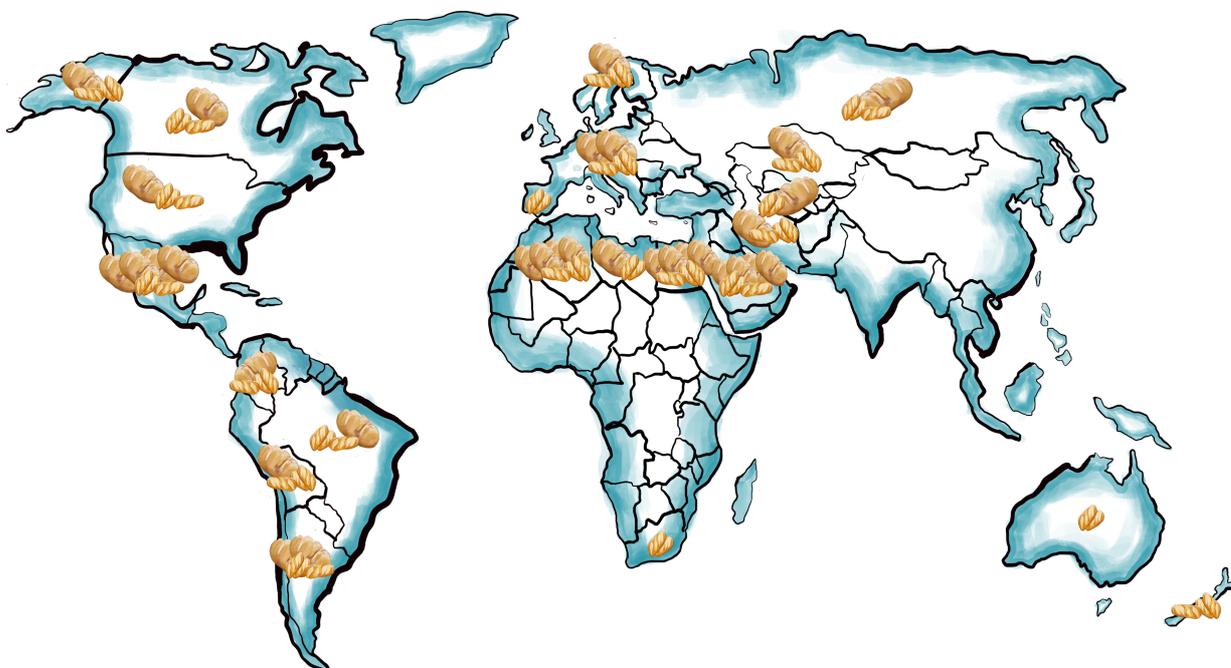
Debido a sus dobles enlaces moleculares, el gluten tiene unas propiedades únicas, que le hacen aportar diferente tipo de consistencia durante la producción de alimentos y por tanto es muy apreciado por la industria alimentaria [10]. Es estable incluso en condiciones de alta temperatura y actúa como agente aglutinante, además se expande y por esto se adiciona a muchos alimentos procesados. Es interesante destacar que la composición del gluten en el grano de cereal, cambia según la humedad de los cultivos así como del tipo de suelo, es decir, que según el país o incluso la región de cultivo, las harinas pueden contener más o menos gluten, incluso el procesamiento del cereal puede contribuir con las variaciones de su contenido [18]. La gliadina en el gluten, confiere las características de hidratación favoreciendo la viscosidad, mientras que la glutenina es responsable de la cohesión y por tanto de la elasticidad, por ejemplo de una masa. Estas características han hecho que las harinas y el gluten usados por la industria se hayan seleccionado según el objetivo final del producto [9]. Por un lado, mejora el sabor, la textura e incluso la humedad del producto, lo que hace que sea muy apreciado en la repostería y en la panadería. Sin embargo, también se usa en las carnes procesadas, como componente en dulces, en productos sustitutivos de la carne aptos para veganos, en salsas e incluso en las cubiertas de ciertos medicamentos. Todo esto hace que el gluten no solo se introduzca en el alimento formando parte de la harina, sino como un aditivo. Por ejemplo, muchos de los panes, pasta, pizzas y otros productos de la repostería tienen dos aportes de gluten, uno como constituyente de la harina y otro aislado en forma de aditivo [9].

B. Los cereales, el gluten y el desarrollo de la celiaquía.

En la cultura gastronómica de los países industrializados, el consumo de los cereales y principalmente del trigo es muy importante, no solo por su valor nutricional sino porque tradicionalmente han constituido el eje de la dieta. En España, se consume una media de entre 25 a 50 kg de pan por persona [13], siendo esta la fuente más importante de gluten en la dieta (una rebanada de pan de 30 gramos suele aportar unos 4 gramos de gluten, para más información, ver panel 3). En un estudio realizado en

Dinamarca se observó que la población entre los 20-75 años comen una media de 10.4 gramos de gluten diarios [14]. Dichos valores son similares a los encontrados en otros países y como media se considera que consumimos de 5 a 20 gramos de gluten por día.

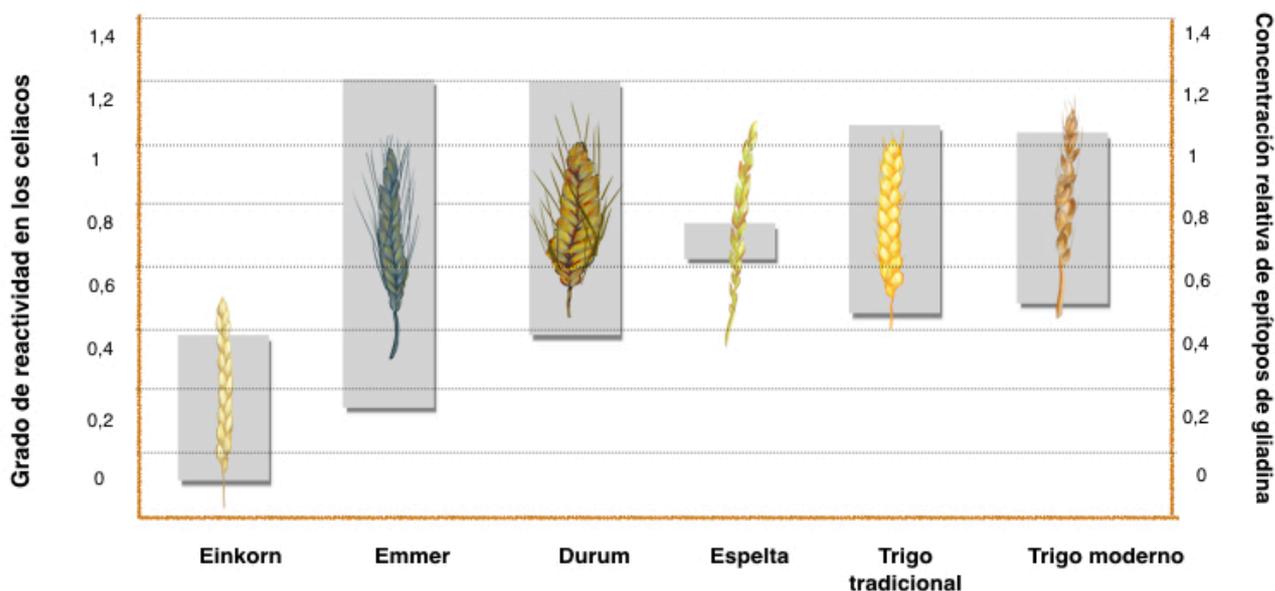
Panel 3. Consumo de pan por persona y por área geográfica, según datos de 2014. Las áreas geográficas donde se consume más pan, se han representado mediante un mayor número de panes, mientras que panes más pequeños y en menor proporción, reflejan un menor consumo. Información extraída de “Bread, Cakes and Pastries: A Global Market Overview” Euromonitor, Jun 2014 [13]. Dibujo realizado por Art Keepers (usado con permiso).



Actualmente, las variedades de cereales usadas tienen una composición de gluten mayor que aquellas más antiguas. Además el uso de levaduras químicas o de diferentes tipos de fertilizantes, favorecen el incremento en el contenido de gluten del cereal [15]. Este incremento en la ingestión del gluten, podría estar relacionado con el incremento de la celiaquía. De hecho, en un estudio realizado en Finlandia se observó que la prevalencia de la enfermedad celiaca se ha duplicado en los últimos 50 años [16]. En otras palabras, hemos creado una industria alimentaria robusta que ofrece productos variados y mejorados pero que para ciertos sectores poblacionales se están volviendo tóxicos. Sin lugar a dudas la occidentalización de la dieta junto con otros factores

relacionados con los hábitos higiénicos y médicos pueden ser responsables de este incremento. Un ejemplo claro se da en una región entre Finlandia y Rusia que se llama Karelia y cuya población por motivos históricos quedo dividida entre los dos países. Aunque su población es genéticamente similar no padecen la enfermedad celiaca de la misma manera, y así la Karelia que pertenece a Rusia tiene una prevalencia menor de enfermedad celiaca que la Karelia Finlandesa, 1 de 496 en Rusia frente a 1 de 107 en Finlandia [17]. Aunque en ambas poblaciones los niños están expuestos a cantidades de gluten similares, hay una diferencia muy relevante entre la fuente de gluten. Así los niños de la Karelia Rusa tienen una dieta tradicional (además de otras practicas como son los hábitos de lactancia) mientras que en la parte Finlandesa, la dieta de estos niños se basa en un consumo de alimentos procesados mucho mayor. Una serie de estudios ha puesto de manifiesto la relación entre la variedad de trigo y la agresividad e incluso el desarrollo de la celiacía. Las variedades de trigo actual tienen 3 genomas el A, B y D, mientras que las variedades más antiguas, como el einkorn (*Triticum monococcum* L. ssp. *Monococcum*), solo poseen el genotipo A. La presencia del genotipo A exclusivamente, ha sido asociada con una menor reactividad de los celíacos, mientras que variedades modernas que son anteriores y posteriores a los años 50 o la espelta, producen una mayor reactividad en celíacos, ver Panel 4 [18].

Panel 4. Diferentes reactividades en los celíacos y la presencia de péptidos de α -gliadina de acuerdo a la variedad de Trigo, donde se comparan variedades más ancestrales frente a otras más modernas. Información obtenida de Kucek, et al. 2015 [18]. Dibujos y gráfica realizados por Art Keepers (usado con permiso).



Cuando la gliadina del gluten se encuentra en el aparato digestivo, se hidroliza en péptidos más pequeños que son muy ricos en prolina y glutamina [19, 20]. Esta composición característica, hace que dichos péptidos sean resistentes a su degradación digestiva, ya que las proteínas con secuencias repetidas en estos aminoácidos no se digieren [21]. De hecho, el 50% de la proteína del gluten no se absorbe, ya que el estomago es impermeable. Sin embargo, los celíacos presentan un incremento de la permeabilidad intestinal al paso de dichos péptidos [22, 23], probablemente porque afecten a la biología y a las uniones entre las células epiteliales de la mucosa [24-26]. Los péptidos así generados a consecuencia de la degradación del gluten, son heterogéneos y no todos tienen los mismos efectos tóxicos en el desarrollo de la celiaquía. Sin embargo, se ha reconocido la existencia de un péptido el p31-43 que deriva de la α -gliadina, que tiene propiedades inductoras de la respuesta inmunológica innata [27]. Otros péptidos como el 33-mer o p56-89 y la fracción corta p57-68 son inmunogénicos y responsables de la respuesta inmunológica adaptativa [19, 28, 29]. Otros péptidos con funciones inmunogénicas en menor grado, se encuentran en la γ -gliadina p139-153 y ω -gliadina p102-118 [30].

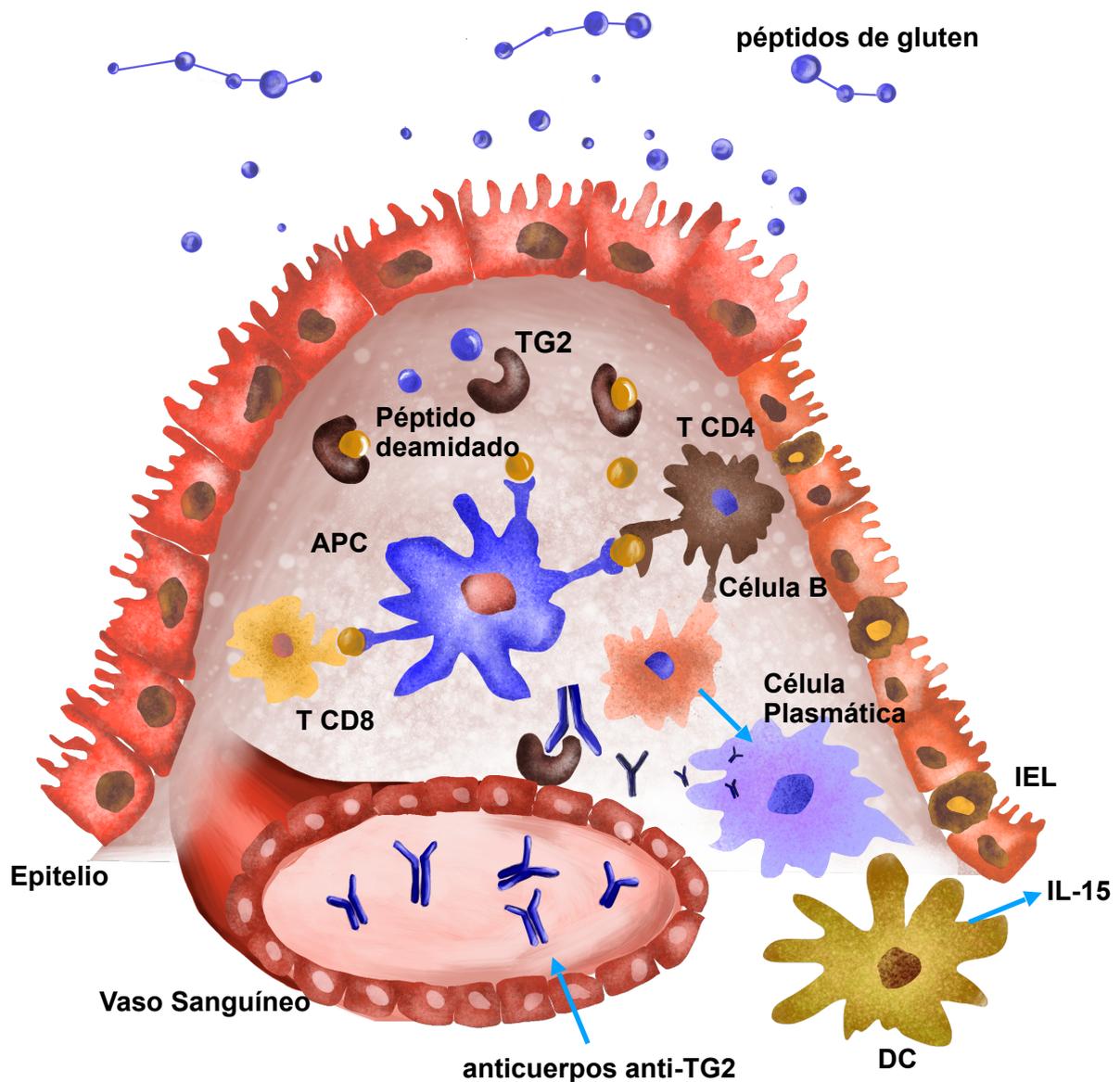
Cuando el gluten procedente de la dieta se ha digerido en los péptidos descritos, atraviesa la mucosa digestiva [31, 32] para producir el desarrollo de una condición autoinmunológica [33]. En este contexto la primera respuesta inmune desarrollada es la innata, donde entre otros, se libera IL-15 por parte de los macrófagos y de las células dendríticas, que actúa como intermediaria en el daño a la barrera epitelial digestiva [27, 34-36]. Es interesante constatar, que la producción de IL-15 se encuentra aumentada en el epitelio y en la lámina propia en los celíacos [34, 37-39]. A su vez la IL-15 es fundamental para la activación y expansión selectiva de los linfocitos intraepiteliales (IELs) [40, 41]. Estas células que aparecen aumentadas en la mucosa de los celíacos, juegan un papel decisivo en el daño al epitelio [42, 43]. Otros tipos celulares involucrados en la lesión de la mucosa son los natural killer que suelen encontrarse junto con las IELs. En su conjunto, la IL-15 regula el receptor de las IELs para las natural killer y por otro lado el ligando en las células epiteliales, cuya interacción favorece un defecto en el epitelio por aumento en la apoptosis de las células epiteliales. El efecto resultante, es el incremento en la permeabilidad del epitelio a los péptidos del gluten [35, 39, 40, 44, 45]. Otras acciones promovidas por el incremento en la IL-15 es la activación de linfocitos T y secreción de citoquinas que promueven el proceso

inflamatorio [34, 46]. Este efecto pro-inflamatorio de la IL-15, se suma a las citoquinas liberadas por los linfocitos T CD4⁺ lo que conlleva la expansión de las células citotóxicas T CD8⁺ lo que favorece la progresión en el daño al epitelio [46-52]. A su vez, los péptidos de gliadina activan la cascada inmunológica adaptativa, donde la enzima transglutaminasa 2 (TG2), juega un papel decisivo, ya que los péptidos de gliadina son un excelente sustrato para la enzima, que por el proceso de la deamidación transforma la glutamina en glutamato [53, 54]. Así, la gliadina deamidada forma complejos con el HLA de las células presentadoras de antígeno, lo que activa los linfocitos T y en última instancia favorece la liberación de citoquinas y la lesión de la mucosa digestiva [20, 46, 50-52, 55, 56]. Por otro lado, la activación de las células T también conlleva la producción de anticuerpos anti-TG2 por parte de los linfocitos B, que reconocerían los péptidos de gliadina deamidada aislados o cuando están en combinación con la enzima TG2, lo que en última instancia favorece la formación de los autoanticuerpos característicos de la celiaquía [57-60]. El panel 5, muestra un esquema de todos aquellos intermediarios involucrados en la patogenia de la celiaquía.

C. Factores de riesgo en la enfermedad celiaca.

El factor de riesgo más importante en el desarrollo de la celiaquía es la presencia del gluten en la dieta. Sin embargo existen otros factores de riesgo que cuando están presentes favorecen el desarrollo de la enfermedad. Cabe destacar, en primer lugar, el papel de la genética, ya que casi el 100% de los celíacos presentan un HLA positivo para DQ2 y DQ8 [61-63]. Otros estudios de asociación genética han mostrado la existencia de otras 39 regiones génicas no vinculadas al HLA, pero que están relacionadas también, con el incremento en el riesgo de padecer celiaquía [64, 65]. A pesar de esto, el HLA sigue siendo el marcador genético más relevante cuyo valor predictivo negativo es mayor del 99% [66], es decir, los niños negativos para el HLA lo son para celiaquía. Sin embargo, su valor predictivo positivo es mucho menor, lo que pone en relieve que otros factores ambientales puedan estar involucrados en el riesgo de padecer la enfermedad. Algunas evidencias que avalan este hecho son, por un lado que el HLA DQ2 o DQ8 se comparte con casi el 40% de la población donde un menor porcentaje padece la enfermedad [67-69]. Por otro lado, el riesgo de padecer celiaquía entre familiares con un grado de parentesco de primer orden varía entre el 5 y el 20% [70-72]. Además estudios en gemelos idénticos ponen de manifiesto que tan solo el

Panel 5. Figura esquemática de la cascada de eventos y sus intermediarios que ocurren cuando el gluten está presente en la mucosa digestiva de los celíacos. Los péptidos de gluten, atraviesan el epitelio donde producen activación del componente innato del sistema inmunológico, en acciones mediadas por la IL-15, lo que favorece el daño al epitelio. La respuesta inmunológica adaptativa, es activada por los péptidos de gliadina en la lamina propia, al ser deamidados por la TG2. Dichos péptidos deamidados son reconocidos por el HLA de las células presentadoras de antígeno (APC) aunque también mediante las células dendríticas (DC). Los antígenos así reconocidos, activan las células T (CD8 y CD4) que favorecen formación de autoanticuerpos frente a la TG2 que pueden actuar a nivel local o ser transportados por la sangre. A su vez, las células dendríticas activan a las células T CD4 específicas que producen citoquinas (IL-21 e IFN-gamma) que activan a las células intraepiteliales, IELs, que junto con la IL-15 producida por las células dendríticas, orquestan otros mecanismos inflamatorios. Dibujos realizados por Art Keepers (usado con permiso).



75% comparten el riesgo de padecer celiacía, mientras que el resto de los casos no tienen dicho riesgo de desarrollar la enfermedad [73]. Todo esto, avala la idea de que

otros factores ambientales puedan estar involucrados en el desarrollo de la celiaquía. Un ejemplo de esto, lo encontramos en Suecia, en un periodo que se ha denominado la epidemia Sueca, donde la enfermedad celíaca se multiplicó por 10 entre los años 1984-1996. Esta epidemia de enfermedad celíaca, se asoció con un cambio en los hábitos de alimentación infantil [74].

No está claro cual es el papel de la alimentación infantil en el riesgo de padecer la enfermedad. Por un lado, la introducción del gluten en periodos más tardíos, a corto plazo disminuye el riesgo de padecer la enfermedad, sin embargo a largo plazo no tiene efecto, ya que la enfermedad se termina desarrollando con similar prevalencia [75]. Por otro lado, la lactancia y su tiempo de duración, no ha mostrado un papel protector en el riesgo de padecer celiaquía [75, 76]. Aunque es una cuestión controvertida, por los escasos datos y por el hecho de que son contradictorios, se ha propuesto que la cantidad de gluten ingerido podría ser un factor relacionado con el incremento en el riesgo [77, 78].

Otros factores como la exposición a antibióticos [79], la presencia de rotavirus y de otras infecciones durante la infancia [80, 81], la suplementación materna con hierro durante la gestación [82], o el parto por cesárea [83] ponen de manifiesto la implicación de la flora intestinal y su desarrollo durante la infancia, en el riesgo de padecer celiaquía. De hecho, se ha observado, que los celíacos presentan una flora intestinal que difiere de los no celíacos y que no termina de normalizarse cuando el gluten no está presente en la dieta [84, 85]. En línea con este concepto, recientemente se ha descubierto que los niños con alto riesgo de padecer la enfermedad presentan un aumento de ciertas poblaciones de bacterias en su flora intestinal que son patogénicas [86]. Además, se ha observado que el HLA- DQ2 típico de los celíacos, selecciona el tipo de flora intestinal, favoreciendo la disbiosis intestinal como factor de riesgo en el desarrollo de la celiaquía [87]. Sin lugar a dudas, lo que todos estos datos ponen de relieve es la participación de la dieta, la procedencia y cantidad del gluten ingerido, así como la flora intestinal, que junto con otros factores ambientales y sanitarios incrementan el riesgo de padecer la enfermedad [17, 88]

2. La celiaquía: clínica y epidemiología.

La presentación clínica de la celiaquía depende de la edad, la intensidad en la respuesta al gluten, es decir, la sensibilidad al gluten, así como su cantidad presente en

la dieta. Todo esto, junto con otros factores desconocidos, así como el aumento de la realización de test serológicos para detección de celiaquía en población de riesgo, han dado lugar a una descripción más detallada de síntomas y por tanto a un conjunto de síntomas clásicos de fácil identificación, y a una serie de síntomas no clásicos que suelen ser más difíciles de identificar [89]. Así pues, la presentación clínica clásica de la celiaquía suele ocurrir en niños de menos de 3 años, mientras que el cuadro clínico no clásico ocurre en el final de la infancia o durante la vida adulta. Además, un número importante de pacientes son clínicamente silenciosos o tienen exclusivamente manifestaciones extra-digestivas lo que complica considerablemente el reconocimiento del cuadro sintomatológico [90].

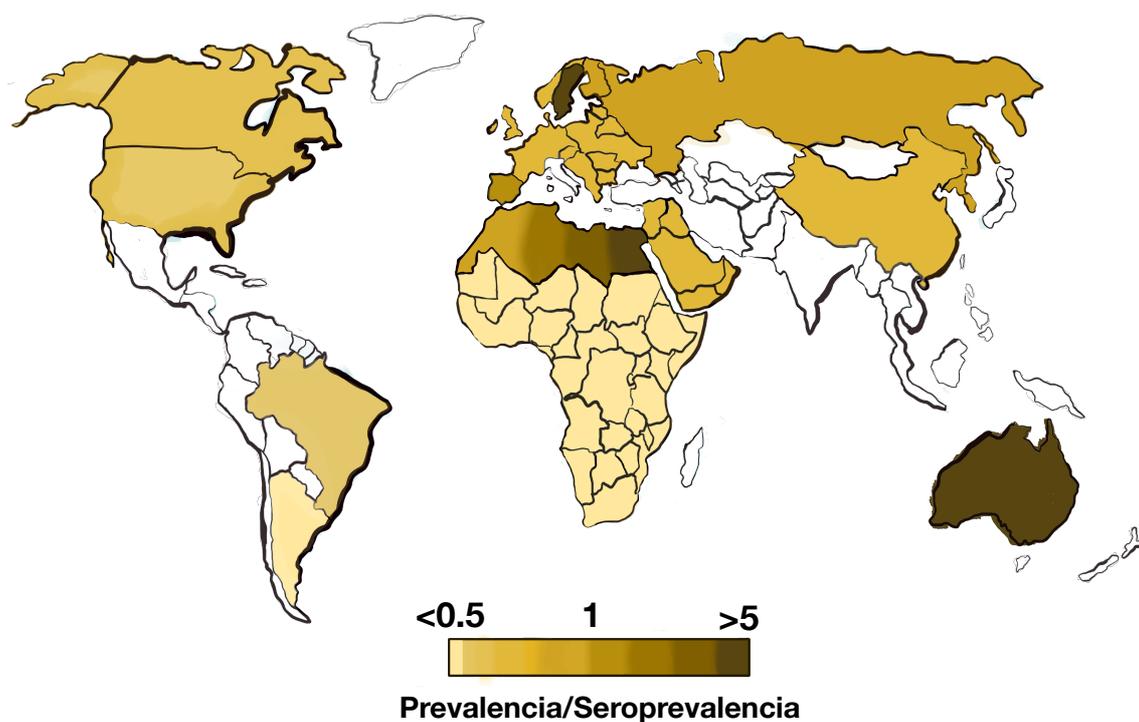
La presentación clásica de la celiaquía incluye un síndrome de malabsorción que cursa con dolor abdominal, diarrea recurrente o crónica, distensión abdominal, pérdida de peso o retardo en el crecimiento [91, 92]. Más frecuente en la actualidad es la presencia de un cuadro clínico no clásico, que incluye vómitos o náuseas, estreñimiento, irritabilidad, cambios de humor, dolor de cabeza o debilidad [93-96]. El 50% de los niños presentan un cuadro de pérdida de peso o diarrea, mientras que el 90% tienen dolor abdominal [95]. En niños de más de 3 años, adolescentes y adultos, la celiaquía se presenta a nivel gastrointestinal por dolor abdominal postprandial o esteatorrea aunque es habitual la ausencia de dicho cuadro digestivo en pro de un conjunto de manifestaciones extra-digestivas o fuera del intestino [97]. Así, en estos grupos poblacionales, suelen aparecer deficiencia en el hierro, anemia y alopecia o defectos en la dentición [98]. La fatiga y los dolores musculares o en las articulaciones, suelen formar parte del cuadro extra-digestivo en el niño, adolescente y adulto celíacos, de hecho un 3% de los pacientes con fatiga crónica son diagnosticados de celiaquía [99, 100]. Otros datos clínicos son la deficiencia de hierro, folatos, vitamina B12 o vitamina D, que suelen ser habituales en la clínica del celíaco [101]. Diferentes desordenes hepáticos, han sido descritos como síntomas de la celiaquía, que pueden cursar como una disfunción hepática leve, enfermedades hepáticas crónicas o enfermedades hepáticas autoinmunes. Es frecuente encontrar un aumento en las transaminasas hepáticas en el 54% de los niños y en el 42% de los adultos celíacos, especialmente para la aspartato aminotransferasa y la alanina aminotransferasa, mientras que la bilirubina y la gamma-glutamil transaminasa no suelen aparecer alteradas [102, 103]. Un 24% de los pacientes presentan manifestaciones

dermatológicas, tales como la dermatitis herpetiforme que cursa en paralelo a las alteraciones de la mucosa digestiva [104, 105]. Otras manifestaciones cutáneas de la enfermedad celiaca son, urticaria, vasculitis cutánea, eritema nodoso, psoriasis, vitiligo y otras muchas revisadas extensivamente en la literatura científica [106, 107]. Además, otras manifestaciones de la enfermedad aparecen a nivel neurológico, como son la ataxia cerebelar al gluten, hipotonía o retraso del desarrollo mental [108]. A su vez, a consecuencia de la celiacía, se han descrito convulsiones en niños y epilepsia o migrañas [109-111]. Otras alteraciones de la enfermedad son, osteopenia y osteoporosis [112-114], fibromialgia [115, 116], fallos en la dentición [117], pubertad retardada, depresión, ansiedad o alucinaciones [97, 118-120].

Desde el punto de vista epidemiológico, a nivel global la enfermedad celiaca se produce en un 1% de la población [121-123]. Sin embargo, no todas las poblaciones presentan los mismos índices, hecho que se explica mediante la distribución del HLA o de los factores de riesgo que no son homogéneos. Por ejemplo, en población Estadounidense, se piensa que la prevalencia en adultos es del 0.95%, mientras que en niños es del 0.31% [121, 124, 125]. En este escenario, los grupos poblacionales de Hispano-Americanos o Afro-Americanos, presentan valores bajos de prevalencia en torno al 0.3%, mientras que la enfermedad se desarrolla en un 3% en aquellos cuyos ancestros proceden del norte de la India, o en un 1% para aquellos que proceden de Europeos [121, 126, 127]. En Europa el cuadro epidemiológico varía según el país, por ejemplo, en Holanda, Finlandia, Reino Unido o Suecia el rango de prevalencia se encuentra entre el 1 y el 3% de la población [128-134]. Sin embargo en Italia la prevalencia de la celiacía es mucho menor con rangos entre 0.2 y 0.74% [135-138]. En África la prevalencia es relativamente baja, aunque en determinadas poblaciones en el norte del continente la prevalencia es del 5.6% [139]. Mientras que en otras poblaciones del norte de África o de oriente próximo la media sería similar a la mayoría de países occidentales [140]. Por último, la prevalencia de la enfermedad en Asia y Pacífico es muy baja, por un lado porque el perfil genético para HLA es más bajo y por otro, porque tradicionalmente el consumo de cereales que contienen gluten es pequeño [141], aunque con la occidentalización de sus dietas la prevalencia de la celiacía está en aumento en estas regiones [142]. Es notorio destacar, el incremento de la prevalencia de la enfermedad, en casi 5 veces, experimentado en los últimos 50 años [143]. Además, la prevalencia de la celiacía ha sufrido un aumento en los

últimos 15 a 20 años en un 50% [16, 144]. El caso de la región mediterránea es muy interesante, ya que en 2010 su prevalencia se encontraba en torno al 1% y sin embargo se calculó que en 2020 existiría un incremento de un 11% más [145]. El caso de España es muy relevante, ya que el incremento no ha sido del 11% como se esperaba, sino en mas del 80%, pasando de una prevalencia del 0.9-1.7% en 2000 a valores de 5.8% actualmente [146, 147]. Un resumen referente a la prevalencia de la celiacía a nivel global, se muestra en el panel 6.

Panel 6. Mapa de la celiacía en el mundo. La gradación de color marrón en el mapa muestra valores de menor a mayor en la prevalencia de la enfermedad. Por ejemplo, prevalencias por debajo de 0.5 se representan con los colores mas claros, mientras que valores por encima de 5, se muestran mediante colores más oscuros. Los datos hacen referencia o a la prevalencia general y en algunos casos a la prevalencia medida por el título de anticuerpos (seroprevalencia). Los países donde no se han descrito valores de prevalencia, se representan en color blanco. Dibujos realizados por Art Keepers (usado con permiso).



Estos datos reflejan, que la enfermedad se está expandiendo de manera epidémica, debido a los cambios nutricionales en la población, y al incremento masivo del gluten en la dieta. Por otro lado, muestran que la prevalencia real de la enfermedad es mucho mayor que la determinada hasta la fecha, donde el diagnóstico sería una pieza clave. Por ejemplo en 2009 en Estados Unidos un 80% de los celíacos no eran diagnosticados, mientras que en 2014 estos valores decrecieron hasta un 50% [148,

149]. Actualmente los médicos e incluso los pacientes, están más apercibidos de los síntomas de la enfermedad, lo que facilita su diagnóstico, además de explicar su incremento en la incidencia. Por otro lado, los pacientes en algunos casos antes de ser diagnosticados, se adhieren a la dieta sin gluten, lo que facilita el diagnóstico [148]. Por cierto, el método diagnóstico usado tiene un impacto directo en la prevalencia, por ejemplo, un diagnóstico realizado mediante test serológicos detecta más casos, que cuando se usan biopsias [150]. Todo esto abre un capítulo fascinante de los métodos diagnósticos actuales y de la necesidad de encontrar nuevos marcadores, como se expondrá en el apartado siguiente.

3. El diagnóstico en la celiaquía: donde estamos y qué nos falta.

3.1 Criterio Diagnóstico Actual.

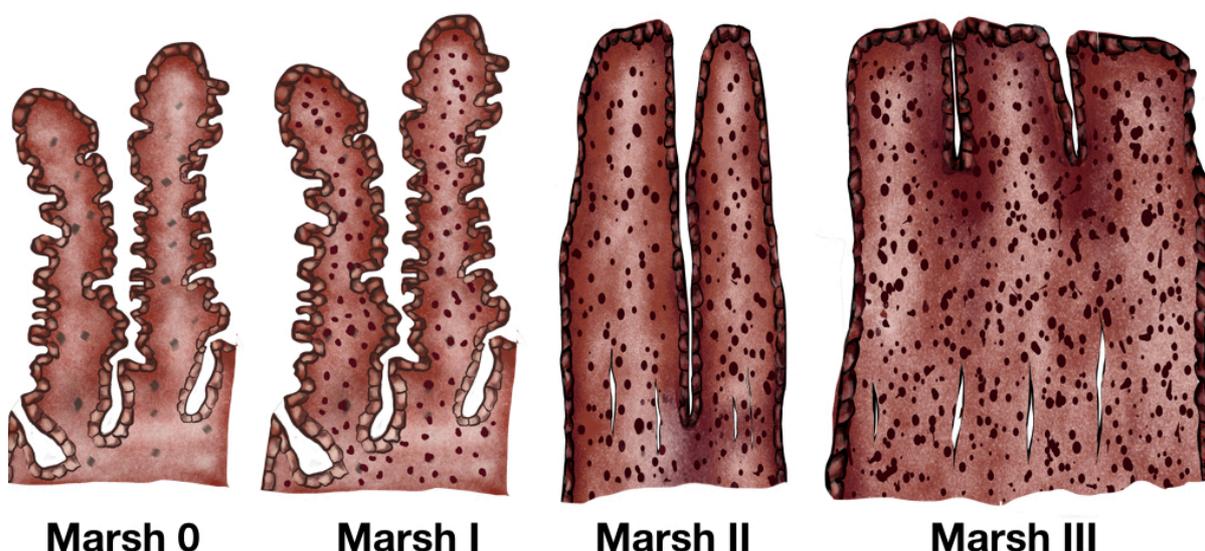
El criterio diagnóstico actual se basa en dos pilares fundamentales, por un lado el diagnóstico serológico y por otro lado los cambios en la mucosa digestiva, determinados por histología [151-153]. Cuando se detecta el cuadro clínico de la enfermedad y se sospecha que un paciente es celíaco, la primera línea de detección usada es el test serológico que de ser positivo se confirma mediante una biopsia intestinal. La medida de anticuerpos circulantes anti-TG2, es el test serológico más usado en la actualidad, ya que este tipo de inmunoglobulina A (IgA) tiene rangos de sensibilidad entre el 93 y el 95% y de especificidad del 96% [97]. La existencia de estos anticuerpos en el celíaco, están asociados con la presencia del gluten en la dieta, de ahí que se usen en el diagnóstico de rutina [154]. Sin embargo, existe otro repertorio de anticuerpos usados para complementar el diagnóstico serológico, como es el caso de las IgA anti-endomisio (EMA). Estos anticuerpos representan diferentes tipos de inmunoglobulinas anti-TG2, que se miden usando muestras directas del suero de pacientes incubadas frente a cordón umbilical humano, y por consiguiente presentan una especificidad y sensibilidad por debajo de la encontrada en la medida directa de los anticuerpos anti-TG2 [155, 156]. Generalmente, EMA se usa en los casos donde el título de anti-TG2 no está claro o está alrededor de 10 (recordemos que valores de más de 10 son indicativos de celiaquía) [97]. Debido a que la especificidad y sensibilidad de EMA es más baja que la de los anticuerpos anti-TG2 y junto con su mayor costo, hacen que esta medida no sea tan frecuente en clínica. Un tercer grupo de anticuerpos

usados, especialmente en niños de menos de dos años, son los anticuerpos anti-gliadina deamidada (DGP) [157]. Por cierto, el rango de especificidad y sensibilidad para los DGP es mucho más bajo que para EMA y por supuesto para anti-TG2 y por tanto se usan como complemento en el diagnóstico [158]. Es interesante constatar que los pacientes celíacos suelen presentar anticuerpos frente a TG2 y EMA de tipo IgA, mientras que los anticuerpos DGP son IgA o IgG [157-159]. Algunos pacientes presentan una deficiencia en IgA donde la medida de sus anticuerpos IgA anti-TG2 daría resultados negativos, mientras que un análisis para las IgG anti-TG2 resultaría positivo. Es por ello, que la deficiencia en IgA en el paciente celíaco, tiene que ser detectada antes de la realización de cualquier test serológico, ya que puede dar lugar a un falso negativo [160, 161]. No obstante, dicha deficiencia en IgA, no afecta al cuadro de síntomas, no existiendo diferencias clínicas entre pacientes que presentan IgA positiva con aquellos que son deficientes [160]. Por último, la deficiencia en IgA también es indicativo de celiaquía y de manera indirecta puede apuntar a la presencia de la enfermedad, ya que suele ser más frecuente en celíacos que en población general y además se asocia al HLA DQ2 [160, 162-164]. Un último grupo de anticuerpos que no se suelen investigar en la clínica, son los anticuerpos anti-reticulina o ARA, que también son una variante de anti-TG2 y que aparecen depositados en los tejidos, por ejemplo en la mucosa digestiva; también se han descrito anticuerpos frente a actina, calreticulina, desmina o la glicoproteína dermal de 90KDa [161, 165-169].

Según el criterio de la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN), aceptado en 2012, el diagnóstico de la celiaquía en niños de riesgo se realiza sólo mediante la identificación de predisposición genética, título de anticuerpos anti-TG2 que deben encontrarse 10 veces por encima del límite patológico y EMA positivo y siempre que el niño responda correctamente al tratamiento, es decir una dieta sin gluten [153]. Sin embargo, en aquellos casos de niños donde la serología no esta clara y en todos los adultos, se realiza una segunda prueba diagnóstica que consiste en la toma de biopsias digestivas. En particular, se suelen tomar varios fragmentos de las regiones más próximas del duodeno comenzando por el bulbo duodenal, ya que un 10% de los niños con celiaquía sólo presentan lesiones en esta zona [170], así como al menos, otras 4 biopsias de las regiones siguientes al bulbo [171]. A simple vista en muchos casos, no suelen observarse variaciones en la mucosa y por tanto es necesario realizar un análisis

histológico que consiste en la visualización de la atrofia de las vellosidades y la hiperplasia en las criptas de Lieberkuhn. Además, como la distribución de las lesiones puede ser continua o discontinua, es necesaria la toma y el procesamiento de diferentes muestras histológicas [172, 173]. En este contexto, la presencia del gluten gradualmente produce una lesión, que se clasifica de acuerdo a un criterio desarrollado por Marsh [174]. Esta clasificación, consiste en la descripción secuencial de los cambios histológicos ocurridos en la mucosa y que comienzan con infiltrados de linfocitos (Marsh I), alargamiento de las criptas (Marsh II) y en la etapa final atrofia de la vellosidad con hiperplasia de las criptas (Marsh III) todo ello representado en el panel 7. Esta etapa final, a su vez, se divide en otras categorías de acuerdo con el mayor o menor grado de atrofia de la vellosidad [175]. Para cuantificar la lesión se utiliza la relación entre la altura de la vellosidad (AV) y la profundidad de las criptas (PC) donde el ratio sería AV/PC y cuyo valor de morfometría debe ser mayor de 2 para considerarse indicativo de celiaquía [176]. Además, se calcula la presencia de linfocitos $\gamma\delta^+$ IEL, que suelen aparecer aumentados en los celíacos, ya que son bastante específicos en la enfermedad [43, 177, 178]. Otra aproximación diagnóstica que se realiza, es la medida en la lamina propia de infiltrados de linfocitos que contienen altos niveles de IgG, que en el caso de los celíacos aparecen aumentados [179-181].

Panel 7. Clasificación Marsh. Cambios en la mucosa intestinal de los celíacos cuando el gluten está presente, de acuerdo a la clasificación Marsh. La vellosidad normal (Marsh 0) da paso a un inflado de linfocitos (Marsh 1) para posteriormente dar lugar a la elongación de las criptas (Marsh II) y en una última fase producir atrofia de la vellosidad e hiperplasia de las criptas (Marsh III). Información extraída de Marsh 1992 [174]. Dibujos y gráfica realizados por Art Keepers (usado con permiso).



3.2 Limitaciones en el diagnóstico: la necesidad de nuevos marcadores.

Existen algunas limitaciones en los métodos diagnósticos actuales para la celiaquía que tienen un impacto directo en la detección de la enfermedad. En la clínica, la identificación de anticuerpos para TG2 se realiza usando test inmunoenzimáticos ELISA, a partir de muestras de sangre. Los tests usados, suelen incluir TG2 humana o de cobaya, debido a que ambas presentan una buena especificidad y sensibilidad [182-184]. Sin embargo, esta detección tiene algunos inconvenientes, por un lado, según el tipo de kit comercial que se use los resultados pueden ser diferentes, lo que afecta al diagnóstico [185]. Para evitar dicha heterogeneidad metodológica, se han sugerido condiciones concretas de realización de los tests [186]. Otra solución desarrollada para disminuir la heterogeneidad del diagnóstico, ha sido la elaboración de test de tipo “point-of-care” o test rápidos de detección de anticuerpos anti-TG2 a partir de una gota de sangre extraída del dedo [187, 188]. A pesar de que el uso de estos test rápidos podría ser de ayuda en el diagnóstico, no se usan de rutina en clínica y además suelen detectar sólo, pacientes positivos para IgA, es decir no detectan aquellos que son deficientes en IgA. Además, en un amplio número de otras enfermedades, los títulos de anticuerpos anti-TG2 suelen detectarse en la sangre de estos pacientes, por ejemplo, durante las enfermedades inflamatorias intestinales, en la infección por VIH, en algunas fases del fallo cardiaco o en otras enfermedades autoinmunes [189-194]. Todo esto complica enormemente la identificación del celiaco por el método serológico. Lo que si que es cierto, es que los epítomos de los anticuerpos anti-TG2 encontrados circulantes en los celiacos, son diferentes a los que se encuentran en esas otras enfermedades. En efecto, se ha corroborado la existencia de 4 epítomos mayoritarios en los celiacos para la TG2, que son exclusivos de la celiaquía, aunque sorprendentemente, esta característica no se usa en clínica, ni se ha introducido en los kits para la identificación de la enfermedad celiaca [195, 196]. Debido a esto, la Sociedad Americana de Gastroenterología recomienda realizar un diagnostico en paralelo a los niveles de anti-TG2, mediante la determinación de la presencia de anticuerpos EMA [197], como indicadores de celiaquía, ya que sólo los anticuerpos de los celiacos dan positivo para EMA cuando se incuban en cordones umbilicales congelados [194, 198, 199]. Sin embargo, este método es semi-cuantitativo [200] y relativo al laboratorio donde se realiza, de tal manera que los resultados entre laboratorios pueden ser muy dispares.

Otro inconveniente importante en el uso de los anticuerpos para el diagnóstico, es el desfase existente entre la incorporación del gluten y la presencia de títulos de anticuerpos detectables en la sangre, hecho que puede tardar hasta décadas en producirse [201]. Los anticuerpos anti-TG2, se producen tras la respuesta inmune originada por la introducción del gluten en la dieta e inicialmente se depositan bajo la membrana basal y alrededor de los vasos sanguíneos [179, 202, 203]. Estos depósitos, son detectados en pacientes celíacos con atrofia de las vellosidades, e incluso dichos depósitos preceden al desarrollo de los cambios morfológicos de las vellosidades que ocurren durante la enfermedad [203-207]. A pesar de que dichos depósitos intestinales de anticuerpos podrían ser una herramienta útil en el diagnóstico de fases iniciales (especialmente en serologías negativas), son ineficaces ya que de acuerdo con la guía para el diagnóstico actual de la enfermedad, solamente si el título de anticuerpos en sangre es positivo el paciente es biopsiado [153].

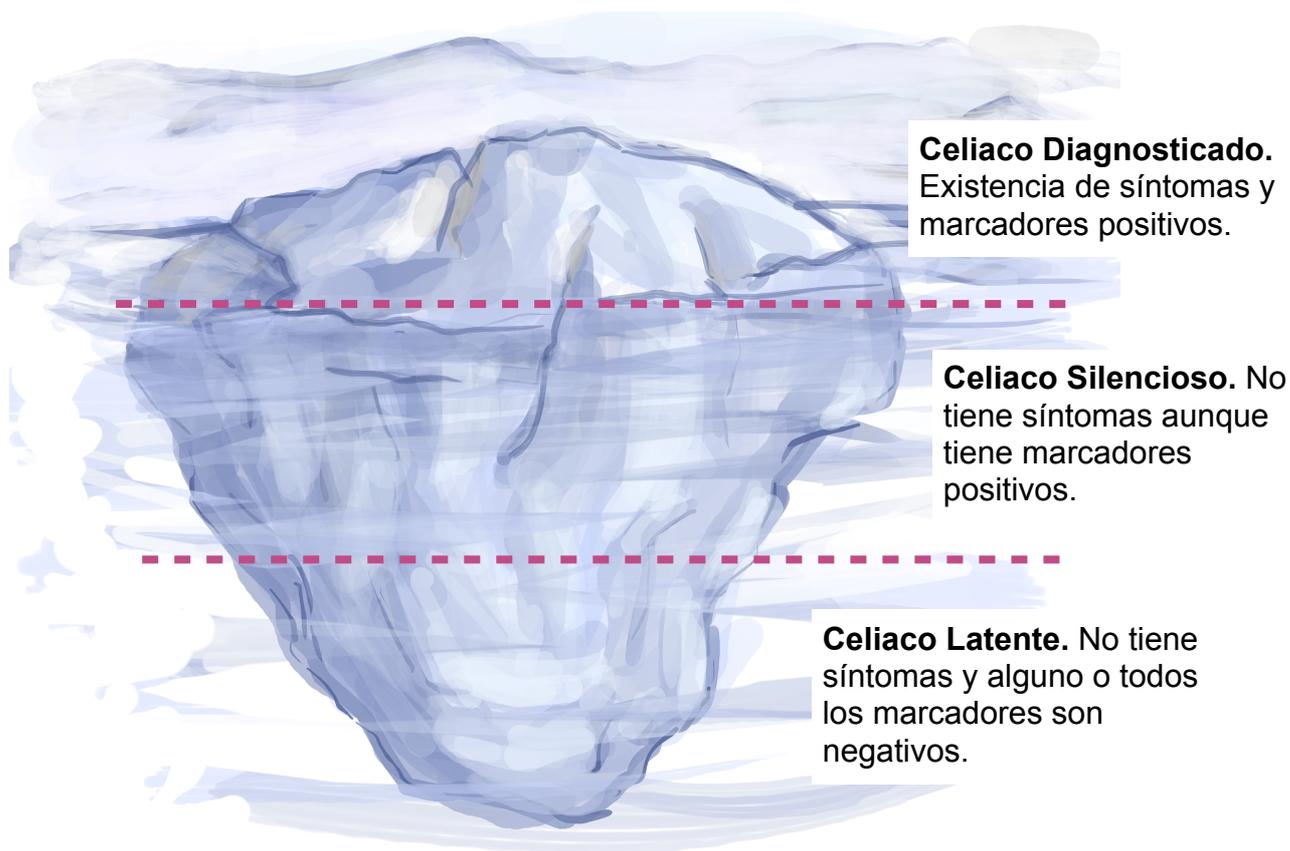
La realización de una biopsia digestiva es un método caro, invasivo, los cambios en la mucosa no son observables en fases iniciales de la enfermedad, el porcentaje de biopsias dañadas y no adecuadas para el diagnóstico es elevado [208, 209] y no se recomiendan en la identificación de la celiaquía de manera aislada. Esto es debido a que en otras patologías como son las enfermedades inflamatorias intestinales, el VIH o en la presencia de parásitos intestinales, también se observan lesiones de la mucosa similares a las encontradas durante la celiaquía [210]. Por otro lado, cuando se realizan los cortes histológicos, el espécimen debe orientarse de la manera correcta porque de no hacerlo así, podría dar lugar a falsos positivos [182, 211]. Otro factor relacionado con la dificultad en el diagnóstico mediante biopsias, es el hecho de que el desarrollo de la lesión en la mucosa tarda años en aparecer [212], junto con que un 10% de los niños celíacos presentan sólo pequeñas lesiones en la región del bulbo duodenal que no se acompañan de aumentos en el título de anticuerpo en la sangre [170]. Todo esto puede complicarse, porque algunos pacientes dejan de consumir gluten por su cuenta, el único tratamiento efectivo frente a la celiaquía, y por tanto los cambios histológicos de la mucosa digestiva y los serológicos pueden resultar negativos. En estos casos, algunos clínicos recomiendan la reincorporación del gluten [97], lo que plantea dilemas éticos.

Las biopsias están desaconsejadas para el diagnóstico, especialmente en el caso de los niños, siempre y cuando el título de anticuerpos sea positivo y respondan bien al

tratamiento, la dieta sin gluten [153]. Para aquellos niños de menos de 5 años la presencia de anticuerpos en la sangre y los cambios histológicos de la mucosa digestiva, pueden tardar de 5 a 10 años en aparecer, por ejemplo en varones, se ha observado que la enfermedad se detecta entre los 10-15 ó entre los 35-40 años de edad, mientras que en las mujeres la detección se realiza entre los 40-45 años [213]. Recordemos que el gluten se introduce en la dieta antes del año de edad, luego, este retraso en el diagnóstico lo que realmente está reflejando es que los marcadores actuales para la identificación de la enfermedad, sólo son útiles en estados avanzados donde la salud del paciente está más comprometida. Es más, el tiempo medio que se tarda en realizar el diagnóstico de los celíacos suele ser de 13 años, según informó "Celiac UK" en Reino Unido [151, 171]. Además, es extraño que un paciente presente una crisis celíaca, que es una manifestación clínica aguda de celiaquía, caracterizada por una diarrea continua, por la pérdida de peso y otros problemas metabólicos asociados, lo que de producirse ayuda al clínico a sospechar la presencia de celiaquía a pesar de que los marcadores serológicos sean negativos [214]. Esta característica es especialmente relevante en el caso de niños menores de 5 años, donde la crisis celíaca es realmente infrecuente, ocurriendo en al rededor del 1.6% de todos los niños diagnosticados [215-217].

Otras evidencias que muestran que el diagnóstico actual tiene ciertas ineficacias, es el hecho de que un 80% de los celíacos no sabe que tiene la enfermedad ya que o no padece síntomas o el título de anticuerpos en sangre es negativo, luego este grupo no es diagnosticado [171]. Por otro lado, se estima que existen entre un 10 y un 50% de casos de celiaquía más, de los que somos capaces de detectar actualmente, nuevamente debido a la baja tasa de diagnóstico [218]. Además, como ya se mostró anteriormente, la determinación del perfil genético HLA no es eficaz para hacer un estudio de celiaquía en la población general, ya que se comparte con un 30% de la población sana. En definitiva, lo que todos estos datos reflejan, es la necesidad de encontrar marcadores que puedan identificar al celíaco en etapas iniciales, incluso en aquellos casos clínicamente asintomáticos (para más detalles ver el panel 8).

Panel 8. Representación de los pacientes diagnosticados en comparación con los no diagnosticados, mediante un iceberg. De arriba a abajo del iceberg: Celiacos con síntomas y positivos para los marcadores de diagnóstico, son aquellos celiacos que se diagnostican. Celiacos silenciosos, son celiacos positivos para marcadores diagnósticos, pero que al ser asintomáticos no son detectados. El último grupo, son los celiacos latentes, es decir, aquellos celiacos que no tienen síntomas y son negativos para alguno o incluso para todos los marcadores diagnósticos. Aunque todos los pacientes son positivos para HLA. Dibujos realizados por Art Keepers (usado con permiso).



3.3 Nuevos marcadores de identificación: características y objetivos.

No existe ningún otro marcador de diagnóstico en la actualidad, que sea diferente a los descritos en los apartados anteriores. Sin embargo la cantidad de evidencias aquí mostradas, reflejan la necesidad de encontrar marcadores que puedan ayudar en el diagnóstico en etapas iniciales de la celiacía, antes de que se presenten síntomas o signos de la enfermedad. Recordemos que los marcadores diagnósticos actuales, se alteran tras años, incluso décadas, tras la introducción del gluten en la dieta. Puesto que la detección de dichos marcadores no es inmediata, un buen porcentaje de pacientes, no puede ser diagnosticado y necesitará realizar frecuentes visitas a su médico e incluso hospitalizaciones. Detectar la celiacía, por tanto, es muy importante y debe realizarse lo antes posible, en primer lugar porque es relativamente frecuenten

en la población, y además porque presenta un cuadro clínico muy difuso y complejo que cursa con serios problemas de salud, especialmente en aquellos casos donde el diagnóstico se produce tras décadas desde la ingestión del gluten. Además, que un paciente celíaco continúe comiendo gluten, no solo favorece el desarrollo de la enfermedad a nivel del digestivo, hepático, cardiovascular, renal, articular, etc, sino que cuanto más tiempo se tarda en el diagnóstico y por tanto en el tratamiento, existen más probabilidades de padecer alguna complicación.

Una de las complicaciones más frecuente, especialmente en los pacientes asintomáticos, es el desarrollo de un adenocarcinoma del intestino. Mientras que en la población general este carcinoma se produce en un 3%, en los celíacos aparece en más del 10% [219, 220]. Este cáncer, en los celíacos se produce en el yeyuno y presenta una supervivencia a los 5 años del 34% [221, 222]. Una segunda complicación a consecuencia de la ausencia diagnóstica y la persistencia en el consumo de gluten en el celíaco es la de una enteropatía asociada a un linfoma de células T. Este linfoma de tipo non-Hodgkin's es muy temido en el paciente celíaco donde cursa con ulceraciones, obstrucciones, perforaciones y linfadenopatías además de presentarse con síntomas gastrointestinales [97]. Desafortunadamente es un cáncer muy agresivo, donde la supervivencia a los 5 años, puede estar entre el 8 al 20% [223, 224]. Todas estas complicaciones, además de las manifestaciones extra-digestivas que fueron descritas en apartados anteriores, pueden evitarse mediante la adherencia estricta a una dieta sin gluten.

La dieta sin gluten, consiste en evitar el consumo de cereales o de alimentos que puedan contenerlos. Se considera que un alimento sin gluten es aquel que tiene menos de 20mg/kg y el límite de gluten mínimo por encima del cual un celíaco padece la enfermedad es de 50mg por día [225, Standard for food. Revision 226]. Sin embargo, cuando el gluten no está presente, todo el cuadro clínico revierte, la atrofia de las vellosidades desaparece, así como los títulos de anticuerpos. Por otro lado, todas las manifestaciones extra-digestivas de la celiaquía revierten, produciéndose la disminución de las transaminasas o desaparición de las lesiones hepáticas, de algunos problemas neurológicos, de las manifestaciones en la piel, o de la osteoporosis mejorando la densidad mineral ósea. De hecho, los estudios muestran que la calidad de vida de los pacientes que siguen la dieta sin gluten se normaliza, mientras que los pacientes en fase activa de la enfermedad tienen calidades de vida bajas [227]. Todo

esto avala la necesidad de la instauración inmediata de la dieta sin gluten, aunque para ello el paciente tiene que ser correctamente diagnosticado. De ahí la importancia de un diagnóstico precoz, que justifica la necesidad de encontrar marcadores de celiaquía de etapas tempranas. Sin embargo, un 30% de los pacientes no responde a la dieta sin gluten [228]. De este grupo, la etiología en la mitad de los casos se corresponde a contaminaciones por gluten, ya que algunos alimentos que de manera natural no lo contienen pueden venir contaminados o también el desconocimiento del paciente puede ser un factor etiológico [229]. Sin embargo, el otro 50%, es decir, un 15% de los celíacos, no responden a la dieta sin gluten y presentan un cuadro de síntomas y manifestaciones extra-digestivas de celiaquía de manera persistente. Otra complicación mucho más severa, son los pacientes celíacos refractarios, que se definen como celíacos que tienen síntomas de celiaquía persistentes, malabsorción y atrofia de las vellosidades tras 12 meses de dieta sin gluten. Esta condición, aunque solo afecta a un 3% de los celíacos, es muy grave ya que puede conllevar un desenlace fatal, con una supervivencia a los 5 años del 44% [223, 230-232], hecho que no se produciría si el paciente nunca hubiera consumido gluten. Por tanto, las neoplasias a consecuencia del gluten, junto con las otras complicaciones descritas y especialmente la celiaquía refractaria, ponen de manifiesto la importancia no sólo del reconocimiento precoz de la enfermedad, sino de la necesidad de su identificación incluso antes de la incorporación del gluten en la dieta. Un marcador de esta naturaleza, tiene que ser expresado en niños de menos de un año y además debería hacerlo de manera constitutiva. En otras palabras, debe permanecer inalterado en cualquier etapa de la enfermedad, a diferencia de los marcadores actuales de fase aguda que son negativos si el gluten no está presente.

3.4 Los vasos sanguíneos en el celíaco: ¿Marcadores de Pronóstico?

En el año 2012, en un estudio realizado en la clínica Mayo se describió por primera vez, la existencia de pacientes que presentaban síntomas de celiaquía, con diarrea continua y pérdida de peso que tomaban Olmesartan medoxomil, que es un fármaco anti-hipertensivo que bloquea el receptor de angiotensina II [233]. El análisis histológico de estos pacientes mostró, la presencia de atrofia en las vellosidades intestinales e infiltrados de IEL, aunque los pacientes eran seronegativos para los anticuerpos anti-TG2 [233]. El único factor etiológico encontrado para esta enteropatía

fue el olmesartan, ya que el cuadro clínico no mejoraba con una dieta sin gluten, mientras que la eliminación del fármaco implicaba la remisión de la enteropatía [233]. Estos mismos descubrimientos han sido confirmados por otros investigadores [210, 234-238]. Lo más interesante es que, este fármaco, que afecta a la función de los vasos sanguíneos, es el detonante de una enteropatía similar a la que ocurre durante la celiaquía, y además en individuos que son también positivos para el HLA DQ2 [210, 233, 239]. Otros fármacos reguladores de la presión arterial, que también son bloqueantes de angiotensina II, presentan efectos similares [240-243]. Lo que estos datos ponen en relieve es que existe una relación directa entre el desarrollo de una enteropatía cuando los vasos sanguíneos de la mucosa digestiva están afectados, ya que estamos hablando de fármacos que actúan a nivel de los vasos sanguíneos. Además es digno de ser destacado, que este efecto no ocurre en todos los pacientes que toman el fármaco, sino sólo en algunos grupos poblacionales entre los que se encuentran aquellos que tienen un HLA DQ2, similar al de los celíacos. Estas evidencias apuntan en la dirección de que cuando los vasos sanguíneos están alterados se pueden producir lesiones digestivas, al mismo tiempo que pone de relieve que las personas con un HLA DQ2 tendrían una serie de características vasculares que les hacen ser proclives a padecer dicho cuadro. Y por tanto, todo esto parece apuntar a la posibilidad de que los vasos sanguíneos puedan estar implicados en la patogenia de la celiaquía y de ser así merece la pena explorar su potencial como marcador de la enfermedad.

Algunas evidencias reflejan que los celíacos tienen una predisposición a tener un perfil vascular diferente. Por un lado, se ha observado que tras la ingestión del gluten, los pequeños capilares intestinales se encuentran inflamados y alterados en el celíaco, cosa que no ocurre en los controles [244, 245]. Además, en biopsias intestinales post-mortem de celíacos, los investigadores encontraron grandes diferencias entre los vasos sanguíneos de los controles cuando se comparaban con los celíacos, donde no se observaba el entramado capilar característico de las vellosidades [246]. Más recientemente, se ha descrito que la ingestión de gluten en los celíacos desajusta la microvasculatura de las vellosidades, así como afecta a la organización de los vasos sanguíneos de la mucosa digestiva, cuando se comparan con los controles [247]. Todos estos datos, por un lado ponen de manifiesto la existencia de la relación entre los vasos sanguíneos y el desarrollo de la enteropatía. Pero además parecen indicar que el celíaco tiene una predisposición vascular diferencial que podría verse seriamente

afectada en la presencia del gluten. Esta hipótesis está avalada por el hecho de que se han encontrado SNIPs en genes vinculados con los vasos sanguíneos en biopsias intestinales de celíacos, lo que refleja que de manera constitutiva la angiogénesis en el celíaco podría estar alterada y no sólo a consecuencia del mecanismo inflamatorio o como resultado de la cascada autoinmune [248]. Recordemos, según lo descrito en los apartados anteriores, la necesidad de identificar un marcador de celiaquía que sea constitutivo, es decir, cuya presencia sea indicativo de la enfermedad y no el resultado del devenir de la misma. Además, considerando la importancia que tienen los vasos sanguíneos en la biología del tracto digestivo, una mejor caracterización del fenotipo vascular en el celíaco, tal vez pueda arrojar luz y ayudar a encontrar marcadores que definan la enfermedad incluso antes de la incorporación del gluten en la dieta.

2. Hipótesis y Objetivos de la Tesis

2.1 Hipótesis.

En base a los datos aquí revisados, planteamos la hipótesis de que los vasos sanguíneos de las vellosidades intestinales en los pacientes celíacos, son diferentes de forma constitutiva a los de las personas sanas. De ser esto así, es razonable identificar factores a nivel proteico que definan dichos cambios vasculares y que nos permitan reconocer de manera precoz a los pacientes celíacos.

2.2 Objetivos.

Basándonos en todos los datos encontrados hasta la fecha en la literatura científica, proponemos los siguientes objetivos para dar respuesta a las hipótesis planteadas en la presente tesis doctoral:

1. El estudio del perfil angiogénico en los celíacos para la identificación de marcadores serológicos, que puedan ser constitutivos de la población celiaca, es decir, que se encuentren en los celíacos independientemente de la presencia o ausencia del gluten en la dieta.
2. La validación de dichos marcadores en niños, en un estudio clínico.

3. Material y Métodos

1. Descripción de los Pacientes.

El grupo de pacientes incluido en esta fase del estudio, contenía niños recién diagnosticados de celiaquía de un año de edad que estaban en fase activa de la enfermedad. Estos fueron diagnosticados siguiendo el criterio de la ESPGHAN, (según criterio diagnóstico anterior a 2012), donde se observaron cambios histológicos en la mucosa digestiva de acuerdo a la clasificación Marsh con valores iguales o por encima de III. A su vez, niveles circulantes de anticuerpos anti-TG2 y EMA fueron encontrados positivos. Una vez realizado el diagnóstico, estos niños iniciaron una dieta sin gluten y para asegurar la remisión de la enfermedad, todas las muestras incluidas en el estudio, se correspondieron con niños que llevaban dos años de dieta sin gluten. En estos casos los niños presentaron una serología negativa, es decir, ausencia de anticuerpo anti-TG2 o EMA, así como una morfología intestinal normal. Las edades medias del grupo de los celíacos que no comen gluten incluidos en esta parte del estudio, fueron de 3 años. Todos los grupos fueron pareados de acuerdo a la edad. Además, considerando que la enfermedad presenta una prevalencia mayor en niñas que en niños, dos tercios de los participantes fueron niñas mientras que un tercio se correspondían con niños. Los controles incluidos en el estudio debían estar sanos, tener una genética diferente de los celíacos (HLA diferente del DQ2 o DQ8) y títulos de anticuerpos EMA y anti-TG2 negativos. Los estudios clínicos realizados fueron aprobados por el comité ético de los respectivos hospitales donde se situaban los biobancos usados (Bucarest, Rumania y Tampere, Finlandia). Las muestras fueron dadas voluntariamente por los tutores legales de los niños participantes, que firmaron un documento de consentimiento donde se les explicaba detalladamente el uso y los fines que se iban a dar a las muestras. Todos los datos clínicos de los participantes incluidos en el estudio, fueron debidamente almacenados de acuerdo a la legislación vigente y procesados con absoluta confidencialidad. Las muestras, a su vez, fueron etiquetadas mediante un código para mantener la confidencialidad de los participantes.

Los criterios de inclusión y exclusión de pacientes se describen a continuación:

- Para celíacos en fase activa, título de anticuerpos anti-TG2 elevado, así como positivos para EMA. Marsh positivo igual o por encima de III y un HLA positivo para DQ2/DQ8.

- Para celíacos en dieta sin gluten: 2 años tras el diagnóstico y la instauración de la dieta sin gluten, título de anticuerpos anti-TG2 y EMA negativo. Marsh 0 que consiste en una histología normal y un HLA positivo para DQ2/DQ8.

- Para controles, título de anticuerpos anti-TG2 y EMA negativos. Marsh 0 que consiste en una histología normal y un HLA negativo para DQ2 y DQ8.

2. Descripción de las muestras para estudio de proteómica.

Un total de 10 muestras de suero de niños controles sanos, 10 niños celíacos que comían gluten y los mismos niños cuando no comían gluten, con edades hasta los 3 años, fueron incluidos en esta fase preliminar del estudio (estudio clínico fase 1). Todos los grupos experimentales fueron pareados para una edad similar. Las muestras de sangre se distribuyeron en una relación de dos niñas por cada niño, es decir, 2 tercios representaban niñas, mientras que un tercio era de varones. Las muestras procedieron de niños menores de 3 años donde la edad se pareo en todos los grupos experimentales. Los criterios de inclusión y exclusión de muestras serológicas siguen lo descrito en el apartado 1 de material y métodos. Brevemente, los controles sanos que se usaron fueron niños y niñas que no tenían una genética compatible con la enfermedad celiaca y por consiguiente, es imposible que desarrollen la enfermedad. Por otro lado, los niños celíacos fueron diagnosticados mediante cambios morfológicos en biopsias intestinales. Estos cambios fueron clasificados en la escala Marsh como III. Además, en los niños donde se sospechaba celiaquía, el título de anticuerpos “anti-TG2, EMA y en algunos casos DGP fue estudiado en dichas muestras serológicas. Sólo se aceptaron como participantes en este estudio, aquellos niños que presentaban títulos de anticuerpos positivos para EMA y muy elevados para TG2. Además, se usaron muestras que procedían de niños cuando no comían gluten y por tanto eran negativos para los marcadores de diagnóstico descritos anteriormente, mientras que el mismo grupo de niños, cuando comían gluten, eran positivos para dichos marcadores. Por último, los sueros usados en este estudio inicial fueron combinados en diferentes pules (grupos) para simplificar el análisis. Las muestras fueron dadas voluntariamente por los tutores legales de los niños participantes, que firmaron un documento de consentimiento donde se les explicaba detalladamente el uso y los fines que se iban a dar a las muestras. Todos los datos clínicos de los participantes incluidos en el estudio, fueron debidamente almacenados de acuerdo a la legislación vigente y procesados con absoluta confidencialidad.

3. Array de proteómica.

3.1 Procesamiento de la muestra de suero.

Para la realización de los estudios clínicos incluidos en la presente tesis, se usaron muestras de sangre, en particular suero. Para la preparación del suero, 2 ml de sangre total fueron extraídos por punción venosa y se agregaron a un tubo para analítica de sangre. Una vez obtenida la sangre y para favorecer su coagulación, ésta se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las muestras de sangre fueron procesadas en el mismo día de recepción. Transcurrido el tiempo de incubación y tras comprobar la formación del coágulo, los tubos fueron centrifugados a 2000 g en una centrifuga para muestras serológicas, Beckman Coulter (Brea, CA, USA), a 10°C durante 15 minutos. El suero, identificado como el sobrenadante sin restos de células sanguíneas, fue retirado. Aproximadamente unos 500µl de suero fueron obtenidos, para posteriormente ser fraccionados en diferentes tubos de menor volumen y así evitar ciclos de congelación/ descongelación sobre la misma muestra. Todas las muestras fueron entonces almacenadas a -80°C hasta ser analizadas.

3.2 Array.

Las muestras de suero una vez recolectadas, y procesadas como se ha descrito anteriormente, fueron preparadas para ser usadas en el array de proteómica "Proteome Profiler Array- Human Angiogenesis Array" (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) que consiste en un array de 54 proteínas relacionadas con la angiogenesis, o el proceso de formación y/o destrucción de vasos sanguíneos. El suero de los diferentes pacientes fue combinado y procesado para detectar las 54 proteínas angiogénicas objeto de esta primera parte del estudio. Para evitar niveles bajos de señal en el array, el suero fue pretratado con 0.025N de ácido hidroclicídrico, ya que algunas proteínas circulantes en la sangre son complejas y aparecen estableciendo uniones entre sí, lo que da lugar a reducciones en la señal y por consiguiente a falsos negativos. Así, 250µl del ácido fueron incubados durante 15 minutos con el suero. El kit consta de unas membranas de nitrocelulosa donde se han incorporado anticuerpos frente a las 54 proteínas relacionadas con la angiogénesis, mediante la técnica del "dot". Este kit, tiene todos los reactivos necesarios para determinar las concentraciones de proteínas unidas a los 54 pares de anticuerpos, la composición de dichos reactivos no se detalla en el kit, de tal manera que el nombre de cada reactivo se designa por un número. Las membranas fueron, en primer lugar, bloqueadas en buffer de bloqueo para evitar uniones

inespecíficas de las proteínas del suero. Así, 2ml del buffer del array numero 7 se agregaron a las membranas y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente en agitación. Mientras las membranas se estaban bloqueando, 250µl de muestra pre-tratada con ácido hidroclicorídrico se incubaron con 750µl del buffer del kit numero 5 y con 500µl del buffer numero 4, junto con 15µl de un cóctel de anticuerpos para la detección de los 54 marcadores de angiogénesis, incubándose todo durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. Una vez incubada la muestra por un lado, y bloqueadas las membranas por otro, ambas fueron mezcladas para ser incubadas en agitación durante la noche entre 2 y 8 °C. Transcurrido este tiempo, las membranas fueron lavadas 3 veces con el buffer de lavado (provisto en el kit) durante 10 minutos en agitación. Así, 2ml de “streptavidine” conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) fueron agregados a las membranas que contenían por un lado las proteínas del suero unidas a los anticuerpos inmovilizados en la membrana y por otro lado, estas mismas proteínas estaban unidas a anticuerpos biotinilados. Así se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y en agitación. Las membranas entonces, fueron lavadas 3 veces, como se ha describió anteriormente. El exceso de líquido fue retirado de cada membrana, evitando que se secan, para agregarse 1ml del “Chemi Reagent Mix”, y luego cubrir las membranas con un protector de plástico. Cuidadosamente, las burbujas de aire atrapadas entre la membrana y el protector de plástico, fueron eliminadas y la membrana se dejó en incubación durante 1 minuto a temperatura ambiente. La hidrólisis del sustrato del “Chemi Reagent Mix” por parte de la HRP, permite la generación de una señal fluorescente medible. En condiciones de oscuridad, las membranas fueron puestas en un casete de auto-radiografía en contacto con una película de rayos X (GE Healthcare Amersham™ Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) de 1 a 30 minutos, para posteriormente ser reveladas usando un revelador automático (CP 1000, Agfa-Gevaert; Mortsel, Bélgica).

4. Cuantificación de los resultados.

Cada autoradiografía fue adquirida en un escáner en modo de transmisión, para posteriormente cuantificar la intensidad de la señal de las proteínas presentes o ausentes. El kit “Proteome Profiler Array- Human Angiogenesis Array” (R&D systems) trae un mapa que consiste en una impresión de la localización de cada proteína en un patrón transparente. Éste se sobrepone en la autoradiografía obtenida, de tal manera que

se pueden localizar las proteínas con señal positiva (la figura 1 muestra un ejemplo de dicho patrón). La tabla 1 muestra, la lista de proteínas incluidas en el kit y la tabla 2 muestra la ubicación de cada proteína dentro del kit así como el identificador del gen de la misma. A su vez, la membrana del kit contiene unos puntos de referencia de

Figura 1. Localización de cada proteína dentro del kit “Proteome Profiler Array- Human Angiogenesis Array” (R&D systems). Este patrón sirve para localizar la señal de las proteínas detectadas en una membrana de nitrocelulosa. La imagen ha sido modificada del manual del kit.

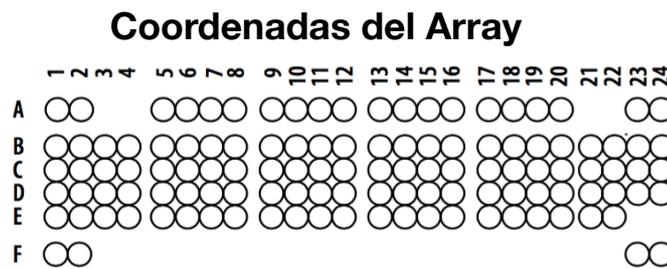


Tabla 1. Proteínas incluidas en el array de angiogénesis Proteome profile Array- Human Angiogenesis Array Kit, R&D y usadas en el presente estudio.

Proteínas	Proteínas	Proteínas	Proteínas
activin a	endothelin-1 (ET-1)	lap (TGF-beta1)	Plgf
adamts-1	FGF acidic (FGF-1)	leptin	prolactin
angiogenin (ang)	fgf basic (fgf-2)	MCP-1 (ccl2)	serpin b5 (maspin)
angiopoietin-1 (ANG-1)	fgf-4	mip-1a	serpin e1 (Pai-1)
angiopoietin-1 (ang-2)	fgf-7 (KGF)	mmp-8	serpin f1 (PEDF)
Angiostatin/plasminogen	GDNF	mmp-9	timp-1
amPHIregulin (AR)	GM-CSF	nrg1-beta1 (hrg1-beta1)	timp-4
artemin	hb-egf	pentraxin 3 (PTX-3 o TSq-14)	thrombospondin-1 (TSP-1)
coagulation factor III (TF)	hgf	PD-ecgf	THROMBOSPONDIN-2 (TPS-2)
cxcl16	igfbp-1	pdgf-aa	uPA
dppiv (CD26)	igfbp-2	pdgf-ab/pdgf-bb	vasohibin
egf	igfbp-3	persephim	vegf
eg-vegf (PK1)	il-1beta (il-1f2)	platelet factor (PF4 o cxcl4)	vegf-c
endostatin/collagen xviii	il-8 (cxcl8)		

Tabla 2. Localización de las proteínas incluidas en el array de angiogénesis Proteome profile Array- Human Angiogenesis Array Kit, R&D así como el identificador del gen que la expresa.

Coordenadas	Control o Nombre de la proteína	ID del gen	Coordenadas	Control o Nombre de la proteína	ID del gen
A1, A2	Punto de referencia	N/A	C15, C16	IL-1 β	3553
A5, A6	Activin A	3624	C17, C18	IL-8	3576
A7, A8	ADAMTS-1	9510	C19, C20	LAP (TGF- β 1)	7040
A9, A10	Angiogenin	283	C21, C22	Leptin	3952
A11, A12	Angiopoietin-1	284	C23, C24	MCP-1	6347
A13, A14	Angiopoietin-2	285	D1, D2	MIP-1 α	6348
A15, A16	Angiostatin/ Plasminogen	5340	D3, D4	MMP-8	4317
A17, A18	Amphiregulin	374	D5, D6	MMP-9	4318
A19, A20	Artemin	9048	D7, D8	NRG1- β 1	3084
A23, A24	Punto de referencia	N/A	D9, D10	Pentraxin 3 (PTX3)	5806
B1, B2	Coagulation Factor III	2152	D11, D12	PD-ECGF	1890
B3, B4	CXCL16	58191	D13, D14	PDGF-AA	5154
B5, B6	DPPIV	1803	D15, D16	PDGF-AB/PDGF-BB	5155
B7, B8	EGF	1950	D17, D18	Persephin	5623
B9, B10	EG-VEGF	84432	D19, D20	Platelet Factor 4 (PF4)	5196
B11, B12	Endoglin	2022	D21, D22	PIGF	5228
B13, B14	Endostatin/Collagen XVIII	80781	D23, D24	Prolactin	5617
B15, B16	Endothelin-1	1906	E1, E2	Serpin B5	5268
B17, B18	FGF acidic	2246	E3, E4	Serpin E1	5054
B19, B20	FGF basic	2263	E5, E6	Serpin F1	5176
B21, B22	FGF-4	2249	E7, E8	TIMP-1	7076
B23, B24	FGF-7	2252	E9, E10	TIMP-4	7079
C1, C2	GDNF	2668	E11, E12	Thrombospondin-1	7057
C3, C4	GM-CSF	1437	E13, E14	Thrombospondin-2	7058
C5, C6	HB-EGF	1839	E15, E16	uPA	5328
C7, C8	HGF	3082	E17, E18	Vasohibin	22846
C9, C10	IGFBP-1	3484	E19, E20	VEGF	7422
C11, C12	IGFBP-2	3485	E21, E22	VEGF-C	7424
C13, C14	IGFBP-3	3486	F1, F2	Punto de referencia	N/A
			F23, F24	Control negativo	N/A

señal que dan valores del 100% de señal, es decir, con esos puntos control medimos la intensidad de señal máxima. Por otro lado, la membrana también contiene unos puntos donde no hay muestra de ningún tipo y cuya señal solo se corresponde con el ruido de fondo.

La intensidad de la señal de las proteínas, fue medida con el programa de análisis de imagen, "Image J" [249]. Una vez capturadas las imágenes, fueron exportadas a "Image J" para ser transformadas en escala de grises, y posteriormente ser cuantificadas por densitometría. Este método consiste en medir los píxeles de cada punto, en nuestro caso, de los niveles de expresión de las proteínas que dieron señal positiva en el kit. Por otro lado, se midió la señal máxima gracias a unos controles provistos localizados en las membranas, así como el ruido de fondo o señal negativa (ver tabla 2 para más detalles). Cada proteína relacionada con la angiogénesis e incluida en el array, se encuentra en la membrana por duplicado y por consiguiente, la señal final representa el valor de la media de las medidas de los dos puntos. Además, el valor de la señal del ruido de fondo fue sustraído de todas las medidas, (ya que se asocia a la autofluorescencia de la membrana o a las uniones inespecíficas de los anticuerpos).

4.1 Analysis y obtención de los datos.

Una vez obtenidos todos los valores de expresión de las proteínas angiogénicas y tras el cálculo del valor medio de cada pareja de duplicados, el ruido de fondo fue eliminado de dichas cantidades y el valor resultante fue dividido por la señal máxima. Esto es necesario ya que cada set de muestras, que representan a los grupos experimentales, fue cargado en una membrana diferente, y por consiguiente puede ocurrir que las variaciones encontradas se deban a estas diferencias de señal intrínsecas a cada membrana y no a diferencias reales en la muestra de acuerdo al grupo experimental. Una vez realizada esta normalización, la diferencia existente entre los grupos experimentales fue calculada por el método del "Fold Change", es decir, dividiendo el valor de los celíacos no tratados por el control, el valor de los celíacos que no comen gluten por el control y el valor de los celíacos no tratados por el valor de los celíacos que no comen gluten. A partir de las diferencias obtenidas, se calculó el logaritmo en base dos de dicho valor normalizado, donde las proteínas sobre expresadas se representan con valores positivos, mientras que las que están disminuidas, lo hacen con valores negativos. El "p" valor o las diferencias en la significación estadística se fijaron en valores de menos de 0.05, que fueron calculados

por el test Welch's, un test de elección para este tipo de estudios. Con este método, los valores que diferían 0.5 veces de los controles fueron aceptados como valores significativos mientras que los que solo diferían 0.3 se consideraron marginales, (aunque fueron incluidos también en el estudio).

4.2 Representación de los resultados por un “heat map” y diagramas de Venn.

Todas las 54 proteínas estudiadas por proteómica fueron representadas usando un “heat map” donde la expresión relativa de cada proteína es representada mediante una gradación de colores. Para representar dichos valores, se usó la aplicación web “heatmapper” (<http://www.heatmapper.ca/expression/>), donde los valores de expresión de todas las proteínas pertenecientes a cada grupo experimental fueron introducidas. Entonces, el algoritmo calculó la relación entre los grupos mediante una clusterización que usa el método del “Complete Linkage”. Este método se basa en el cálculo de las distancias más cercanas entre proteínas, determinadas por el test de Kedall's Tau, o un test que cuenta el número de desacuerdos entre diferentes sets de muestras, en nuestro caso de proteínas. Distancias más largas determinadas por este método, revelan más diferencias entre una condición y otra, mientras que distancias más próximas reflejan similitudes. Una vez realizado este análisis, las diferencias de expresión de los marcadores angiogénicos fueron expresadas mediante un código de color donde, valores negativos o rojos, se corresponden con las proteínas que están disminuidas en los grupos experimentales en relación al control, mientras que aquellas que representan valores positivos o verdes, representan proteínas sobre expresadas. A su vez, las proteínas que aparecieron aumentadas o disminuidas en relación al control en los celíacos, tanto si comían gluten como si no, fueron representadas en un diagrama de Venn, usando la aplicación web <http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> [250]. Este tipo de representación muestra las relaciones que existen entre las proteínas objeto de nuestro estudio y reconoce qué proteínas son comunes entre los grupos y cuáles no, lo que facilitó el análisis y la elección de los marcadores candidatos para una fase clínica posterior.

5. Test de Enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA) en suero de pacientes: Fases clínicas 2 y 3.

De todos los valores significativos obtenidos en el array descrito anteriormente, aquellas proteínas que se encontraron aumentadas o disminuidas en relación con los controles, fueron seleccionadas. El criterio principal de selección de las proteínas candidatas para su validación en la fase clínica 2-3, se centró en primera instancia en los valores de significación respecto de los controles. Otros criterios secundarios usados, fueron la existencia de kits ELISA en el mercado, cantidad de muestra a usar en los kit ELISA así como su dilución, el precio de los mismos y sobre todo si éstos eran específicos de humanos. Algunos kits ELISA estaban indicados primariamente para ratón y aunque reaccionaban con muestras de humanos, decidimos no incluir dichas proteínas en la validación. En estos casos, se dio prioridad a aquellos kits ELISA específicos de proteínas humanas, aunque las diferencias observadas en la proteómica fueran menores. A continuación, se precisan en más detalle los grupos experimentales incluidos, así como los protocolos usados en la detección de los marcadores por ELISA. Por último citar que, los kits usados en esta fase clínica no estaban indicados para diagnóstico.

5.1 Grupos experimentales, preparación de muestras y protocolos específicos de los ELISA usados para cada marcador.

Un total de 450 pacientes y controles, fueron usados en esta parte del estudio, lo que se corresponde con fases clínicas 2-3. Las muestras de los pacientes o de los controles procedieron de dos bio-bancos situados en Rumania y en Finlandia (como se ha descrito en los apartados 1 y 2 del presente material y métodos). Los pacientes o voluntarios incluidos en el estudio, tenían edades que llegaban hasta los 5 años. En algunos casos específicos, edades mayores fueron incluidas. Los grupos experimentales usados en esta fase clínica, fueron:

1. Controles sanos genéticamente compatibles con los celíacos, es decir, positivos para HLA DQ2 o DQ8.
2. Controles sanos genéticamente incompatibles con la celiaquía y por consiguiente, que nunca pueden padecer la enfermedad.

3. Controles enfermos, es decir, niños que presentan alguna patología digestiva diferente a la enfermedad celiaca y que no son genéticamente compatibles con la celiacía.

4. Grupo de celiacos que no comían gluten y por tanto no tienen ninguna patología asociada.

5. El mismo grupo de niños celiacos cuando comían gluten donde se observaron cambios histológicos en la mucosa digestiva, así como un elevado título de anticuerpos, (como quedó descrito en los apartados 1 y 2 del presente material y métodos).

Los criterios de inclusión de pacientes para el grupo de los celiacos explicados en el apartado 1 del presente material y métodos, incluyen la presencia de síntomas, acompañados de títulos de anticuerpos EMA y anti-TG2 positivos para celiacos en fase activa, mientras que valores nulos de anticuerpos y ausencia de síntomas, para aquellos celiacos tras dos años de dieta sin gluten. El HLA fue determinado en los niños incluidos en esta fase del estudio, usándose como un tercer criterio de inclusión/exclusión. En el momento de la realización de esta parte del trabajo, los niños ya no eran biopsiados para su diagnóstico, y por consiguiente los criterios de inclusión/exclusión se basaron exclusivamente en la presencia/ausencia de un cuadro clínico, y de los títulos de anticuerpos circulantes [153]. A su vez, los controles fueron divididos principalmente en dos categorías. Por un lado niños sanos, con genotipos diferentes del HLA DQ2/DQ8, ausencia de cuadro clínico y títulos de anticuerpos nulos. Por otro lado, incluimos un grupo de controles sanos que tienen un HLA DQ2/DQ8 similar al de los celiacos, pero que no son celiacos. El criterio de inclusión de estos niños consistió en, la presencia del genotipo de celiacía, ausencia de cualquier síntoma clínico, título de anticuerpos negativo y la presencia de gluten en su dieta. A este grupo suelen pertenecer los hermanos de aquellos niños celiacos diagnosticados en nuestro estudio. Para algunos marcadores, un tercer grupo de controles fue agregado, donde se incluyen niños con otros trastornos digestivos, que presentan un cuadro clínico diferente de celiacía, ausencia de anticuerpos anti-EMA y anti-TG2 y presencia de gluten en la dieta.

Los datos epidemiológicos muestran que por cada dos mujeres que padecen de celiacía solo hay un hombre y por consiguiente las muestras experimentales se repartieron de la misma manera, es decir, 2 tercios de las muestras incluidas en los

grupos controles o en los grupos de celíacos se correspondían con niñas y un tercio fueron muestras de niños [213]. Los estudios clínicos realizados fueron aprobados por el comité ético de los respectivos hospitales donde se situaban los bio-bancos y fueron registrados de acuerdo a la legislación. Las muestras fueron dadas voluntariamente por los tutores legales de los niños participantes, que firmaron un documento de consentimiento donde se les explicaba detalladamente el uso y los fines que se les iban a dar. Todos los datos clínicos de los participantes en el estudio fueron debidamente almacenados de acuerdo a la legislación vigente y procesados con absoluta confidencialidad. Las muestras a su vez fueron etiquetadas con un código para mantener la confidencialidad de los participantes.

Las muestras de sangre se prepararon para la obtención de suero como se describió en el apartado 2 del presente material y métodos. Una vez obtenido el suero, la muestra fue diluida en buffer de dilución (provisto con el kit) si así era necesario. Una muestra control fue usada para testar que los valores de los marcadores estudiados entraran dentro de la curva de calibrado del kit y la dilución se realizó de acuerdo a esta información. A continuación, se detalla el protocolo del ELISA para cada marcador.

5.1.1 ELISA para “Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4” TIMP-4.

El test usado es un ELISA tipo “Sandwich” de Abcan (Cambridge, UK, para más detalles sobre el kit revisar la tabla 3), que viene preparado para la detección de TIMP-4 de origen humano en muestras de suero. Todos los reactivos fueron preparados de acuerdo a las instrucciones facilitadas por el fabricante. El suero una vez preparado, fue diluido 10 veces en el buffer de dilución suministrado con el kit. Entonces, 100 µl de los estándares y de muestra de todos los grupos experimentales incluidos en el estudio, fueron agregados a una placa de 96 pocillos que contiene anticuerpos inmovilizados frente a TIMP-4. Tras una incubación de 2,5 horas a temperatura ambiente, el contenido del pocillo fue descartado, quedando solo aquellas proteínas que se corresponden con TIMP-4 y que estaban unidas a los anticuerpos absorbidos a la superficie del pocillo. Posteriormente, tras unos lavados, 100 µl de anticuerpo frente a TIMP-4 conjugados con “Biotin”, fueron agregados a cada pocillo para ser incubados durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras 4 lavados en buffer de lavado, (suministrado con el kit), 100µl de buffer de detección que contiene HRP conjugada

con “Streptavidine” fueron agregados a cada pocillo e incubados 45 minutos a temperatura ambiente. Entonces, tras 4 lavados, 100µl de sustrato “3,3’,5,5’-Tetramethylbenzine” (TMB) fueron agregados a cada pocillo y la presencia de HRP produjo un compuesto coloreado proporcional a la cantidad de proteína detectada, tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. La reacción de color fue parada por la adición de 50µl de solución stop (suministrado con el kit), para medir las variaciones de color a 450nm. Finalmente, se realizó una curva donde se tomaron los valores de concentración de los patrones estándares y se representaron en el eje de las “X” frente a los valores de absorbancia en el eje de las “Y”. Para poder calcular la concentración de TIMP-4 de cada muestra, el valor de

Tabla 3. Información de los kits ELISA usados en el presente estudio.

Nombre de la Proteína	Kit information
TIMP-4	abcan TIMP4 Human ELISA Kit ab113328
NRG-1 BETA1	ab100614 NRG1 beta 1 Human ELISA Kit, abcam http://www.abcam.com/nrg1-beta-1-human-elisa-kit-ab100614.html
Pentraxin 3	HUMAN PENTRAXIN 3 (PTX3) ELISA KIT Aviscera Bioscience http://www.aviscerabioscience.com/Product_Systems/PTX3/PTX3.html
ADAMTS-1	ADAM Metallopeptidase with Thrombospondin Type 1 Motif, 1 (ADAMTS1) ELISA Kit http://www.antibodies-online.com/kit/415114/ADAM+Metallopeptidase+with+Thrombospondin+Type+1+Motif+1+ADAMTS1+ELISA/
Angiostatin	RAB0407 Sigma Human Angiostatin ELISA Kit http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Bulletin/1/rab0407bul.Par.0001.File.tmp/rab0407bul.pdf

absorbancia fue interpolado en la curva de patrones. El valor así obtenido fue multiplicado por 10 ya que este es el factor de dilución usado y fue representado usando Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Para evitar la variabilidad en los resultados debido a errores metodológicos, cada estándar o muestra fueron incluidos por duplicado. La concentración final se obtuvo a partir de la media de los valores de absorbancia de cada pareja de duplicados.

5.1.2 ELISA para “Neuregulin” o NRG1- β 1.

El test usado es un ELISA tipo “Sandwich” de Abcan (Cambridge, UK, para más detalles sobre el kit revisar la tabla 03). Este kit no estaba testado por el fabricante, para la detección en suero de NRG1- β 1. Por esto, antes de su uso, hicimos pruebas donde observamos que los niveles de la proteína eran medibles. Todos los reactivos y los estándares fueron preparados previamente a la realización del kit de acuerdo al protocolo facilitado por el fabricante. Las muestras de los pacientes y de los voluntarios sanos, incluidos en el estudio clínico, no fueron diluidas y 100 μ l de las mismas fueron cargadas en sus correspondientes pocillos donde los anticuerpos anti-NRG1- β 1 estaban inmovilizados. Tras una incubación durante la noche a 4°C, las proteínas no unidas a los anticuerpos fueron succionadas del pocillo, para posteriormente ser lavadas, durante 4 veces, en buffer de lavado. Así, 100 μ l de anticuerpos anti-NRG1- β 1 conjugados con “Biotin”, fueron agregados a cada pocillo, e incubados durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, cada pocillo fue lavado 4 veces en buffer de lavado, para seguidamente agregar HRP conjugada con “Streptavidin”. Tras una incubación de 45 minutos a temperatura ambiente y en agitación, se repitieron los lavados descritos anteriormente, para agregar seguidamente 100 μ l de TMB. La reacción coloreada se produjo a temperatura ambiente durante 30 minutos en agitación y fue detenida mediante la adición de 50 μ l de solución de stop (suministrada en el kit). La absorbancia a 450nm fue medida a consecuencia de la reacción de color producida y los valores de concentración de los estándares fueron representados en relación a sus correspondientes valores de absorbancia. La concentración de NRG1- β 1 en las muestras de pacientes así como en los donantes sanos, fue calculada a partir del valor medio de las absorbancias respectivas de cada pareja de duplicados, tras la interpolación en la curva estándar. El valor de concentración calculado fue representado usando Prism 6 (GraphPad Software).

5.1.3 ELISA frente a “Pentraxin-3”.

Para detectar los niveles de “Pentraxin-3”, se usó un ELISA cuantitativo tipo “Sandwich” de Aviscera Biosciences (Santa Clara, CA, USA, para más detalles ver la tabla 03), que se compone de todos los reactivos necesarios para la identificación de la proteína en muestras de suero. Todos los reactivos fueron preparados de acuerdo a las instrucciones del fabricante, antes de la realización del kit. Entonces, 100 µl de los estándares y de muestra sin diluir, de todos los grupos experimentales incluidos en el estudio, fueron agregados a una placa de 96 pocillos que contiene anticuerpos inmovilizados frente a “Pentraxin-3”. Tras una incubación de 2 horas a temperatura ambiente y en agitación, cada pocillo se lavo en buffer de lavado (suministrado por el kit). Entonces, 100 µl de anticuerpo para la detección de “Pentraxin-3” conjugado con HRP fueron agregados a cada pocillo, e incubados 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Una nueva serie de lavados fue realizada, para inmediatamente agregar 100µl del sustrato TMB que sería incubado durante 15 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. La reacción de color, del azul al amarillo proporcional a la concentración de proteína existente en la muestra, fue detenida en 100 µl de solución de parada (suministrada por el kit). La densidad óptica en cada pocillo, fue medida a 450nm durante los primeros 15 minutos después de detener la reacción de color. Los valores de concentración de los patrones estándares, se representaron frente a sus valores de absorbancia, donde se interpoló el valor de absorbancia de las muestras problema y así se calculo su concentración. El valor de concentración, así obtenido, fue representado usando Prism 6 (GraphPad Software). Para evitar la variabilidad en resultados debido a errores metodológicos, cada estándar así como muestra fueron incluidos por duplicado. La concentración final se obtuvo a partir de la media de los valores de absorbancia de cada pareja de duplicados.

5.1.4 ELISA para “A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin 1” (ADAMTS-1).

Para la detección de ADAMTS-1 de origen humano en muestras de suero, un ELISA tipo “Sandwich” de Antibodies online GmbH (Aachen, Alemania, para más detalles sobre el kit revisar la tabla 03) fue usado. Al ser un kit comercial, todos los reactivos y los estándares fueron preparados de acuerdo a las instrucciones dadas por

el fabricante. Así, 100 µl de estándares o de muestra fueron agregados a una placa de 96 pocillos que contenían anticuerpos frente a ADAMTS-1 de origen humano. Las muestras de suero fueron diluidas 1:1000 en buffer de dilución provisto con el kit. Tras una incubación de 2 horas a 37°C, el contenido del pocillo fue descartado para eliminar el exceso de proteínas no unidas a los anticuerpos en el pocillo. Posteriormente, 100 µl de buffer de detección A, que consiste en un segundo anticuerpo contra ADAMTS-1 conjugado con “Biotin”, fueron agregados a cada pocillo para ser incubados durante 1 hora a 37°C. Tras 3 lavados en buffer de lavado (suministrado con el kit), 100 µl de buffer de detección B fueron agregados a cada pocillo e incubados durante 30 minutos a 37°C. Dicho buffer consiste en “Avidin” conjugada con HRP, ya que la “Avidin” presenta una muy alta eficiencia de unión a la “Biotin”. Finalmente, 90 µl de una solución de sustrato que contiene TMB fue agregada a cada pocillo e incubada durante 10-20 minutos a 37°C. En aquellos pocillos donde ADAMTS-1 estaba presente, la adición de TMB produjo una reacción coloreada por su hidrólisis con la HRP. Para evitar la saturación en el color, la reacción fue detenida por la adición de 50 µl de ácido sulfúrico (suministrado con el kit). Así, las variaciones de color, que son proporcionales a la cantidad de proteína presente, fueron detectadas en un espectrofotómetro a 450nm. Una curva donde se representaron los valores de concentración de los patrones estándares en el eje de las “X” frente a los valores de absorbancia en el eje de las “Y”, fue usada para interpolar el valor de absorbancia de las muestras de los pacientes y controles. El valor de la concentración de ADAMTS-1 calculado para cada muestra, fue multiplicado por el factor de dilución y representado usando Prism 6 (GraphPad Software). Todos los estándares y las muestras fueron incluidas por duplicado, para evitar las variaciones en los resultados debidos a errores metodológicos, y el valor final de la concentración se obtuvo como resultado de la media de las medidas de absorbancia para cada pareja de duplicados.

5.1.5 ELISA para “Angiostatin”.

El test usado es un ELISA tipo “Sandwich” de Millipore (Burlington, MA, USA, para más detalles sobre el kit revisar la tabla 03), que viene preparado para la detección de “Angiostatin” de origen humano en muestras de suero. Todos los reactivos fueron preparados de acuerdo a las instrucciones facilitadas por el fabricante. El suero una vez preparado, fue diluido 3 veces en el buffer de dilución suministrado con el kit.

Entonces, 100 µl de los estándares y de muestra de todos los grupos experimentales incluidos en el estudio, fueron agregados a una placa de 96 pocillos que contiene anticuerpos inmovilizados frente a “Angiostatin”. Tras una incubación de 2,5 horas a temperatura ambiente, el contenido del pocillo fue descartado, quedando solo aquellas proteínas que se corresponden con la “Angiostatin” y que estaban unidas a los anticuerpos absorbidos a la superficie del pocillo. Posteriormente, 100 µl de anticuerpo frente a “Angiostatin” conjugado con “Biotin”, fueron agregados a cada pocillo para ser incubados durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras 3 lavados en buffer de lavado, (suministrado con el kit), 100µl de buffer de detección que contiene HRP conjugada con “Streptavidin” fueron agregados a cada pocillo e incubados 1 hora a temperatura ambiente. Entonces, 100µl de sustrato TMB fueron agregados a cada pocillo y la presencia de HRP produjo un compuesto coloreado proporcional a la cantidad de proteína detectada, tras una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente en condiciones de oscuridad. La reacción de color fue parada por la adición de 50µl de solución stop (suministrado con el kit), para medir las variaciones de color a 450nm. Finalmente, se realizó una curva donde se tomaron los valores de concentración de los patrones estándares y se representaron en el eje de las “X” frente a los valores de absorbancia en el eje de las “Y”. Para poder calcular la concentración de “Angiostatin” de cada muestra, el valor de absorbancia fue interpolado en la curva de patrones. El valor así obtenido fue multiplicado por 3 ya que este es el factor de dilución usado y fue representado usando Prism 6 (GraphPad Software). Para evitar la variabilidad en los resultados debido a errores metodológicos, cada estándar o muestra fueron incluidos por duplicado. La concentración final se obtuvo a partir de la media de los valores de absorbancia de cada pareja de duplicados.

5.2 Análisis estadístico de los resultados de los ELISA.

Una vez finalizados todos los test ELISA, los valores de la concentración de las proteínas fueron introducidos en Prism 6 (GraphPad Software), para su posterior análisis estadístico. Antes de seleccionar el test estadístico apropiado, un primer muestreo de los datos fue realizado para determinar la homocedasticidad de la varianza de cada grupo de proteínas. Si las variables son homocedásticas, es apropiado usar un test ANOVA, mientras que si no son homogéneas, el test Kruskal-Wallis es la alternativa no paramétrica de elección. En el caso de nuestros resultados, todas las proteínas

estudiadas resultaron ser no homocedásticas, y por consiguiente se prefirió el uso de un test Kruskal-Wallis. Consideramos los valores significativos, cuando como resultado del test estadístico, obtuvimos diferencias menores de 0.05. A los grupos de proteínas que resultaron significativas, se les incluyó en un segundo test “post hoc” donde se estudiaron las diferencias existentes en cada grupo experimental mediante el test de Dunn’s. Todos los valores de las proteínas se representaron en diagramas de barras donde la significación se expresa por asteriscos, (1 asterisco refleja diferencias de alrededor de 0.05, 2 representan diferencias de menos de 0.01, 3 ó más representan valores tremendamente significativos con diferencias de 0.001 ó 0.0001 respectivamente). A su vez, el error medio estándar fue calculado y representado en cada gráfica.

En aquellos marcadores donde se observaron diferencias significativas respecto a sus grupos control, la especificidad y sensibilidad del marcador fue estudiada mediante la elaboración de una curva de característica operativa del receptor o ROC. Esta representación, relaciona la especificidad y sensibilidad de un marcador considerando la cantidad de valores positivos verdaderos frente a los falsos positivos, así como los negativos verdaderos frente a los falsos negativos. Sólo se aceptaron aquellas curvas ROC que resultaron estadísticamente significativas, y en éstas, el área bajo la curva que representa el porcentaje de la sensibilidad-especificidad fue calculado. Cuando este área fue mayor del 90%, el marcador se aceptó como muy fiable, valores de entre 80% y 90% se tomaron como fiables, mientras que los valores de menos del 80% se consideraron poco o muy poco fiables. A su vez, el índice de Youden o Youden’s J fue calculado a partir de las curvas ROC. Este valor es considerado como un test estadístico fiable para determinar el valor umbral de un marcador a partir del cual un paciente es positivo o negativo.

6. Células.

6.1 Obtención de Fibroblastos a partir de Biopsias Digestivas.

Los fibroblastos usados en nuestros estudios, fueron aislados a partir de biopsias frescas obtenidas para el diagnóstico de pacientes en los biobancos ya descritos en el apartado 1 de materiales y métodos. Estas biopsias procedían de pacientes positivos para celiaquía, de acuerdo a los criterios descritos en el apartado 1 de materiales y métodos. El protocolo para el aislamiento de fibroblastos, ha sido descrito

anteriormente [251]. Brevemente, las biopsias fueron lavadas con PBS sin calcio ni magnesio (GIBCO, Finlandia) y cortadas en pequeños fragmentos que fueron incubados en medio HAM's F12 (GIBCO), que contiene "liberase blendzyme" (ROCHE, Finlandia) a 37°C durante 3 horas en un incubador para células. Tras esta incubación, el medio de cultivo fue centrifugado a 100g durante 5 minutos a 4°C para separar los fragmentos de tejido de los fibroblastos. Las células así obtenidas, fueron cultivadas en una placa petri en medio de cultivo, Ham's F12 (GIBCO), suplementado con un 10% de suero bovino (FBS, GIBCO) y 4% de penicilina/estreptomicina (GIBCO). Las células se dejaron en cultivo hasta confluencia para, posteriormente realizar sucesivos pases. Una vez establecida la línea celular, una pequeña fracción de células, fue teñida para marcadores específicos de fibroblastos y así corroborar la presencia de este tipo celular. Las células usadas en los experimentos se usaron en pases mayores de 3 pero siempre menores de 10. Para los experimentos se usaron 8 líneas celulares procedentes de 4 pacientes celíacos, 2 líneas del sexo femenino y dos del sexo masculino.

6.2 Obtención de células de riesgo.

Al momento del nacimiento diferentes cordones umbilicales de niños en riesgo de padecer celiaquía o controles sin riesgo, fueron recolectados. Un niño en riesgo de ser celíaco, se definió porque dicho niño, tenía un grado de parentesco de primer o segundo orden con familiares donde varias generaciones han sufrido de celiaquía. Además estos niños son positivos para el HLA. Los cordones fueron guardados en PBS y almacenados hasta ser procesados en las 24 horas siguientes al nacimiento. Una vez recepcionados en el laboratorio, los tres vasos sanguíneos que se encuentran en el cordón, fueron lavados mediante inyección de unos 50-70 ml de PBS. Este lavado permitió la eliminación de restos de sangre y otros tipos celulares. Tras el lavado, una inyección de colagenasa al 10% con medio EGM-2 (GIBCO), fue inyectada en los vasos sanguíneos. El medio de cultivo, que contenía la colagenasa fue retenido dentro del vaso sanguíneo durante un tiempo de entre 5 a 10 minutos, para tomar exclusivamente el endotelio vascular. Transcurrido este tiempo, el medio de cultivo que contenía colagenasa junto con las células endoteliales fue almacenado. A su vez, sucesivos lavados en PBS fueron realizados para tomar el máximo posible de células disgregadas que pudieran quedar en el vaso sanguíneo del cordón umbilical. Todas estas fracciones fueron mezcladas y centrifugadas a 500 g durante 10 minutos a

temperatura ambiente. Una vez eliminado el sobrenadante, las células así obtenidas fueron resuspendidas y cultivadas en medio EGM-2 (GIBCO) específico de células endoteliales y que está suplementado con 10% FBS (GIBCO) y 5% penicilina/estreptomicina (GIBCO) así como otros factores de crecimiento suministrados por la casa comercial. Las células permanecieron en cultivo durante diferentes pases sucesivos. Anticuerpos frente al marcador angiogénico PECAM conjugados con ficoeritrina (Abcan), fueron incubados 1 hora a temperatura ambiente con las células. Tras una serie de lavados, la señal del marcador y por tanto la pureza del cultivo de células endoteliales, fue determinada por citometría de flujo. Las células fueron mantenidas en cultivo al menos 3 pases sucesivos y usadas en los experimentos entre el pase 3 y 10. Para los experimentos se usaron 6 líneas celulares que procedían de 3 controles y 8 líneas celulares procedentes de 4 niños de riesgo de celiaquía.

4. Resultados

1. Proteómica del suero de pacientes: Fase clínica 1.

1.1 Estudio de marcadores angiogénicos en celíacos.

El primer objetivo en el presente trabajo fue determinar si los celíacos durante la fase activa de la enfermedad o cuando no comen gluten, y por tanto no están enfermos, presentan un perfil angiogénico específico que los diferencia de los controles que no son celíacos, mediante un estudio de fase clínica 1 (es decir en menos de 10 pacientes). Este perfil, de ser diferencial, podría por sí mismo constituir un conjunto de marcadores útiles en la identificación de los celíacos. Así, centramos nuestros esfuerzos en estudiar 54 proteínas que se relacionan con la angiogénesis mediante un “array de proteómica”, donde las diferencias en los niveles circulantes en el suero de estas proteínas son observables de manera semi-cuantitativa. Los criterios de inclusión y exclusión para los participantes en esta fase del estudio, descritos en el apartado 1 de material y métodos, determinaron la inclusión de un total de entre 6 a 10 muestras por grupo experimental.

La figura 2, muestra los resultados del array, donde se observan las diferencias de expresión en los niveles circulantes de las 54 proteínas relacionadas con la angiogénesis entre los grupos experimentales. Tras el análisis por densitometría de la expresión de las proteínas en dichas membranas, un total de 33 proteínas, se encontraron alteradas en los celíacos en relación con sus controles (tablas 4-6). Al comparar los celíacos en la fase activa de la enfermedad con los controles sanos, encontramos que 17 proteínas relacionadas con la angiogénesis, estaban sobre expresadas mientras que otras 11 se encontraban disminuidas (tabla 4). Para discriminar cuales de estas proteínas están simplemente alteradas a consecuencia de la fase activa de la enfermedad y no porque sus valores sean constitutivos en los celíacos, realizamos otros dos análisis. Por un lado, se estudiaron las diferencias de expresión de las proteínas circulantes relacionadas con la angiogénesis en los celíacos cuando no comen gluten en comparación con los controles sanos (tabla 5). En este caso, 8 proteínas relacionadas con la angiogénesis, estaban sobre expresadas mientras que otras 25 se encontraban disminuidas, cuando se establecieron comparaciones con los controles sanos. Un último análisis donde se compararon los niveles de proteínas de niños celíacos en la fase activa de la enfermedad, o los valores de aquellos mismos niños tras dos años de dieta sin gluten (tabla 6), mostró que 29 proteínas se encuentran aumentadas mientras que otras 4 estaban disminuidas.

Figura 2. Perfil vascular en controles sanos, celíacos que comían gluten (UCD) y celíacos que no comían gluten (GFD) para 54 proteínas relacionadas con la angiogénesis (Proteome profile Array). Cada punto refleja los niveles circulantes de cada proteína relacionada con la angiogénesis, que son detectadas en el suero de los controles sanos, UCD y GFD respectivamente. Cada proteína es detectada por duplicado y los píxeles de cada pareja fueron normalizados usando los puntos de referencia que se encuentran en los bordes de la membrana.

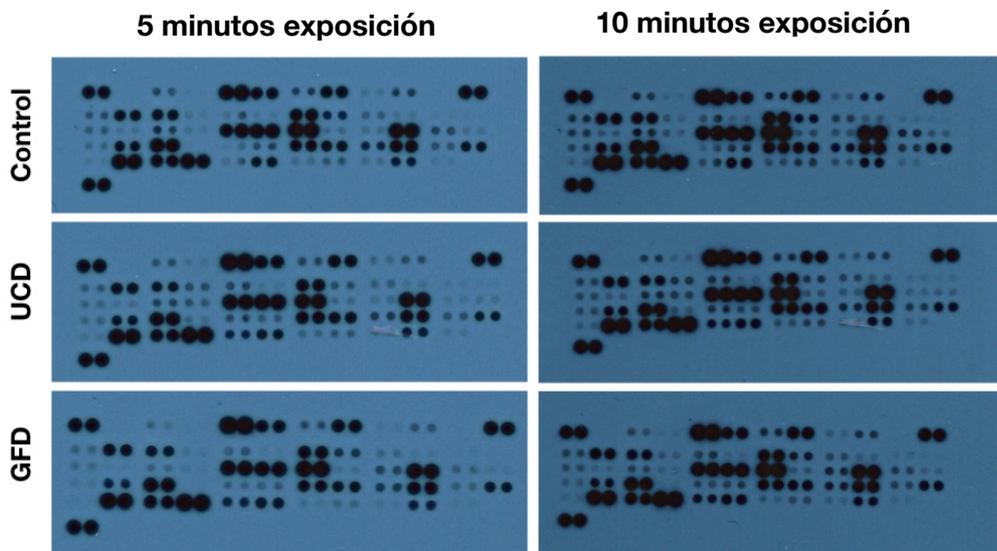


Tabla 4. Valores de expresión de proteínas obtenidos en muestras de suero de niños por el Proteome profile Array, cuando se comparan el grupo de celíacos que comen gluten, con los controles sanos. Los resultados se expresan en el logaritmo en base 2 de la diferencia de expresión. Valores positivos significan niveles de la proteína mayores en los celíacos, valores negativos significan expresiones menores en los celíacos cuando se comparan con el control sano.

Nombre de la Proteína	log2 fold change Celiaco no tratado vs Control	Nombre de la Proteína	log2 fold change Celiaco no tratado vs Control
TIMP-4	4.18	PDGF-aa	0.48
NRG1-beta1 (hrg1-beta1)	3.89	FGF acidic (FGF-1)	0.43
EGF	3.34	PDGF-ab/pdgf-bb	0.42
Pentraxin 3 (PTX-3 o TSg-14)	2.97	HB-EGF	-0.31
EG-VEGF (PK1)	2.59	VEGF-c	-0.32
HGF	2.48	IL-8 (cxcl8)	-0.33
Thrombospondin -2 (TPS-2)	2.46	Activin a	-0.35
MIP-1a	0.87	GDNF	-0.73
FGF basic (fgf-2)	0.82	PD-ECGF	-0.76
ADAMTS-1	0.75	Artemin	-0.79
Amphiregulin (AR)	0.66	FGF-7 (KGF)	-0.84
MCP-1 (ccl2)	0.53	Endothelin-1 (ET-1)	-1.14
Plgf	0.52	Leptin	-1.91
Endostatin/collagen xviii	0.50	FGF-4	-3.48

Tabla 5. Valores de expresión de proteínas obtenidos en muestras de suero de niños por el Proteome profile Array, cuando se comparan los grupos de celíacos que no comen gluten con los controles sanos. Los resultados se expresan en el logaritmo en base 2 de la diferencia. Valores positivos de expresión significan niveles circulantes de la proteína mayores en los celíacos, mientras que valores negativos reflejan una menor expresión en relación con el control sano.

Nombre de la Proteína	log2 fold change Celiaco que no come gluten vs Control	Nombre de la Proteína	log2 fold change Celiaco que no come gluten vs Control
TIMP-4	3.94	Amphiregulin (AR)	-0.73
NRG1-beta1 (hrg1-beta1)	2.42	Plgf	-0.76
EG-VEGF (PK1)	1.16	Vasohibin	-0.79
Pentraxin 3 (PTX-3 o TSg-14)	1.15	Thrombospondin-2 (TPS-2)	-0.83
IL-8 (cxcl8)	1.03	PD-ECGF	-0.96
Serpin b5 (maspin)	0.67	HGF	-1.01
CXCL16	0.46	Artemin	-1.03
ADAMTS-1	0.42	MMP-8	-1.12
IGFBP-2	-0.30	Leptin	-1.16
Endothelin-1 (ET-1)	-0.38	GDNF	-1.17
EGF	-0.45	Activin a	-1.42
VEGF-c	-0.48	uPA	-1.48
VEGF	-0.49	MIP-1a	-1.87
Persephim	-0.57	HB-EGF	-2.37
Angiopietin-1 (ang-2)	-0.57	GM-CSF	-3.09
FGF acidic (FGF-1)	-0.58	MCP-1 (ccl2)	-5.49
FGF-4	-0.63		

Tabla 6. Valores de expresión de proteínas obtenidos a partir de muestras de suero de niños usando el Proteome profile Array, cuando se comparan los grupos de celíacos que comen gluten con los mismos niños cuando no lo comen. Los resultados se expresan en el logaritmo en base 2 de la diferencia. Valores positivos muestran una mayor expresión de proteínas, mientras que valores negativos reflejan una expresión menor.

Nombre de la Proteína	log2 fold change Celiaco no tratado vs Celiaco no come gluten	Nombre de la Proteína	log2 fold change Celiaco no tratado vs Celiaco no come gluten
MCP-1 (ccl2)	6.36	Vasohibin	0.78
Thrombospondin-2 (TPS-2)	4.54	FGF basic (fgf-2)	0.74
EGF	3.69	VEGF	0.64
MIP-1a	2.67	IL-1beta (il-1f2)	0.61
Pentraxin 3 (PTX-3 o TSg-14)	2.21	NRG1-beta1 (hrg1-beta1)	0.53
GM-CSF	2.11	GDNF	0.48
HB-EGF	2.07	PDGF-ab/pdgf-bb	0.47
HGF	1.91	Coagulation factor III (TF)	0.42
uPA	1.44	Angiopietin-1 (ang-2)	0.40
Amphiregulin (AR)	1.42	VEGF-c	0.39
Plgf	1.28	PDGF-aa	0.38
EG-VEGF (PK1)	1.20	Persephim	0.31
Serpin b5 (maspin)	1.18	Leptin	-0.75
Activin a	1.10	Endothelin-1 (ET-1)	-0.76
FGF acidic (FGF-1)	1.04	IL-8 (cxcl8)	-1.26
MMP-8	0.98	FGF-4	-3.89
ADAMTS-1	0.79		

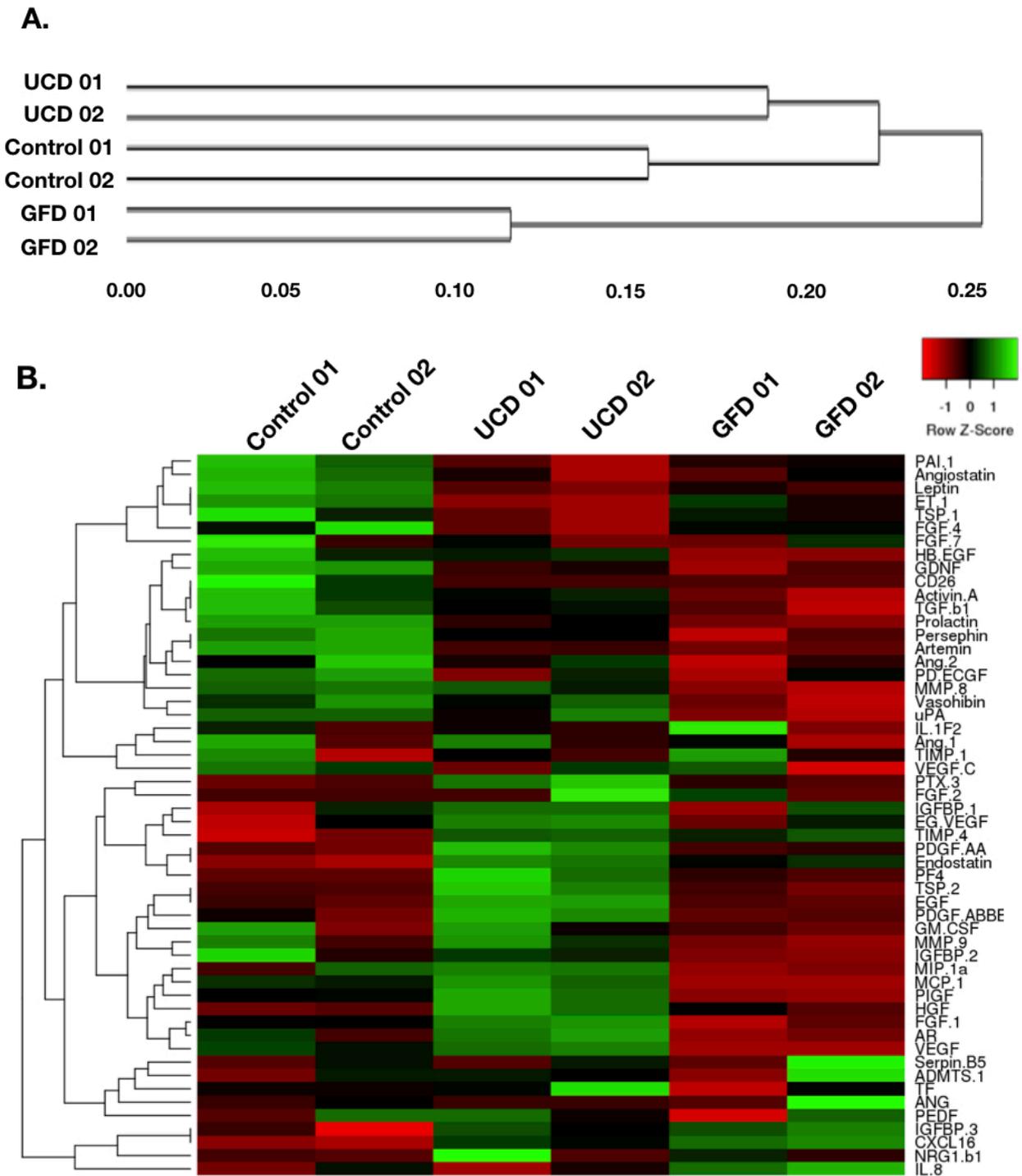
1.2. Análisis de los candidatos potenciales para el reconocimiento precoz de la enfermedad celiaca.

Dos herramientas fueron utilizadas para discriminar, aquellos marcadores constitutivos en los celíacos, es decir los que no se modifican en ninguna fase de la enfermedad, de los que se alteran a consecuencia de la fase activa de la celiaquía, así como de las relaciones que existen entre ambos grupos, mediante un mapa de expresión o “heat map” (apartado A) y por la elaboración de diagramas de Venn (apartado B).

A. Mapas de Expresión o “heat map”.

Para determinar que las diferencias encontradas entre los grupos no se deben a la casualidad se realizó un agrupamiento de los valores de expresión de proteínas obtenidos en el array. Tras dicho análisis, mostrado en la figura 3, panel A, se observó que los sets de muestras se agrupan de acuerdo al grupo experimental al que pertenecen. En otras palabras, no existen diferencias entre todos los grupos de las muestras que proceden de los niños que son celíacos en fase activa, los grupos de los niños celíacos en dieta sin gluten, o de los controles sanos. Sin embargo, aunque cada grupo experimental es igual entre si, encontramos que difería de los otros grupos experimentales (como muestra la figura 3 panel A). A su vez, los celíacos que no comen gluten, se encuentran más próximos a los celíacos no tratados pero más distantes de los controles, como muestra la figura 3 panel A. Además, el mapa de expresiones o “heat map” en la figura 3 panel B, reveló la existencia de un considerable grupo de proteínas que aparecen inalteradas en los celíacos independientemente de la fase de la enfermedad, es decir de si comen o no gluten cuando se comparan con los controles. Mientras que en el mismo análisis, se observaron otras proteínas cuya expresión es diferente en la fase activa de la celiaquía, pero que se hacen similares a los controles durante la dieta sin gluten (figura 3, panel B).

Figura 3. “Heat map” o mapa de expresiones de 54 proteínas angiogénicas incluidas en el estudio. El panel **A** representa el cluster de los datos, es decir, la relación existente entre los diferentes pules de muestras de cada grupo experimental. Se observa que los controles sanos y los celíacos que no comen gluten (GFD) son más próximos en términos de marcadores que los celíacos que comen gluten (UCD). En el panel **B**, se observa el mapa de expresión de las proteínas angiogénicas estudiadas donde la gradación de color, representa valores de proteínas circulantes en suero disminuidas (rojo) o aumentadas (verde).

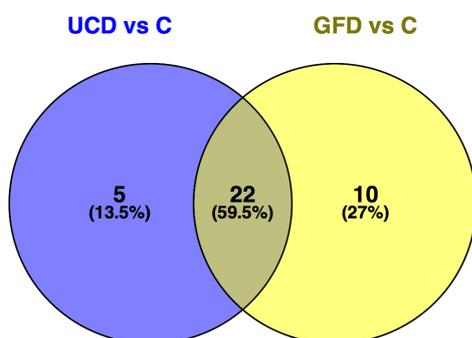


B. Diagramas de Venn.

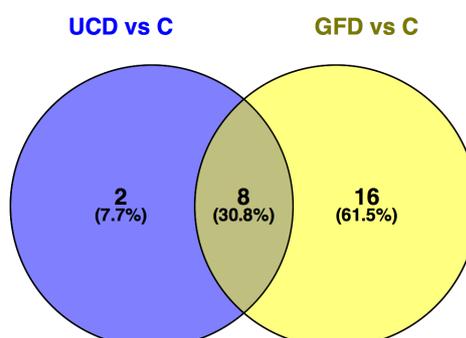
Todas las proteínas encontradas en el array de angiogénesis que diferían significativamente de los controles, fueron representadas en un diagrama de Venn, para determinar aquellas que son comunes entre los grupos de celíacos durante la fase activa de la enfermedad y en la dieta sin gluten, pero diferentes de los controles. La figura 4 panel A muestra un total de 22 proteínas cuyos niveles de expresión diferían en todos los celíacos respecto de los controles. Un análisis más exhaustivo reveló, que los valores de expresión de un total de 13 proteínas eran similares entre los grupos de celíacos independientemente de la fase de la enfermedad (figura 4 panel A). De éstas, un total de 8 proteínas que son, "Endothelin", "Leptin", FGF-4, VEGF-C, "Activin A", GDNF, PD-ECGF y "Artemin" se encontraron disminuidas en los celíacos respecto de los controles (figura 4, paneles B y D). Mientras que otras 5 proteínas, TIM-4, NRG1- β 1, "Pentraxin-3", EG-VEGF, y ADAMTS-1 (figura 4, paneles C y D) aparecieron aumentadas.

Figura 4. Diagramas de Venn. Aquellas proteínas detectadas en el array y cuyos valores de expresión en celíacos que comían gluten (UCD), o en aquellos mismos cuando no lo comían (GFD), diferían 0.5 veces al valor de los controles sanos, fueron representadas en un diagrama de Venn. Este diagrama, representa las proteínas comunes entre los grupos y por tanto facilitó la determinación de aquellas similares entre los celíacos no importa la fase de la enfermedad, pero que son diferentes a los controles. Este grupo de proteínas en común es muy interesante, ya que pueden ser consideradas como marcadores de la enfermedad celiaca independiente de la ingestión de gluten. El panel **A** representa todas las proteínas comunes entre los celíacos pero diferentes a los controles, mientras que los paneles **B** y **C** representan las que están disminuidas o aumentadas respectivamente. El Panel **D**, es una enumeración de las proteínas encontradas en común entre los celíacos por este tipo de análisis.

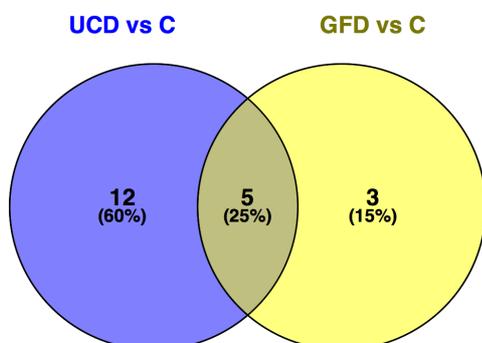
A. Todas las Proteínas



B. Proteínas Disminuidas



C. Proteínas Aumentadas



D. Proteínas Comunes

Aumentadas	Disminuídas
TIMP-4	Endothelin-1 (ET-1)
NRG1-β1	Leptin
Pentraxin 3	FGF-4
EG-VEGF	VEGF-C
ADAMTS-1	Activin a
	GDNF
	PD-ECGF
	Artemin

1.3. Estudio de los marcadores angiogénicos en cultivos celulares privados de las acciones del sistema inmunitario.

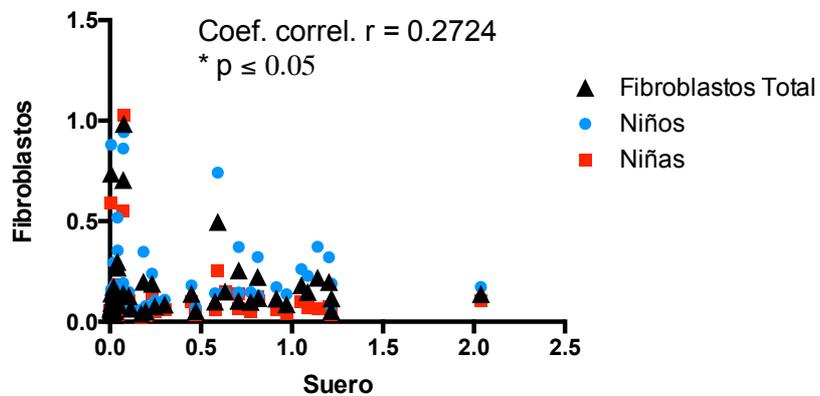
Para determinar que las diferencias angiogénicas observadas en nuestro estudio se deben a un genotipo/fenotipo intrínseco en los celíacos y no son consecuencia de otros factores secundarios que el sistema inmune pueda ejercer sobre la biología vascular, realizamos un estudio de los marcadores en fibroblastos que derivan de biopsias digestivas de celíacos. La tabla 7, muestra los valores de expresión de las 13 proteínas candidatas como marcadores en nuestro estudio, cuando se detectan en fibroblastos de biopsias intestinales, y se comparan con los niveles de las mismas proteínas en el suero de los niños controles. Como resultado, se observó un perfil similar para las proteínas "Pentraxin-3", NRG1- β 1, EG-VEGF, ADAMTS-1 y TIMP-4, del que obtuvimos en el suero de los celíacos independientemente de la fase de la enfermedad cuando se comparaban con los controles. Eso significa que cuando una de estas proteínas se encontraba aumentada en el suero de los celíacos, también se encontraba aumentada en los fibroblastos. Sin embargo, la expresión de dichas proteínas angiogénicas en fibroblastos mostró valores ligeramente mayores que en el suero (tabla 7). Por otro lado, la expresión de las 13 proteínas angiogénicas varía según el sexo, especialmente para la proteína FGF-4 que aparece aumentada exclusivamente en los fibroblastos que derivan del sexo masculino (tabla 7). Mientras que la "Artemin", "Leptin" y "Endothelin-1" sólo aparecen disminuidas en los fibroblastos que derivan de biopsias del sexo femenino, como muestra la tabla 7. Para determinar si el tejido intestinal podría ser el mayor contribuyente de los niveles en sangre de los marcadores encontrados en los celíacos, establecimos una correlación entre todos los valores de expresión encontramos en los fibroblastos y sus mismos valores en la sangre, como muestra la figura 5. Cuando se correlacionaron los valores de expresión de las 54 proteínas para angiogénesis en fibroblastos en comparación con el suero de los celíacos, se observó una correlación significativa y positiva con un valor bajo de r ($r=0.2724$), como muestra la figura 5 panel A. Mientras que al considerar sólo los niveles de expresión de las 13 proteínas encontradas como candidatas tras la proteómica, los valores del coeficiente de correlación encontrados fueron elevados y positivos además de ser tremendamente significativos ($r=0.7143$, figura 5 panel B).

Tabla 7. Valores de expresión de proteínas relacionadas con la angiogénesis obtenidos a partir de muestras de cultivos de fibroblastos, procedentes de biopsias intestinales de celíacos, tras sucesivos pases en cultivo. Los valores de expresión de las proteínas angiogénicas se obtuvieron usando el “Proteome profile Array”. Para el análisis solo se seleccionaron aquellas proteínas que no se alteran en el suero de los celíacos independientemente de la fase de la enfermedad cuando se comparan con los controles. Los valores de expresión mostrados en la tabla, son el resultado de comparar la expresión de las proteínas en los fibroblastos con los valores de las mismas proteínas presentes en el suero de los controles. Los resultados se expresan como el logaritmo en base 2 de la diferencia. Valores positivos muestran una mayor expresión de proteínas en el grupo de los celíacos en comparación con los controles, mientras que valores negativos reflejan una expresión menor. **ns**- no existen diferencias.

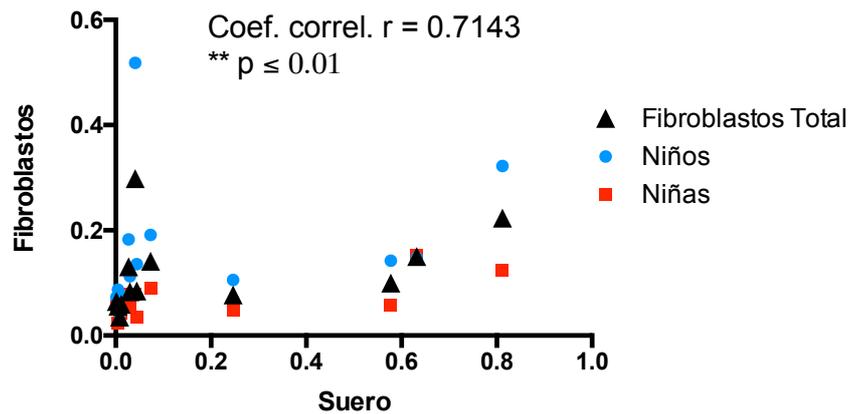
Nombre	Celíacos Sueros vs Control Sueros	Fibroblastos Niñas vs Control Suero	Fibroblastos Niños vs Control Suero
Pentraxin 3	> 0.5	3.95	3.85
NRG1-β1	> 0.5	3.74	5.58
EG-VEGF	> 0.5	2.82	4.18
ADAMTS-1	> 0.3	2.55	3.66
TIMP-4	> 0.5	1.87	2.97
FGF-4	< -0.5	ns	3.12
VEGF-C	< -0.3	ns	ns
PD-ECGF	< -0.5	ns	ns
Activin A	< -0.5	ns	ns
Artemin	< -0.5	-0.65	ns
Leptin	< -0.5	-1.19	ns
Endothelin-1	< -0.3	-1.75	ns
GDNF	< -0.5	ns	ns

Figura 5. Correlación entre los valores en células y suero de niños celíacos. Las proteínas relacionadas con la angiogénesis detectadas en cultivos de fibroblastos fueron comparadas con los valores de las mismas proteínas cuando se encuentran en la circulación de niños celíacos. Como resultado se obtuvo un coeficiente de correlación positivo además de valores de p menores de 0.05, lo que confirma la existencia de dicha correlación. El significado funcional de este resultado muestra que cuando un marcador aumenta su expresión en las células, este se ve aumentado también en el suero de los niños celíacos. El panel **A** representa la correlación existente cuando se incluyen las 54 proteínas incluidas en el array, mientras que el panel **B** representa la comparación cuando se incluyen exclusivamente aquellas proteínas seleccionadas como potenciales marcadores tras nuestro análisis.

A. Todas las proteínas



B. Potenciales candidatos



2. Estudio de las proteínas candidatas encontradas en el suero de celíacos: fases clínicas 2-3.

Una vez determinada la existencia de un perfil distintivo en celíacos a nivel de expresión de proteínas relacionadas con los vasos sanguíneos, cabe preguntarse si los niveles de estos marcadores se mantienen constantes en una población de pacientes mayor. Por otro lado, aunque improbable, conviene corroborar que dicho perfil no se corresponde exclusivamente al HLA DQ2 o DQ8, sino que es exclusivo de los celíacos, mediante la incorporación de un grupo control con similar carga genética pero sin celiaquía. Es necesario, por tanto, demostrar que estas proteínas pueden constituirse como marcadores para la determinación de la enfermedad celiaca, en un estudio clínico donde se contemple el uso de un mayor número de muestras de pacientes, y donde los marcadores se midan mediante técnicas estándar (ELISA).

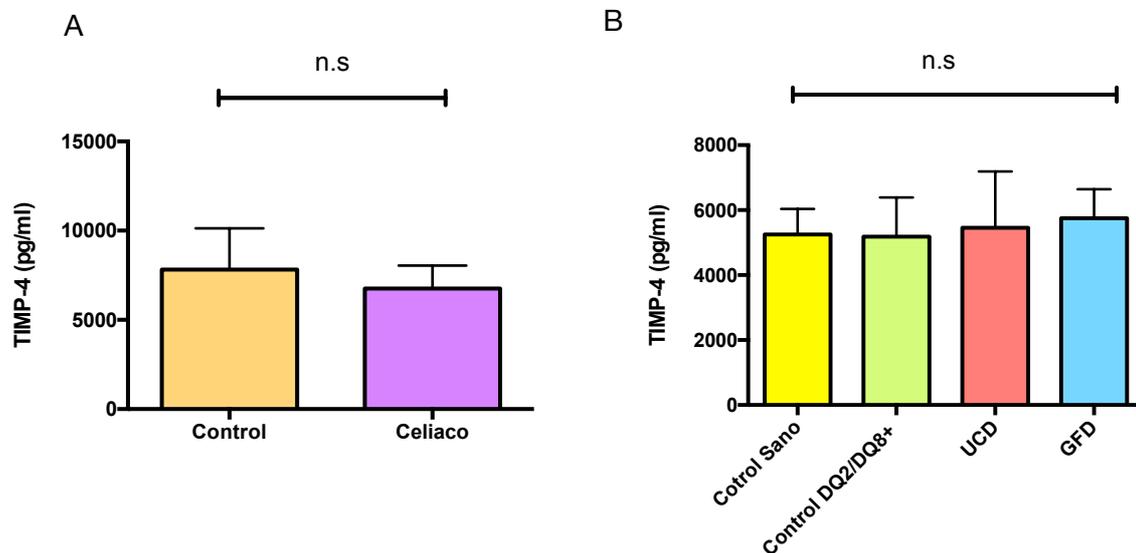
2.1 Validación de las proteínas que aparecen en celíacos independiente de la fase de la enfermedad: su adecuación como marcadores de pronóstico.

Las proteínas incluidas en esta fase del estudio, fueron TIMP-4, NRG1- β 1, "Pentraxin-3" y ADAMTS-1. Para realizar la validación de las 4 proteínas así seleccionadas, se usaron sueros de niños en la fase activada enfermedad o el suero del mismo niño tras su remisión, que se compraron con controles sanos o enfermos con diferente o similar perfil HLA compatible con la celiaquía.

A. Validación de TIMP-4.

La figura 6, panel A, muestra la concentración de TIMP-4 en el suero de niños celíacos independiente de la fase de la enfermedad, cuando se comparan con el suero de los controles sanos que tienen un HLA diferentes o similar al de los celíacos. Como muestra la figura, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Para descartar, la hipótesis de que las diferencias pudieran estribar en las diferentes etapas de la enfermedad, realizamos el análisis considerando cada grupo independientemente por separado, como muestra la figura 6 panel B. Como resultado del análisis estadístico, no se obtuvieron tampoco diferencias entre los grupos analizados.

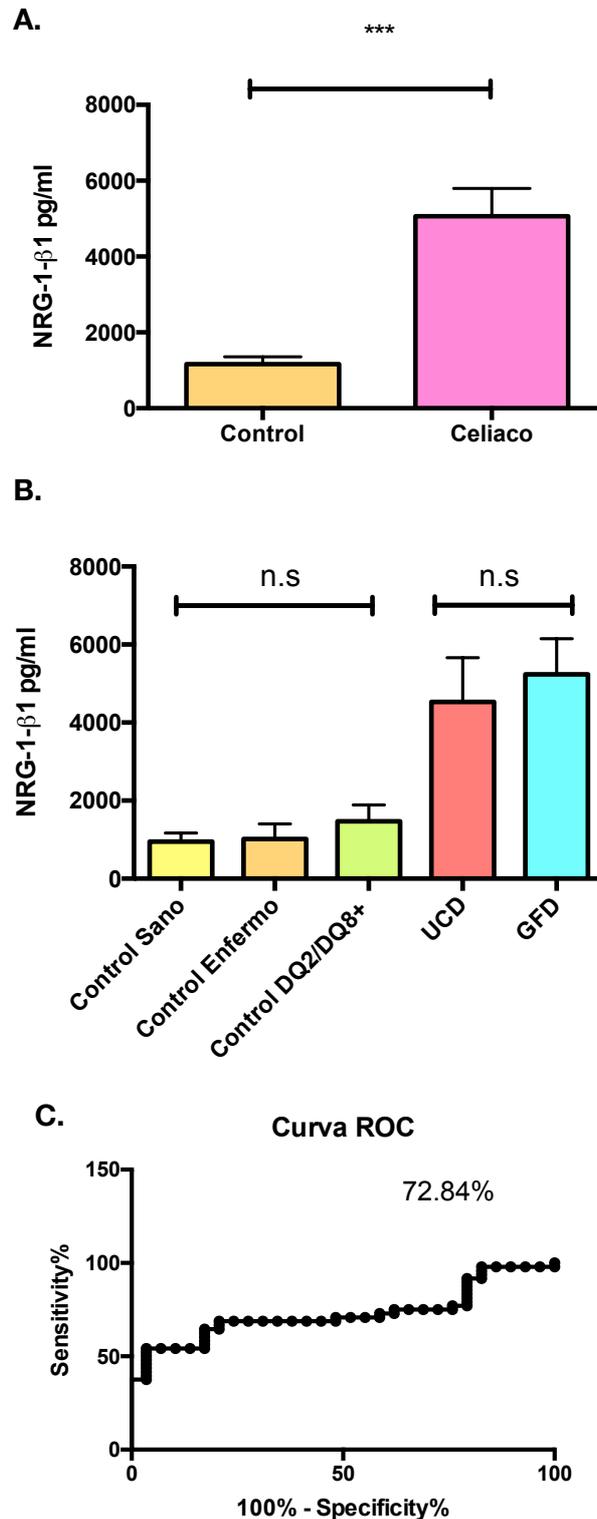
Figura 6. Concentración de TIMP-4 en pg/ml. Los niveles de la proteína fueron analizados en un total de 54 muestras mediante un ELISA específico. El panel **A** muestra los valores de TIMP-4 cuando se comparan todos los controles con todos los celíacos independientemente de la fase de la enfermedad. **B** representa los niveles de la proteína cuando se estudian los grupos por separado. Las barras representan los valores de TIMP-4 \pm el valor del error medio estándar. *UCD- celíaco no tratado, GFD- celíaco en dieta sin gluten, n.s- no existen diferencias significativas con $p > 0.05$.*



B. Validación de NRG1- β 1.

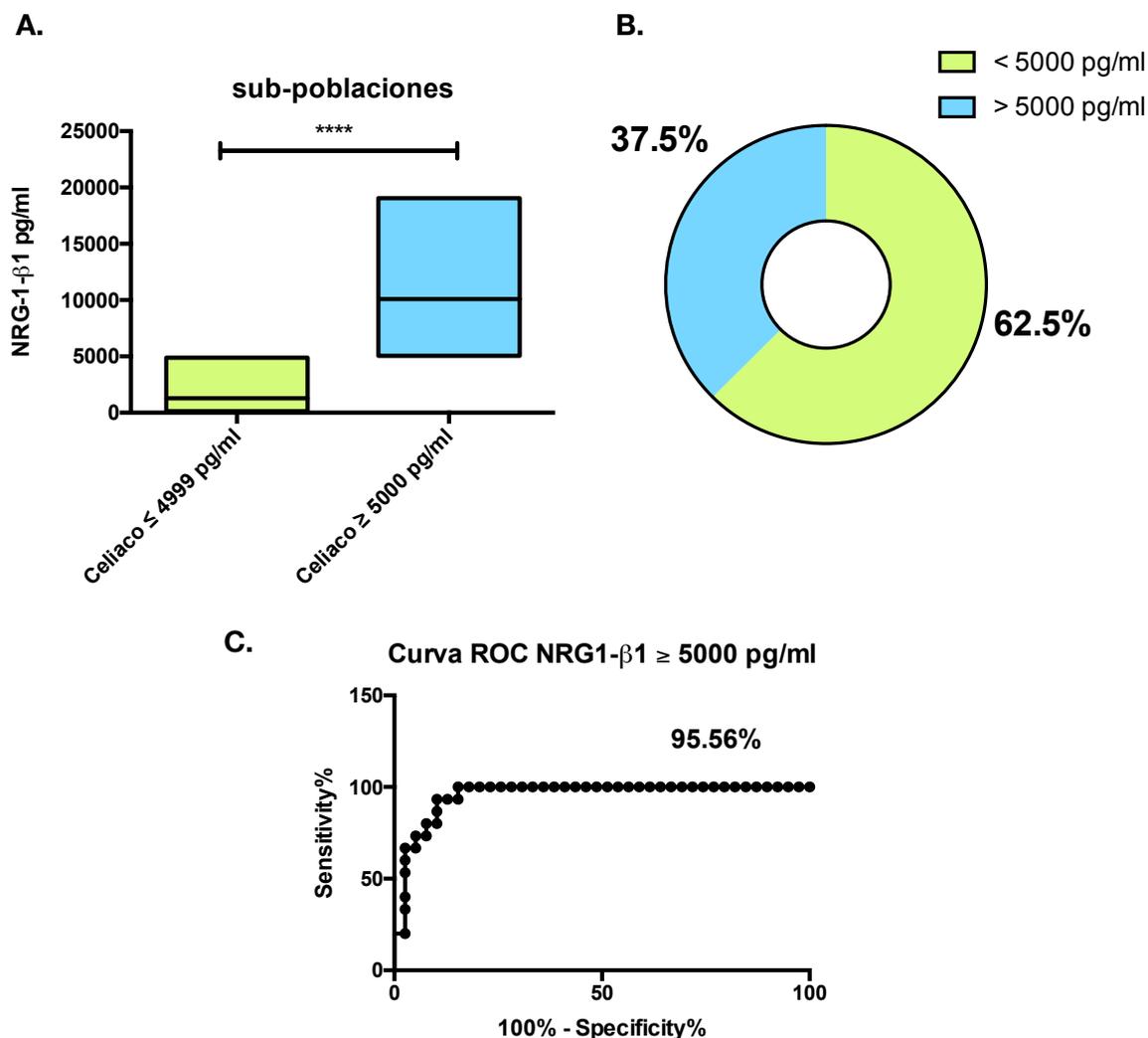
Cuando se comparó la concentración para NRG1- β 1 en el suero de todos los celíacos independiente de la fase de la enfermedad frente a todos los controles sanos positivos o negativos para HLA DQ2/DQ8, o con los controles enfermos, encontramos diferencias tremendamente significativas con valores de “p” ≤ 0.001 , como se representa en la figura 7 panel A. Para descartar la posibilidad de que las diferencias encontradas para NRG1- β 1 fueran consecuencia de algún grupo experimental de manera individual, la concentración del marcador fue analizada en cada grupo por separado (figura 7 panel B). Así, tras el análisis, no encontramos diferencias significativas cuando se compararon los celíacos entre si, o los controles también entre si. Por otro lado, un estudio de la sensibilidad y especificidad para NRG1- β 1 fue realizado, donde comparamos el grupo de los celíacos independientemente de la fase de la enfermedad, frente a todos los controles (figura 7, panel C). El área bajo la curva ROC fue del 72.84%. Sin embargo, al explorar la homogeneidad en la distribución de los diferentes valores de concertación para NRG1- β 1, encontramos en los celíacos la existencia de dos subgrupos de concentraciones para el marcador que eran estadísticamente diferentes (figura 8, panel A). Por un lado, el 62.5% de los niños

Figura 7. Concentración de NRG1-β1 en pg/ml. Los niveles de la proteína fueron analizados en un total de 106 muestras mediante un ELISA específico. El panel **A** muestra los valores de NRG1-β1 cuando se comparan todos los controles con todos los celíacos independientemente de la fase de la enfermedad. **B** representa los niveles de la proteína cuando se estudian los grupos por separado. *UCD- celiaco no tratado, GFD- celiaco en dieta sin gluten.* Las barras representan los valores de NRG1-β1 ± el valor del error medio estándar. *** valores significativos de $p \leq 0.001$. n.s- diferencia no significativa con $p > 0.05$. **C** curva ROC donde se representa la especificidad y sensibilidad del marcador cuando se comparan los celíacos independientemente de la fase de la enfermedad con todos los controles. El área bajo la curva es del 72.84%



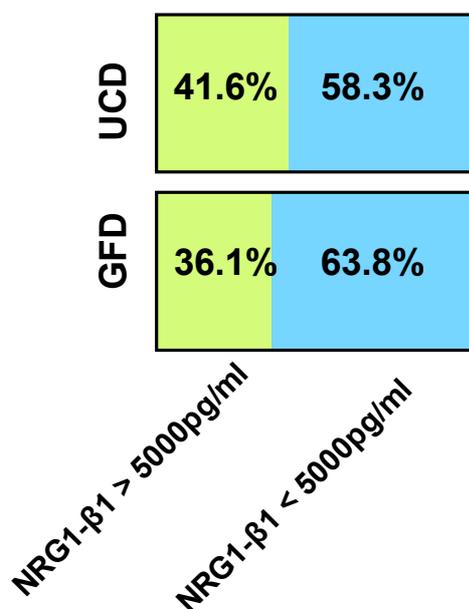
celiacos incluidos en nuestro estudio, presentaban valores de NRG1-β1 por debajo de 5000 pg/ml, mientras que un 37.5% tenían concentraciones circulantes del marcador, mayores de 5000 pg/ml (figura 8, panel B). Cuando representamos la especificidad y sensibilidad para los valores mayores de 5000 pg/ml en el suero de los celíacos independientemente de la fase de la enfermedad, frente a los controles, se observó un área bajo la curva del 95.56% (figura 8, panel C). Así, 5000 pg/ml (según el índice de Youden, 5350 pg/ml) constituirían un valor umbral por encima del cual, la

Figura 8. Análisis de las subpoblaciones de pacientes celíacos para NRG1-β1. Del análisis de los valores de NRG1-β1 para celíacos se observó la presencia de dos subpoblaciones, donde algunos pacientes presentan valores mayores de 5000 pg/ml. El panel **A** muestra los dos subconjuntos de concentraciones para NRG1-β1. Las cajas representan la dispersión de los valores de NRG1-β1 donde se representa el valor medio mediante una línea que atraviesa la caja. **** valores significativos de $p \leq 0.0001$. **B**, porcentaje de niños celíacos que tienen valores de NRG1-β1 circulando en sangre, por debajo y por encima de 5000 pg/ml. **C** muestra la curva ROC donde se representan la especificidad y sensibilidad del marcador cuando se comparan los valores de concentración de NRG1-β1 por encima de 5000 pg/ml en celíacos independientemente de la fase de la enfermedad frente a todos los controles. El área bajo la curva es del 95.56%



concentración de la proteína serviría como marcador en la determinación de la celiacía para este subgrupo de pacientes. Para descartar la posibilidad que la fase de la enfermedad se encuentre detrás de estas diferencias, comparamos el porcentaje de aquellos niños que tienen valores por encima o por debajo del valor umbral durante las fases de la celiacía. Como muestra la figura 9, los porcentajes del marcador cuando la NRG1-β1 sobrepasa el valor umbral de 5000 pg/ml son similares. Por un lado, los celíacos no tratados suponen el 41.6%, mientras que en los que siguen una dieta sin gluten el marcador aparece en esta concentración en un 36.1%.

Figura 9. Distribución de los pacientes para NRG1-β1. En la figura se muestran los porcentajes de los pacientes que tienen valores de NRG1-β1 por debajo o por encima de 5000 pg/ml, de acuerdo a la fase de la enfermedad. Para calcular dichos porcentajes el número total de celíacos no tratados o en dieta sin gluten se tomó independiente y sobre estos valores totales se calculó el porcentaje de aquellos niños que tienen el marcador por encima o por debajo del valor umbral de 5000 pg/ml. UCD- celíaco no tratado, GFD-celíaco en dieta sin gluten.



Para descartar que estos resultados se deban a la función inmunológica en los celíacos, establecimos una comparación donde enfrentamos los valores de concentración de NRG1-β1 en celíacos en relación con el título de anticuerpos circulantes. En este contexto, encontramos que los valores de NRG1-β1 elevados aparecen en paralelo a una menor severidad de la fase activa de la celiacía ($r=-0.2292$; 95% CI = -0.5875 a 0.2042), aunque esta correlación no alcanzó la significación estadística en el rango del 95% de confianza. Finalmente, cuando se

correlacionan los niveles de NRG1- β 1 con la edad, observamos la presencia de una relación significativa y negativa ($r=-0.4151$, 95% CI= -0.6544 a -0.1002 ; $**p= 0.0096$), es decir, los niños más pequeños, presentan valores de concentración de NRG1- β 1 mayores y viceversa. Por otro lado, el sexo no parece ser un factor que influya en la aparición de las subpoblaciones de NRG1- β 1 en celíacos, puesto que no encontramos ninguna correlación en nuestro análisis.

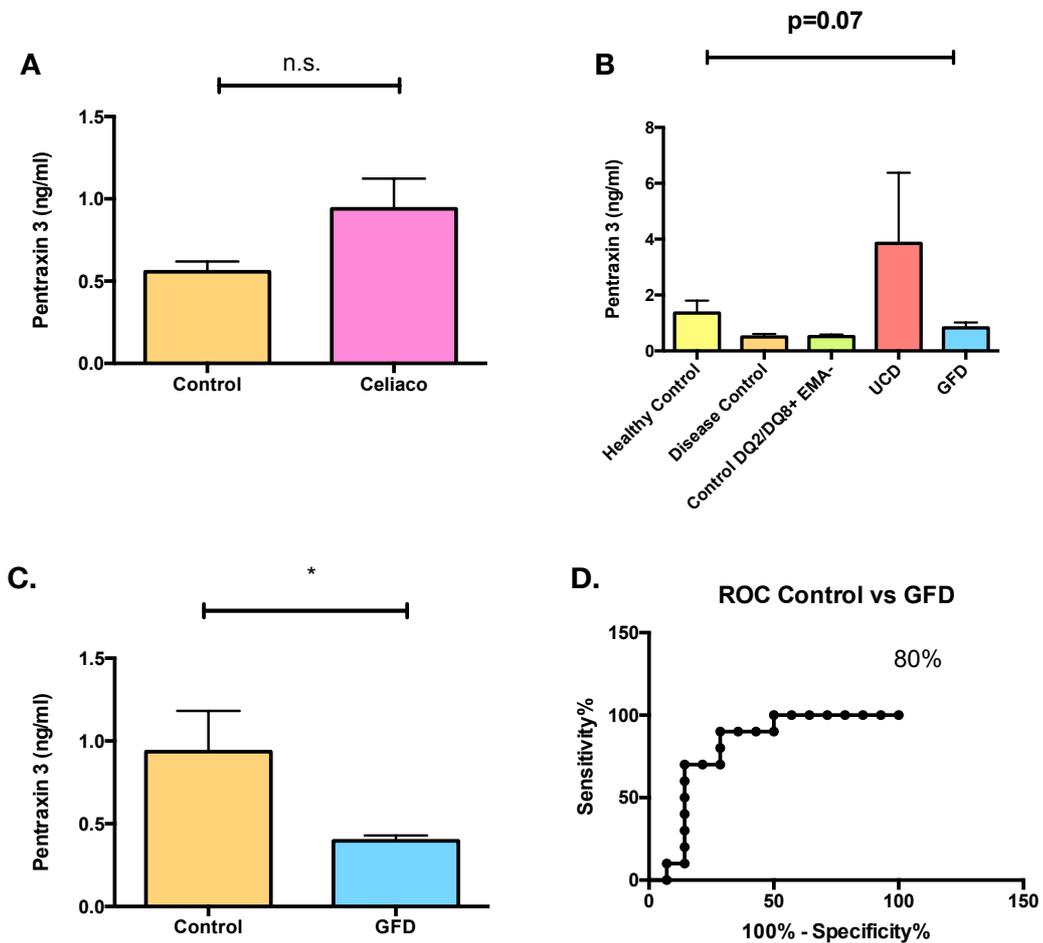
C. Validación de “Pentraxin-3”.

La validación de la proteína “Pentraxin-3” se determinó mediante un test ELISA usando muestras de suero de niños celíacos y controles. La figura 10 panel A, muestra la concentración del marcador en el suero de niños, cuando se comparan todos los celíacos frente a todos los controles. El grupo control estaba constituido por niños sanos con similar o diferente HLA DQ2/DQ8, así como un grupo de niños enfermos de otras patologías digestivas diferentes de la celiaquía. Mientras que, el grupo de los celíacos estaba representado por niños en ambas fases de la enfermedad. Tras la realización de las comparaciones, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (figura 10, panel A). Sin embargo, para descartar la posibilidad de que las diferencias radiquen en alguno de los grupos experimentales introducidos de manera individual, comparamos cada grupo por separado (figura 10 panel B). De nuevo, no se encontraron diferencias significativas, aunque los valores de probabilidad eran próximos a 0.05. Además, el grupo de los niños celíacos durante la fase activa de la enfermedad, mostró un incremento en la concentración del marcador respecto de los otros grupos, aunque el valor de “p” resultó ser marginal ($p = 0.07$, figura 10, panel B). Como resultado de este análisis exploratorio, también observamos que el grupo de los celíacos que no come gluten, tenía concentraciones circulantes de “Pentraxin-3” menores, al ser comparado con todos los controles, de los que por cierto, difería significativamente (figura 10, panel C).

Finalmente para determinar si los valores de “Pentraxin-3” encontrados en celíacos tratados eran buenos marcadores de pronóstico, realizamos un estudio de la relación entre la especificidad y sensibilidad del marcador cuando se comparan los celíacos que no comen gluten frente a todos los controles. El área bajo la curva, resultado del análisis ROC, mostró valores del 80% (figura10, panel D). Recordemos que áreas del 80% convierten a la “Pentraxin-3” en un marcador relativamente bueno

para el pronóstico de la celiacía. Por último, calculamos el valor de corte para el grupo de celiacos que no come gluten, cuando se compara con todos los controles, mediante el índice de Youden. Así, dicho valor de corte para “Pentraxin-3” resulto en 0.48 ng/ml, y por tanto, valores del marcador por debajo de esta concentración son indicativos de celiacía.

Figura 10. Niveles de “Pentraxin-3” en ng/ml. **A**, Concentración de “Pentraxin-3” cuando se comparan los valores de todos los controles con los de todos los celiacos. **B**, Representación de los niveles de “Pentraxin-3” en cada grupo tomado independiente. **C**, Comparación entre todos los controles con los celiacos en dieta sin gluten. Las barras representan el valor medio de concentración para “Pentraxin-3” ± el error medio estándar. * valores significativos de $p \leq 0.05$. UCD- celiaco no tratado, GFD-celiaco en dieta sin gluten. **D**, Especificidad y sensibilidad de la “Pentraxin-3” cuando se comparan los controles con los celiacos en dieta sin gluten. El área bajo la curva ROC es del 80%.

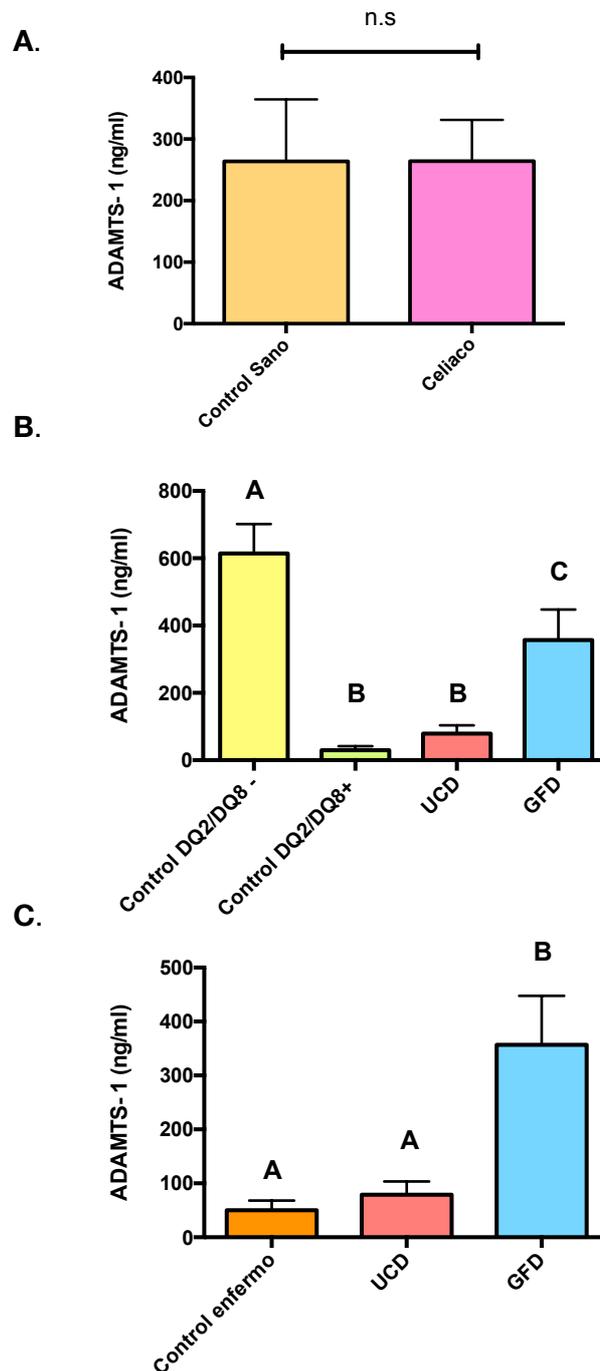


D. Validación de ADAMTS-1.

Como resultados del array de proteómica, ADAMTS-1 se encontró aumentado en los celíacos ya sea en el suero o en fibroblastos intestinales, independientemente de la fase de la enfermedad como se mostró anteriormente. Para validar dicho marcador, la concentración de la proteína fue medida en pacientes y controles, mediante ELISA a partir de muestras de sangre. El estudio, se realizó en niños celíacos en la fase activa de la enfermedad, o cuando seguían una dieta sin gluten frente a controles sanos con diferente o similar HLA y controles enfermos. Para entender el potencial de ADAMTS-1 como marcador de detección de celiaquía, establecimos una comparación entre todos los controles frente a todos los celíacos, donde no se observaron diferencias significativas entre los grupos (figura 11 panel A). Sin embargo, cuando estudiamos la concentración de la proteína considerando cada grupo por separado, observamos notables diferencias entre los grupos experimentales. La figura 11 panel B muestra dichos resultados, donde observamos que los grupos controles presentan diferencias significativas con los celíacos, especialmente con aquellos que se encuentran siguiendo una dieta sin gluten. Por otro lado es importante destacar las diferencias tan grandes encontradas en la concentración serológica de ADAMTS-1, entre los grupos controles según el tipo de HLA. En efecto, cuando el HLA de los controles difiere del de los celíacos (es decir diferente al DQ2/DQ8), los niveles de ADAMTS-1 están por encima del valor de la proteína para celíacos (figura 11, panel B). Mientras que cuando se analiza la concentración de ADAMTS-1 en controles sanos para un HLA compatible con celiaquía, observamos que los niveles del marcador en dicho grupo, están muy por debajo de lo observado en los celíacos, especialmente en aquellos donde el gluten no está presente en la dieta (figura 11, B). Por último, los niños celíacos que se encuentran en fase activa de la enfermedad, presentan valores de ADAMTS-1 por encima de los controles con HLA compatible con celiaquía (aunque no alcanzaron la significación estadística), mientras que estos mismos celíacos de fase activa, presentan valores de ADAMTS-1 por debajo de aquellos que siguen una dieta sin gluten (figura 11, panel B). Para descartar la posibilidad de que otras patologías digestivas cursen con variaciones de la expresión de ADAMTS-1, similares a las encontradas en los celíacos especialmente durante la dieta sin gluten, establecimos una comparación entre un grupo de controles enfermos de otros trastornos digestivos, con los celíacos en ambas fases de la enfermedad, como muestra la figura 11 panel C. En los niños que presentan

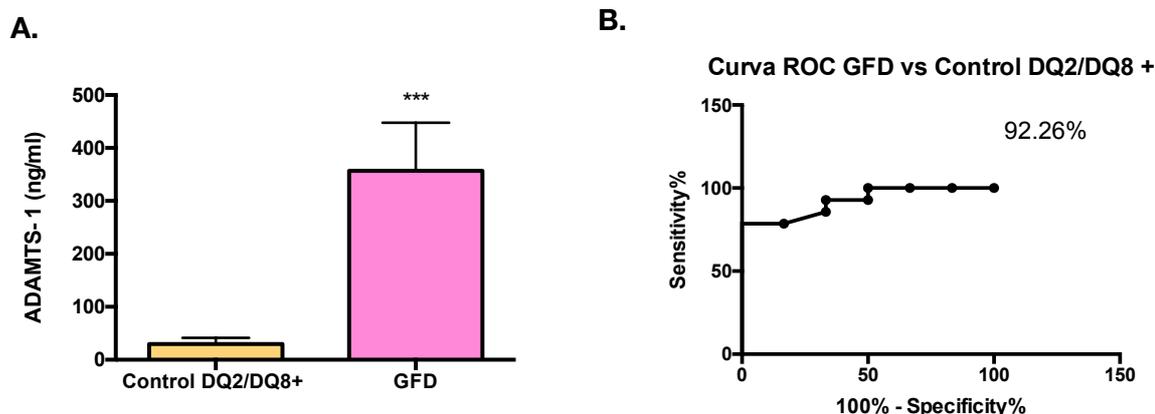
trastornos digestivos que no son celiaquía se observan valores de ADAMTS-1 por debajo de los que tienen los celíacos en fase activa (aunque no hay diferencias significativas) y mucho más marcadamente con los celíacos en dieta sin gluten, como muestra la figura 11, panel C.

Figura 11. Niveles de ADAMTS-1 en ng/ml. **A**, Concentración de la proteína cuando comparan los valores de todos los controles con los de todos los celíacos. **B**, Representación de los niveles de ADAMTS-1 en cada grupo tomado independiente. **C**, Comparación entre otros controles enfermos con los celíacos en las diferentes fases de la enfermedad. Las barras representan el valor medio de concentración para ADAMTS-1 \pm el error medio estándar. Las diferentes letras representan valores significativos de $p \leq 0.001$, mientras que n.s significa que no existen diferencias estadísticas. UCD- celíaco no tratado, GFD-celíaco en dieta sin gluten.



Para determinar si la concentración de ADAMTS-1 encontrada en los celíacos, especialmente en una dieta sin gluten, puede ser un buen marcador para la detección precoz de la celiaquía, realizamos un análisis de la especificidad y sensibilidad del marcador mediante curva ROC. Cuando comparamos todos los controles sanos con los celíacos que no comen gluten, obtuvimos valores de área bajo la curva del 83.33%. Estos valores convierten a ADAMTS-1, en un marcador relativamente bueno para la identificación de la celiaquía aun cuando no existe gluten en la dieta. Sin embargo, al comparar sólo aquellos valores de ADAMTS-1 en los controles genéticamente compatibles con celiaquía, con los celíacos en una dieta sin gluten, el área bajo la curva se incrementa al 92.26% (figura 12, paneles A y B).

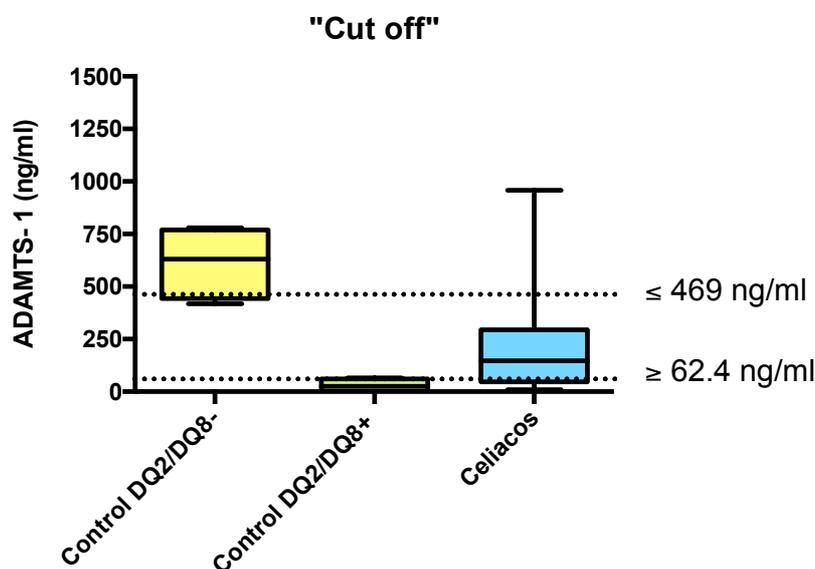
Figura 12. Especificidad y Sensibilidad de ADAMTS-1. **A**, Concentración de la proteína cuando se comparan los valores de los controles con HLA similar a los celíacos con los celíacos que no comen gluten. Las barras representan el valor medio de concentración para ADAMTS-1 \pm el error medio estándar. *** representan valores significativos de $p \leq 0.001$. GFD-celiaco en dieta sin gluten. **B**, Representación de la sensibilidad y especificidad para ADAMTS-1 mediante una curva ROC, cuando se comparan los celíacos que no comen gluten con los controles compatibles genéticamente con la enfermedad celiaca. El área bajo la curva es del 92.26%



Finalmente, teniendo en cuenta todos estos resultados, calculamos el índice de Youden que es el valor del intervalo de concentración para ADAMTS-1, donde los celíacos podrían ser diagnosticados incluso cuando el gluten no está incorporado en la dieta. Así, para niveles de ADAMTS-1 mayores de 62.4 ng/ml los celíacos pueden ser identificados en más del 92% en relación con los que no lo son, cuando comparten el HLA DQ2 y DQ8, como muestra la figura 13. El valor predictivo positivo para el marcador cuando se comparan los celíacos que no comen gluten con los controles sanos positivos para HLA DQ2/DQ8, se determinó en un 93%. Por otro lado, cuando la concentración en suero para ADAMTS-1 es mayor de 469 ng/ml, los celíacos pueden identificarse con más del 83% frente a población que no es genéticamente compatible

con la celiaquía, sin necesidad de evaluar el perfil del HLA, como muestra la figura 13. En este caso el valor predictivo positivo cae hasta el 76%.

Figura 13. Rango de valores en ng/ml donde ADAMTS-1 sería positivo en celíacos. Representación del rango de valores donde un paciente celíaco sería diagnosticado, descartando los falsos positivos o negativos. Las cajas representan la dispersión de los datos en cada grupo y la línea central el valor de la media. Las líneas de puntos muestran los valores del cut off obtenidos a partir del índice de Youden. El valor máximo en el intervalo es de 469 ng/ml si se compara ADAMTS-1 con la población sana negativa para HLA de celiaquía. El límite de detección mínimo es de 62.4ng/ml si se comparan con los controles sanos positivos para HLA.



2.2 Validación de los marcadores en células endoteliales de cordones umbilicales.

Diferentes líneas de células endoteliales procedentes de cordones umbilicales de bebés en alto riesgo de padecer celiaquía fueron aisladas. Éstas, se compararon con células procedentes de controles en bajo riesgo de padecer la enfermedad y con células endoteliales comerciales (HUVECS). Así, todas las líneas celulares fueron cultivadas, y 54 proteínas relacionadas con la angiogénesis se analizaron mediante un array de proteómica a partir de extractos de proteínas extraídos de dicho material. La tabla 8 muestra las diferencias de expresión para los marcadores TIMP-4, NRG1-β1, "Pentraxin-3" y ADAMTS-1, cuando se comparan las células que proceden de bebés con alto riesgo de padecer celiaquía, frente a los controles. ADAMTS-1 fue el único marcador que mostró un incremento de expresión de más de 0.5 unidades arbitrarias,

donde además aparecieron diferencias significativas cuando se compararon las líneas celulares de bebés de riesgo, frente a los controles. TIMP-4 también mostró valores significativos para “p” aunque su expresión resultó ser marginal, es decir, sólo difiere 0.34 con respecto del control, como muestra la tabla 8. Por último, la expresión de NRG1-β1 y “Pentraxin-3” no resultó ser significativa al comparar todas las líneas celulares entre sí (tabla 8). Sin embargo, los niveles de expresión para “Pentraxin-3” resultaron estar muy por debajo en células de riesgo cuando se compararon con los controles, aunque como muestra la tabla 8, no encontramos diferencias significativas.

Tabla 8. Expresión de los potenciales marcadores en células endoteliales de cordón umbilical. Los niveles de expresión de los marcadores angiogénicos potenciales para la determinación de la celiaquía, fueron estudiados en células endoteliales que proceden de bebés con alto riesgo de padecer la enfermedad, frente a controles de bajo riesgo. Color verde: valores sobre expresados en bebés en riesgo frente a controles. Color amarillo: valores frontera en el límite de las diferencias de expresión. Color blanco: no hay diferencias de expresión entre los grupos. * valores significativos de $p \leq 0.05$; n.s- no existen diferencias significativas.

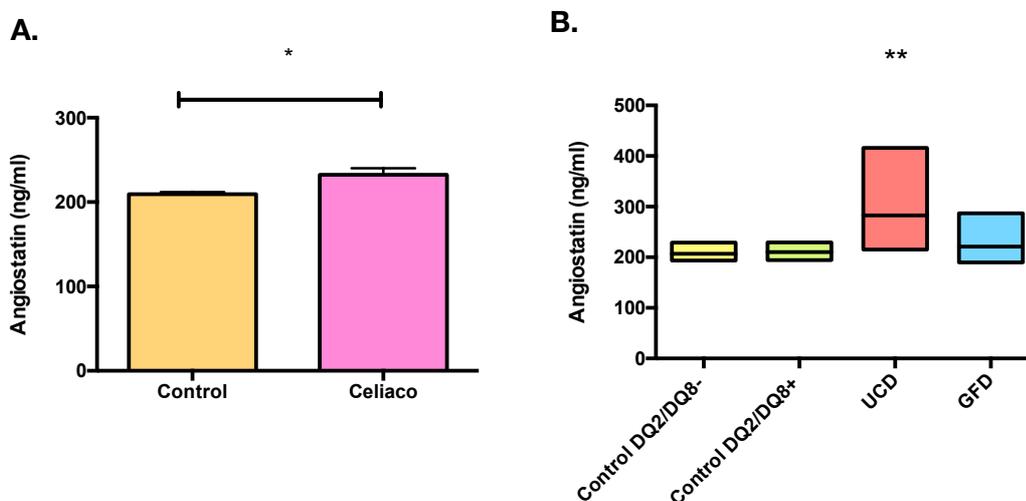
Nombre	Niños en Riesgo vs Control sin riesgo	p valor
ADAMTS-1	1.7711	*
TIMP-4	1.3401	*
NRG1-β1	1.2873	n.s
Pentraxin 3	0.0731	n.s

3. Estudio de “Angiostatin” como marcador de celiaquía.

La concentración de “Angiostatin” fue medida por ELISA en el suero de niños, donde los grupos experimentales se dividieron entre, celíacos en ambas fases de la enfermedad y controles sanos con HLA diferente o similar al de los celíacos. La figura 14 panel A, muestra la concentración de “Angiostatin” circulante en la sangre de todos los celíacos independientemente de la fase de la enfermedad, frente a todos los controles. Como resultado de este análisis, observamos diferencias significativas donde los valores de concentración para “Angiostatin” respecto de los controles, aparecieron aumentados. Cuando realizamos un análisis de las diferencias entre grupos experimentales (figura 14, panel B), observamos que tan solo el grupo de los celíacos durante la fase activa de la enfermedad, presenta diferencias significativas respecto de los controles, o de los celíacos en la dieta sin gluten, (que por cierto es similar estadísticamente a los controles). Esto refleja que “Angiostatin” es una proteína

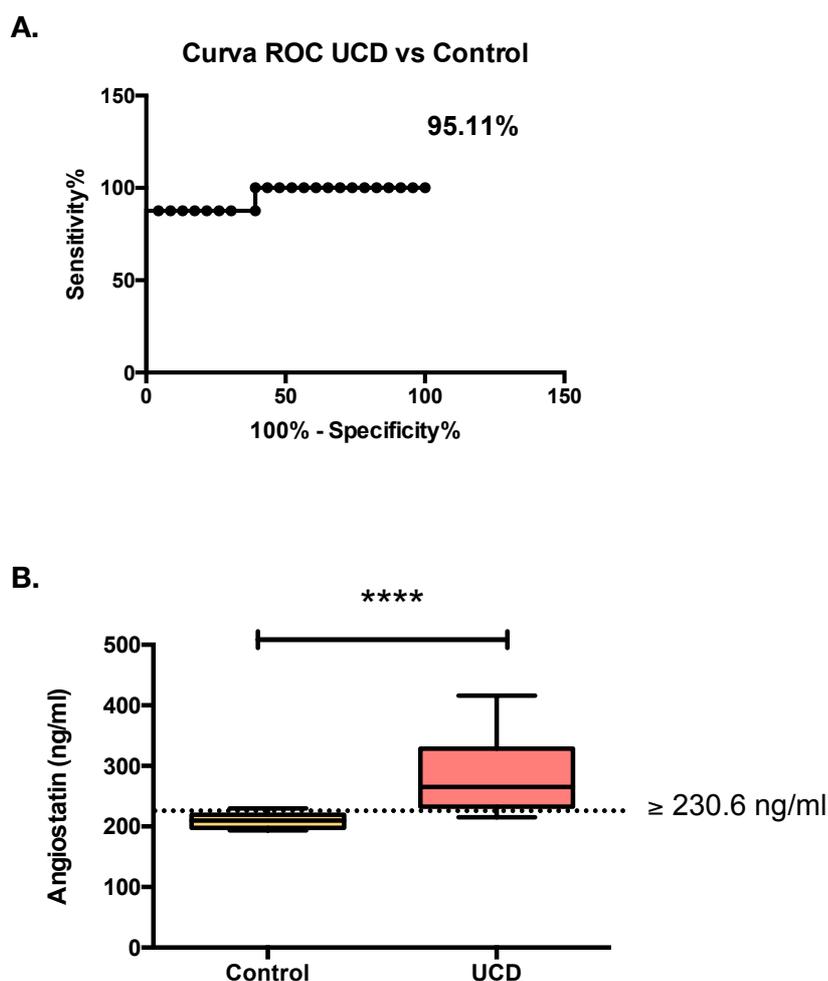
modulada en respuesta al gluten durante la fase activa de la enfermedad y por tanto cabe preguntarse si esta proteína podría ser un buen marcador para la identificación de la celiacía.

Figura 14. Valores de “Angiostatin” en ng/ml. **A**, Concentración de la proteína cuando se comparan los valores de todos los controles con los celiacos. **B**, Representación de los niveles de “Angiostatin” en cada grupo experimental, tomado independiente. Las cajas representan todos los valores de concentración para “Angiostatin”. La línea central es el valor de la media. * representan valores significativos de $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$. UCD- celiaco no tratado, GFD-celiaco en dieta sin gluten.



Cuando analizamos la especificidad y sensibilidad de “Angiostatin” en celiacos durante la fase activa frente a todos los controles, observamos una área bajo la curva ROC del 95.11%, como muestra la figura 15, panel A. Sin embargo, su especificidad y sensibilidad cuando se consideran todos los celiacos independientemente de la fase de la enfermedad, cayó hasta el 84.21% (resultado no mostrado). A su vez, del análisis de curva ROC se desprende, que el valor a partir del cual los niveles de “Angiostatin” son representativos de los celiacos en fase aguda es de 230.6 ng/ml, (figura 15, panel B). Cuando esto mismo se calculó entre ambas fases de la enfermedad, obtuvimos un valor umbral de 253 ng/ml. En otras palabras, a la luz de nuestros resultados, cuando un niño que come gluten independientemente de su HLA, tiene los niveles de “Angiostatin” por encima de 230.6 ng/ml, estaríamos ante un caso de celiacía de fase aguda. Si este mismo niño, abandona el gluten, los niveles de la “Angiostatin” se encontrarían por debajo de 253 ng/ml lo que sería indicativo de la remisión para un celiaco.

Figura 15. Especificidad y Sensibilidad para “Angiostatin”. **A**, Representación de la sensibilidad y especificidad para “Angiostatin” mediante una curva ROC, cuando se comparan los celíacos en fase activa de la enfermedad, con todos los controles. El área bajo la curva es del 95.11% **B**, Concentración de la proteína cuando se comparan los valores de todos los controles con los celíacos durante la fase activa de la enfermedad. Las cajas representan el valor medio de concentración para Angiostatin \pm los valores máximo y mínimo. La línea de puntos representa el valor del cut off obtenido a partir del índice de Youden. Dicho valor está estimado en más de 230.6 ng/ml. **** representan valores significativos de $p \leq 0.0001$. UCD-celíaco en fase activa de la enfermedad.



Por ultimo, estudiamos si la concentración de dicho marcador ocurre en paralelo a la presencia de anticuerpos en la sangre de los celíacos durante la fase aguda de la enfermedad. Como resultado del análisis, no encontramos ninguna correlación significativa entre los niveles de anticuerpos y la concentración de ADAMTS-1. Tampoco encontramos una correlación, en relación con el sexo o la edad (datos no mostrados). Además, observamos que aquellos niños celíacos que tienen niveles de

anticuerpos más bajos o más elevados, no presentaban ningún perfil distintivo concomitante para “Angiostatin”.

5. Discusión de los resultados

1. Proteómica del suero de pacientes: Fase clínica 1.

1.1 Estudio de marcadores angiogénicos en celíacos.

El Primer objetivo del presente trabajo consistió en el análisis del perfil angiogénico de los celíacos, indistintamente de la fase de la enfermedad, para explorar la posibilidad de que dicho perfil sea constitutivo de la población y por tanto pudiera servir como criterio predictivo. Este análisis, queda justificado por la relevancia que tienen los vasos sanguíneos en la mucosa digestiva ya que son cruciales tanto en su arquitectura, fisiología y funcionalidad. Por un lado, el intestino delgado, que presenta una superficie de 250 m², necesita un aporte sanguíneo considerable para garantizar sus necesidades en oxígeno así como la absorción y difusión de nutrientes. Además, el flujo de sangre a través de la circulación esplácnica intestinal, representa una cuarta parte del gasto ventricular izquierdo [252] y tiene un volumen equivalente a 10 veces el flujo sanguíneo que, por ejemplo, recibe el músculo esquelético [253]. Esto implica el desarrollo de una red muy densa de vasos sanguíneos que ocupan un área total similar a la de un campo de tenis [254]. Desde el punto de vista arquitectónico, el plexo vascular submucoso se ramifica, hasta penetrar en la mucosa donde un único vaso llega hasta el apex de la vellosidad. Éste, se divide en pequeños capilares que terminan uniéndose a la vénula y de ahí a la vena de la capa submucosa. Todo este entramado vascular está auto-regulado, para garantizar un flujo continuo y estable de sangre, por un lado mediante las contracciones del músculo liso de los vasos intestinales y por otro mediante la acumulación de metabolitos reguladores del flujo sanguíneo. En este contexto, la presencia de alimento conlleva cambios en el flujo sanguíneo intestinal [255]. Por ejemplo, en el yeyuno, su flujo aumenta considerablemente cuando se recibe alimento [256-258]. Además, la cantidad de alimento [259, 260] o si el contenido de la dieta es mayor en grasas y glucosa, se estimula la secreción de hormonas vasoactivas resultado en un mayor flujo sanguíneo, lo que no ocurre con las proteínas [261-263].

En línea con estos hallazgos, el gluten se corresponde con la fracción proteica del cereal y su presencia teóricamente no debería afectar a la funcionalidad de los vasos *per se*. Aunque no hay evidencia experimental directa de la acción del gluten sobre los vasos sanguíneos, algunos datos apuntan a que no tendría efecto mientras que otros sugieren acciones indirectas. Por un lado, se ha observado por MRI en personas sanas, que la ingestión de gluten en la comida no afecta al tiempo de vaciado gástrico cuando

se comparan con aquellas dietas que no contienen gluten [264], recordemos que dicho tiempo de vaciado se relaciona con la liberación de péptidos vasoactivos y por tanto con la variación en la función circulatoria intestinal [265]. En contraposición, cuando se compara el efecto de una dieta que contiene gluten con una donde esta exento, se observa, un incremento en la motilidad gástrica y de la vesícula biliar [266], lo que podría indirectamente alterar el flujo sanguíneo intestinal [267, 268]. A pesar de estas discrepancias y del hecho de que el flujo sanguíneo intestinal se pudiera ver afectado con la presencia de gluten en la dieta, lo que no se ha observado es un cambio de la arquitectura de los vasos sanguíneos intestinales cuando el gluten está presente. Sin embargo, al estudiar la arquitectura vascular en biopsias de celíacos se observa que durante la fase activa de la enfermedad, existe una desregulación de la microvasculatura de la mucosa, donde el número de los vasos sanguíneos así como su organización se encuentran alterados [247]. A su vez, la madurez de los vasos sanguíneos determinada por la presencia del marcador “ α - Smooth Muscle Actin”, se encontró disminuida en la microvasculatura digestiva en celíacos durante la fase activa de la enfermedad [247]. Por cierto, estas alteraciones vasculares en el número, arquitectura y madurez de los vasos, pueden explicar algunos de los síntomas de los celíacos, como la desnutrición, a la vez que podrían participar en la patogenia por ejemplo facilitando la infiltración de linfocitos [269].

Cuando los celíacos siguen una dieta libre de gluten, la arquitectura vascular revierte haciéndose similar a la de los controles, todo ello en paralelo a la remisión de los síntomas clínicos y de los cambios histológicos de la mucosa intestinal [247]. Otras observaciones posteriores han puesto de manifiesto, que los anticuerpos anti-TG2, que se producen en respuesta al gluten en los celíacos, se encuentran depositados al rededor de los vasos sanguíneos [247]. Además se ha observado que estos mismos anticuerpos afectan a la permeabilidad vascular [269], a la movilidad de las células endoteliales, así como a la dinámica de los vasos [270], a través de intermediarios como son RhoA o RhoB [269, 271]. Por último, el tratamiento farmacológico a nivel de la actividad enzimática de la TG2 o de sus intermediarios en las células endoteliales, revierte estas acciones anti-angiogénicas [196, 271-273]. Queda claro, que la presencia del gluten en la dieta de los celíacos activa una cascada de proteínas intermediarias que favorecen la desregulación de los vasos sanguíneos intestinales. En línea con estos hallazgos, en nuestro estudio hemos encontrado que los sueros de

niños celíacos durante la fase activa, es decir, cuando comen gluten, presentan un perfil de proteínas circulantes que están asociadas con la regulación de la arquitectura y fisiología vascular, diferente al que se observa en los controles. Sin embargo, de acuerdo también a nuestros resultados, el perfil de marcadores angiogénicos en celíacos cuando comen gluten en muchos casos no difiere de los niveles de las mismas proteínas encontradas en celíacos durante la dieta sin gluten y todos ellos difieren, a su vez, de los niveles encontrados en los controles. Nuestros resultados, por tanto, reflejan un perfil constitutivo en marcadores de vasos sanguíneos en la población celiaca.

Dicho perfil, sería independiente de las variaciones angiogénicas encontradas debidas a la presencia del gluten en la dieta y como consecuencia de la existencia de anticuerpos anti-TG2, lo que acentuaría, sin lugar a dudas, las diferencias angiogénicas encontradas durante la fase activa de la enfermedad. Esta interpretación de nuestros resultados y por tanto de la existencia en celíacos de un perfil angiogénico específico e independiente del estado de la enfermedad, se corrobora con un estudio GWAS realizado a partir de biopsias intestinales de niños celíacos, donde se analizaron las secuencias de diferentes genes implicados. En dicho estudio se observó la aparición de “single nucleotide polymorphisms” (SNIPs) en regiones del genoma que afectan a genes implicados en la angiogénesis [248]. A su vez, estas variaciones se potenciaban durante la fase activa de la enfermedad, donde la presencia del gluten iniciaba la expresión o represión de genes implicados en el proceso angiogénico [248]. Cuando este efecto se comparó con el de los anticuerpos anti-TG2 sobre cultivos de células endoteliales o fibroblastos, los resultados de expresión encontrados fueron contradictorios, evidenciando que las variaciones angiogénicas encontradas no se deben solo a la presencia del gluten y a sus intermediarios (anticuerpos anti-TG2), sino que se relacionan con variaciones intrínsecas en el genoma de los celíacos [248]. En otras palabras, la presencia del gluten exacerbaría la expresión o represión de genes relacionados con la angiogénesis que de manera constitutiva presentan un perfil de expresión diferencial en celíacos.

La expresión de proteínas relacionadas con los vasos sanguíneos en celíacos durante una dieta sin gluten, se traduce en una morfología y, aparentemente, funcionalidad de los vasos “normal”. A pesar de esta aparente normalidad, los datos aquí presentados muestran que a nivel molecular existen diferencias en niveles de expresión de algunos intermediarios involucrados en el proceso de formación y

funcionalidad de los vasos. Los resultados encontrados en nuestro estudio, arrojan luz y muestran por primera vez que los celíacos presentan un perfil vascular a nivel molecular diferente que puede ser estudiado para la identificación de la celiaquía, incluso antes de la incorporación del gluten en la dieta. Cabe por tanto preguntarse cuales de estas proteínas que se modifican, lo hacen en ambos grupos de celíacos de la misma manera y por consiguiente pueden considerarse como marcadores constitutivos en la identificación de la población celiaca.

1.2. Análisis de los candidatos potenciales para el reconocimiento precoz de la enfermedad celiaca: Mapas de Expresión o “heat map” y diagramas de Venn.

El criterio para encontrar un potencial candidato que sirva en la identificación de la celiaquía, debe consistir en un marcador que se exprese de manera diferencial en celíacos respecto de los controles, pero que no se encuentre alterado en ninguna de las fases de la enfermedad. Estos marcadores constitutivos de la enfermedad serían importantes para el pronóstico de la celiaquía, incluso antes de la incorporación del gluten en la dieta. Por otro lado, es necesario discriminar aquellos marcadores que sólo se ven alterados durante el periodo activo de la enfermedad y por tanto están vinculados directamente con los cambios ocurridos en dicha fase. Estos marcadores serían útiles en el reconocimiento de la celiaquía durante fases agudas y podrían ser complementarios a los marcadores utilizados habitualmente en la clínica, tal vez incluso cuando sus niveles no fueran detectables o no se presentara sintomatología. Por consiguiente, para discriminar este tipo de marcadores realizamos dos análisis por un lado un mapa de expresión o “heat map” y por otro lado, la elaboración de diagramas de Venn. Como ya se comentó en el apartado de los resultados, cuando se realiza el agrupamiento de los valores de expresión de proteínas obtenidos en el array, observamos que los sets de muestras se agrupaban de acuerdo al grupo experimental, mientras que cada grupo experimental difería de los otros. Este resultado da solidez a los valores de expresión de proteínas relacionadas con los vasos sanguíneos y determina que las diferencias encontradas entre los grupos no se deben a la casualidad. Aunque no es el caso, ya que los valores de proteínas analizadas por “heat map” son homogéneos, pudiera ser que existieran grandes diferencias entre pacientes lo que afectara a la consistencia y posterior reproducibilidad de los marcadores encontrados,

lo que se habría detectado por este método. Además, el mapa de expresiones o “heat map” también reveló la existencia de un considerable grupo de proteínas que aparecen inalteradas en los celíacos independientemente de la fase de la enfermedad. Este conjunto de proteínas, es muy interesante, por ser indicativo de la población celiaca y por consiguiente, dichas proteínas podrían ser potencialmente útiles en su pronóstico cuando el gluten no está presente.

Los análisis de agrupación y Venn, avalan la hipótesis de la existencia de variaciones intrínsecas de la población celiaca, que podrían considerarse como marcadores de pronóstico. Esto se explicaría por el hecho de que los celíacos presentan niveles de expresión de marcadores angiogénicos muy diferentes del de los controles no celíacos y en el análisis por agrupación o “cluster”, los celíacos (tratados y en menor medida los no tratados), muestran distancias en la expresión de proteínas de angiogénesis mayores respecto de los controles sanos. Por otro lado, recordemos que los celíacos durante la fase activa de la enfermedad presentan una respuesta angiogénica dependiente del gluten. En este contexto, las diferencias de los marcadores de angiogénesis existentes entre celíacos y no celíacos, podrían encontrarse enmascaradas por el efecto anti-angiogénico del gluten en los celíacos no tratados. De ahí, que el grupo de los no tratados muestre distancias en la agrupación entre medias de los celíacos tratados y los controles. Todo ello apunta a que los marcadores encontrados en los celíacos podrían ser constitutivos de la población, y esa es la razón por la que se separan en la agrupación de los niveles de los controles.

Sin embargo hay una cuestión que hay que aclarar antes de dar por validada dicha hipótesis. Por definición, los controles incluidos en nuestro estudio presentaban un genotipo diferente del HLA DQ2 o DQ8 que es característico de los celíacos. Esto se hizo así, para evitar incluir niños en el grupo control que pudieran ser celíacos no diagnosticados, ya que un genotipo diferente del HLA DQ2/Q8 es incompatible con la enfermedad celiaca. Sin embargo, pudiera ser que la naturaleza de las diferencias encontradas entre celíacos y controles en nuestro estudio, radique específicamente en el haplogrupo del HLA, es decir, que el tipo de HLA sea la causa detrás de las diferencias encontradas entre los grupos experimentales. Esto cobra mucha relevancia, si se tiene en cuenta que al rededor del 40% de la población sana, es decir no celiaca, es HLA DQ2 y en menor proporción DQ8 [67, 274]. De ser el tipo de HLA la razón de las diferencias encontradas, los potenciales marcadores resultado de nuestro estudio,

no serían específicos de celíacos y por tanto inútiles para el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, de acuerdo a la literatura científica no parece que exista un vínculo directo que relacione el tipo de HLA, especialmente en el caso del DQ2/DQ8, con la expresión de proteínas relacionadas con los vasos sanguíneos. Si que se asocia con la respuesta inmune y en este contexto se han descrito acciones pro o anti-angiogénicas como consecuencia indirecta y por tanto secundaria a los efectos inmunológicos. Un ejemplo de esto ocurre durante el cáncer de pecho (mama), donde existe un incremento en la expresión de moléculas de HLA G y DQ que resulta en un aumento de la agresividad del tumor. Este efecto ocurre en paralelo a un incremento de los vasos sanguíneos promovidos por las células del estroma ya que los linfocitos T, en esa combinación de HLA, son menos citotóxicos [275, 276]. Si que se ha observado, que la molécula soluble de HLA-G1, está asociada con la modulación de la actividad de las células endoteliales mediante la inhibición en su proliferación, migración o formación de estructuras vasculares *in vitro* [277]. Por otro lado, en modelos de ratón que expresan HLA DQ8 existe una susceptibilidad a padecer miocarditis autoinmune, y aunque exista un fallo en el corazón, no se observa que dicho fallo exista como relación directa entre el HLA y algún potencial defecto vascular, si no más bien a consecuencia de un aumento de los infiltrados de células del sistema inmunológico [278]. Los datos recopilados de la literatura, son contradictorios entre si, en algunos contextos aumentan los vasos sanguíneos, mientras que en otros disminuyen lo que apunta a que la regulación angiogénica no está vincula directamente a la presencia de un HLA concreto. A la luz de todos estos datos, no parece que los vasos sanguíneos se vean alterados por mecanismo directos relacionados al tipo de HLA, más allá de acciones puntuales y dependientes de contexto, debidas a la función inmunitaria. Sin embargo, para descartar la posibilidad de que el tipo de HLA se vincule con cierta respuesta vascular, un grupo control de no celíacos que comparte genotipo HLA DQ2/8 con los celíacos, fue incluido en la validación posterior de los marcadores encontrados en esta fase del estudio, como se discutirá más adelante en el presente trabajo. Además, es importante descartar la posibilidad de que la respuesta inmunológica asociada al tipo de HLA, pueda afectar de manera secundaria a la angiogénesis siendo ésta la causa de las variaciones descritas. De ser esto así, los marcadores de angiogénesis encontrados en nuestro estudio, no serían constitutivos de la celiaquía y por tanto no servirían para pronosticar la enfermedad. Para responder

esta cuestión, el perfil angiogénico de células que derivan de biopsias digestivas de celíacos fue estudiado. Estas células presentan algunas particularidades que las hacen interesantes para nuestro estudio, ya que tras sucesivos pases en cultivo, se encuentran libres de células o factores solubles del sistema inmunológico.

1.3. Estudio de los marcadores angiogénicos en cultivos celulares privados de las acciones del sistema inmunitario.

Un estudio de los marcadores encontrados, en células que derivan de biopsias digestivas de celíacos fue realizado, para determinar que las diferencias angiogénicas observadas son debidas a la existencia de un genotipo/fenotipo intrínseco de celiaquía y no como consecuencia de otros factores secundarios relacionados con el sistema inmune o de su participación en la biología vascular. En el momento en que se realizó el presente trabajo, el criterio de la ESPGHAN en relación con el diagnóstico de la celiaquía y de obtención de biopsias intestinales en niños había cambiado, a favor del estudio basado exclusivamente en el título de anticuerpos [153]. Por consiguiente, al existir métodos diagnósticos alternativos, la obtención de biopsias intestinales planteó cuestiones éticas. Lo que nos permitió tener acceso a un número muy reducido de biopsias, aunque suficiente para aislar líneas celulares. Debido a la fragilidad de las biopsias de la mucosa intestinal, la rapidez y facilidad en la que el tejido se deteriora y por el valor de obtener una biopsia digestiva cuando no es una metodología que se use en el diagnóstico de manera habitual, decidimos aislar células de dicho material en vez de usar la biopsia entera. Además usar una biopsia de celíaco en fase activa, no es posible, ya que no permite descartar el efecto del sistema inmune en la configuración vascular. Otra opción sería el uso de biopsias procedentes de niños celíacos que no comen gluten ya que en este caso la función inmune está normalizada, pero existe una dificultad añadida a la hora de obtener dicho material ya que el seguimiento de la dieta sin gluten y la remisión de la fase activa de la enfermedad, se realiza a través de muestras serológicas y no por la obtención de biopsias según criterio de ESPGHAN [153]. Por todos estos motivos decidimos usar las células aisladas de dicho material.

La obtención de células de la mucosa es un proceso complejo, ya que una vez obtenidas las biopsias digestivas, la morfología del epitelio y la capa mucosa cambia con mucha rapidez, lo que reduce el número de células disponibles que se pueden aislar. Esto afecta principalmente a las células del epitelio y en menor grado a las

células endoteliales. Debido al poco número de biopsias al que tuvimos acceso y por la propia metodología, el aislamiento de células endoteliales no fue posible. Sin embargo, para entender las diferencias encontradas en nuestro estudio y descartar el efecto que pudiera tener el sistema inmunológico en este proceso, es importante encontrar tipos celulares que además de ser obtenidos con facilidad puedan ser claves en la regulación de la fisiología del tejido, incluyendo la formación de vasos sanguíneos.

De todas las poblaciones celulares existentes en los tejidos y en particular en el intestinal, los fibroblastos, son el tipo celular más frecuente. Entre sus funciones se encuentran, la de constituir el esqueleto estructural de los tejidos [279]. Además son células implicadas en la homeóstasis del tejido contribuyendo con la formación de la matriz extracelular, liberación de factores de crecimiento, reparación y en la respuesta inflamatoria [279-282]. Son células mesenquimales capaces de alterar su fenotipo y diferenciarse en otros tipos celulares en situaciones patológicas o frente a estrés, por ejemplo durante la reparación de heridas o en el cáncer [283, 284]. Además tienen la capacidad de regular el proceso de formación de vasos sanguíneos mediante la liberación de factores moduladores de la angiogénesis [285]. Si atendemos a su localización en el tejido intestinal, los fibroblastos son las células sobre las que se apoya el epitelio de la mucosa junto con una capa densa de matriz extracelular [286]. A su vez, esta lámina basal se asienta sobre un conjunto de fibras de colágeno donde los fibroblastos sub-epiteliales son las células mayoritarias [287]. Debido a su importancia en la fisiología de la mucosa intestinal, el hecho de que es el tipo celular más abundante en la mucosa, así como por su participación en la formación de vasos sanguíneos y la facilidad en su aislamiento a partir de biopsias intestinales, los fibroblastos son el mejor candidato para descartar el papel del efecto inmunológico en las diferencias angiogénicas observadas en los celíacos. Además, sucesivos pases en cultivo eliminan el efecto de las citoquinas y otros factores liberados por el sistema inmunológico que puedan ser la causa de las diferencias observadas.

Así, como se describió en el apartado de resultados, encontramos la presencia de expresión de 13 marcadores angiogénicos candidatos en los fibroblastos, de los que al menos 5 de ellos, presentaban valores consistentes con los encontrados en el suero de los celíacos. A su vez, la expresión de estas 5 proteínas en fibroblastos es ligeramente mayor que en el suero. Las proteínas que circulan en la sangre se pueden encontrar

diluidas si la aportación de dichos valores se deben a un tejido concreto o aumentadas por su acumulación, debido a la producción en diferentes localizaciones. Además, que los valores de expresión de una proteína puedan aparecer aumentados en un tejido en relación con sus valores en sangre, pueden deberse también a acciones paracrinas dentro del mismo tejido. Nuestros datos no pueden descartar ninguna posibilidad, aunque por un lado altos niveles de expresión de estas proteínas en el tejido reflejarían que tienen acciones paracrinas, además que pueden estar reflejando que el tejido intestinal podría ser el mayor contribuyente de los niveles de al menos “Pentraxin-3”, NRG1- β 1, EG-VEGF, ADAMTS-1 y TIMP-4 en la sangre. De hecho, cuando se correlacionaron los valores encontrados en las proteínas para angiogénesis en fibroblastos en comparación con el suero de los celíacos, se observó la existencia de una correlación significativa y positiva, lo que significa que cuando la expresión de las proteínas angiogénicas aumenta en los fibroblastos, también aumenta en el suero de los celíacos y por tanto parece indicar que sólo afectaría a los niveles de aquellas proteínas que están sobre expresadas. Esta relación, cobra más relevancia al establecer las comparaciones con los 13 potenciales marcadores que están alterados en los celíacos respecto de los controles. Parece por tanto, que nuestros datos apuntan a la idea de que el tejido intestinal presenta un fenotipo vascular diferente, y que este afecta a los niveles circulantes de dichos marcadores. En este puzzle, los fibroblastos de la mucosa digestiva, podrían jugar un papel fundamental en el establecimiento y adquisición de un determinado perfil vascular en los celíacos. De hecho, en fibroblastos de la cavidad oral se ha observado la expresión de citoquinas que promueven entre otras acciones, un incremento de la respuesta vascular [288]. Lo más interesante es que estas acciones se originan en fibroblastos que expresan un HLA DR y DQ [288]. Además en un estudio donde se compararon 63 tipos de fibroblastos procedentes de diferentes localizaciones en el cuerpo, se observó que los fibroblastos de la mucosa intestinal se diferenciaban del resto, que por cierto eran homogéneos entre si. Estos fibroblastos intestinales están altamente especializados y expresan genes con funciones relevantes en la regulación transcripcional, producción de ligandos señalizadores y moléculas de remodelado y regulación de la matriz extracelular por cierto mediante la expresión de diferentes sub-unidades de ADAMTS o de TIMP [289], todo ello relevante en el proceso de formación de vasos sanguíneos. Además esta especialización de los fibroblastos, podría estar involucrada en la diferenciación de los

mastocitos y de la proliferación de células epiteliales o del músculo liso, así como en el proceso de reclutamiento de células inmunológicas [290-293]. Todo esto, mediante la expresión por parte de los fibroblastos de un cóctel de factores humorales, entre los que se encontrarían reguladores de la angiogénesis, para el mantenimiento de la homeóstasis del tejido intestinal [289, 294-296].

En línea con los hallazgos anteriores, se ha observado que los fibroblastos intestinales obtenidos de biopsias de celíacos, presentan una morfología diferente en relación con los controles, independientemente del estado de la enfermedad del que procedan, es decir de la presencia o ausencia del gluten [251]. Además, esas diferencias morfológicas se traducen en una menor movilidad y velocidad de las células, así como una reducción del 50% de la enzima TG2, que por cierto presenta un aumento en su actividad enzimática [297]. Recordemos que la TG2 es una enzima con acciones muy relevantes en el proceso de formación de la matriz extracelular así como de la formación de vasos sanguíneos, y un aumento de esa actividad conlleva un efecto anti-angiogénico [272, 298]. En otras palabras, los fibroblastos intestinales en los celíacos presentan un fenotipo característico que podría, a la luz de nuestros resultados, estar implicado en los niveles de expresión de algunos de los marcadores angiogénicos encontrados en el suero de los celíacos, independiente de su participación en la patogenia de la celiaquía. Sin embargo, nuestros resultados, presentan un factor limitante como es el bajo número de líneas celulares usadas. Estudios posteriores están garantizados, sin lugar a dudas, para esclarecer la participación de estas células en una angiogénesis diferencial en la celiaquía.

Por último, los valores de expresión de los marcadores vasculares encontrados en fibroblastos intestinales, presentan un perfil diferencial dependiente del sexo. Como se mostró en el apartado de los resultados, los fibroblastos que procedían de biopsias del sexo femenino comparten un perfil más similar al observado en el suero de los celíacos, que cuando procedían de biopsias del sexo masculino. Se sabe que hombres y mujeres presentan diferencias en relación a los vasos sanguíneos aducidas a la participación hormonal [299-301]. Sin embargo se ha observado, más allá de la acción hormonal, que cultivos de células endoteliales procedentes de cordones umbilicales de niños y de niñas, muestran diferencias en la función angiogénica [302]. Nuestros resultados podrían ser un reflejo de dichas diferencias, aunque es interesante destacar que todas las proteínas que aparecen aumentadas en el suero de los celíacos también

lo hacen en los fibroblastos independientemente del sexo. Esto, podría estar reflejando la importancia de la sobre expresión de estas 5 proteínas desde un punto de vista funcional en la celiaquía. En otras palabras, estas proteínas angiogénicas, serían marcadores de identificación de la celiaquía muy consistentes, ya que no parecen estar asociados al sexo. Además, estos resultados plantean la cuestión de si el perfil vascular podría ser una de las causas de la patogenia de la celiaquía, y por consiguiente podría explicar el por qué la enfermedad es más frecuente en el sexo femenino. Finalmente los resultados mostrados en relación con los fibroblastos apuntan a que los marcadores encontrados en el suero de los celíacos, probablemente no se deban a la participación del sistema inmunológico, favoreciendo la hipótesis de que los marcadores encontrados son intrínsecos de la población celíaca. Por último, los resultados mostrados con los fibroblastos, ponen de manifiesto la aportación de la mucosa intestinal en los niveles de los marcadores relacionados con los vasos sanguíneos, encontrados en la sangre de celíacos.

2. Estudio de las proteínas candidatas encontradas en el suero de celíacos: fases clínicas 2-3.

Tras establecer la existencia de un perfil distintivo en celíacos a nivel de expresión de proteínas relacionadas con los vasos sanguíneos, nos preguntamos si los niveles de estos marcadores se mantenían constantes en una población mayor de pacientes. Así pues, validamos la existencia de dichos marcadores en un estudio clínico donde se incluyeron un mayor número de muestras de suero de niños.

2.1 Validación de las proteínas que aparecen en celíacos independiente de la fase de la enfermedad: su adecuación como marcadores de pronóstico.

De todos los marcadores encontrados como resultado del estudio basado en el array de 54 proteínas relacionadas con la angiogénesis, centramos nuestros esfuerzos en la validación de aquellos marcadores que aparecieron aumentados en celíacos independientemente de la fase de la enfermedad, pero que diferían de los controles. El interés en estos marcadores radica en el hecho de que podrían ser constitutivos de la enfermedad y útiles en la identificación de los celíacos independientemente de la fase donde se encuentren. Así, un total de 4 proteínas fueron seleccionadas para la siguiente fase del estudio. Estos marcadores son, TIMP-4, NRG1- β 1, "Pentraxin-3" y ADAMTS-1. Las proteínas que como resultado del array de proteómica aparecieron reguladas a la baja en el suero de celíacos cuando se comparaban con los controles sanos, no fueron incluidas en esta fase del estudio. Solo aquellas proteínas que se sobre expresan en fibroblastos muestran valores correlacionados con el suero, y debido a las discrepancias que encontramos para los niveles de expresión de dichas proteínas en relación con el sexo, decidimos no incluir estos marcadores en la presente fase del estudio.

A. Validación de TIMP-4.

Como resultado del estudio de proteómica, los valores de expresión de TIMP-4 aparecieron aumentados en los celíacos respecto de los controles, independientemente de la fase de la enfermedad. Debido a que sus niveles de expresión fueron máximos en los celíacos y además esta proteína no se había descrito anteriormente durante la celiaquía, TIMP-4 era uno de los marcadores candidatos para ser validados en una fase

clínica posterior. Además, puesto que el HLA DQ2/DQ8 aparece en el 30-40% de la población, en esta parte del estudio incluimos un control sano con un genotipo compatible para celiaquía y así se descartó posibilidad de que las diferencias no fueran exclusivas de los celíacos. Como resultado de nuestra validación, no encontramos diferencias entre los grupos para TIMP-4, lo que refleja que dicho marcador no es constitutivo de la población celíaca, y por consiguiente no puede ser usado para discriminar a los celíacos de la población sana.

Aunque la proteómica es una metodología que se ha desarrollado enormemente durante los últimos años y es una de las aproximaciones experimentales más útil en el reconocimiento de marcadores, aun no existe un consenso de cuales son las mejores prácticas en dicha materia. Esta ausencia de consenso, afecta a la reproducibilidad de los resultados así obtenidos y por ejemplo, el tipo de análisis realizado o la normalización de los datos son factores que afectan al resultado final [303]. Para evitar este efecto, decidimos usar un kit comercial de proteómica donde nos centrábamos sólo en estudio de 54 proteínas angiogénicas, donde sus niveles de expresión se miden mediante anticuerpos. Un factor limitante en los estudios de marcadores mediante técnicas de proteómica, y también en el kit que usamos, es el coste. Debido al precio de la aproximación, no es posible abordar la metodología mediante la utilización de muestras individuales sino usando grupos de muestras o pules. En este sentido parece que las variaciones encontradas entre la primera fase del estudio y la segunda se deban principalmente a las muestras usadas, ya que como se ha comentado, en la primera fase del estudio, usamos mezclas de sueros de pacientes. Esta manera de aproximarse a la identificación de marcadores puede traer errores en los resultados, debido a que no todas las muestras pueden tener los mismos niveles de un marcador y por eso es importante realizar un estudio de validación posterior. En este contexto, es posible que alguna de las muestras introducidas en el estudio inicial de proteómica pudieran tener valores de TIMP-4 muy elevados en los celíacos o muy bajos en los controles, y por tanto, introdujeran un sesgo en el resultado afectando a la reproducibilidad del resultado.

B. Validación de NRG1-β1.

El segundo marcador que presenta más diferencias de expresión tras el análisis por proteómica es NRG1-β1, donde sus niveles se encontraban muy elevados en

celiacos independientemente de la fase de la enfermedad cuando se comparaban con los controles sanos. La validación de estos resultados mostró la existencia de diferencias significativas de todos los celíacos independientemente de la fase de la enfermedad frente a los controles. Donde además no existían diferencias en los celíacos independientemente de la fase de la enfermedad cuando se compararon los celíacos entre sí. Estos resultados avalan la hipótesis de que los celíacos presentan un perfil angiogénico distintivo, detectable y que puede ser constitutivo de la población al menos para NRG1- β 1. Además es la primera vez que la alteración de dicha proteína se describe en el celíaco.

Aunque es difícil predecir su participación en el curso de la celiaquía, los niveles de NRG1- β 1, que son el producto de un gen que expresa la síntesis de una glicoproteína de membrana que por “splicing” alternativo da lugar a diferentes isoformas (de acuerdo con “gene cards” <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NRG1>) que están implicadas en la fisiología pero también en escenarios patológicos [304-306]. De todas las variantes de la proteína NRG-1, el marcador encontrado en los celíacos, es la NRG1- β 1, que se origina a partir de las modificaciones post-traducción realizadas por la rotura entre los aminoácidos 20 y 242 del fragmento de la glicoproteína en contacto con el espacio extracelular [307]. El péptido de 223 aminoácidos así segregado, no solo estaría presente en el espacio extracelular sino que puede movilizarse a la sangre [308]. En algunas condiciones patológicas relacionadas directa o indirectamente con la inflamación, estos niveles de NRG1- β 1 así circulantes, pueden encontrarse alterados respecto de los controles como se ha observado en la diabetes [309], el Parkinson [310], la esquizofrenia [308], el cáncer de mama [304, 311] o las enfermedades cardiovasculares [312]. En línea con estos resultados, en nuestro estudio, hemos encontrado niveles detectables de dicha proteína en los celíacos independientemente de la fase de la enfermedad. Además los niveles circulantes de NRG-1 se han usado como marcador de prognosis, o de detección en enfermedades tales como, el cáncer de mama [311], el Alzheimer [313], cáncer de páncreas [314], incluso como marcador en el seguimiento de la efectividad de fármacos [306]. Por consiguiente, cabe preguntarse si los niveles de NRG1- β 1 encontrados en los celíacos podrían ser útiles para pronosticar la existencia de la enfermedad, incluso cuando el gluten no está presente en la dieta.

El análisis de la especificidad y sensibilidad mediante curva ROC mostró valores del 72.84%, lo que hace de los niveles circulantes de NRG1- β 1 un marcador regular en el pronóstico de la celiaquía. Sin embargo, casi un 40% de los celíacos independientemente de la fase de la enfermedad, presentaban concentraciones circulantes del marcador mayores de 5000 pg/ml. Además, el análisis de la especificidad y sensibilidad mostró que niveles por encima de dicha concentración umbral podría constituir un marcador excelente de identificación para este subgrupo dentro de la celiaquía (recordemos que el valor del área bajo la curva en estas condiciones, fue de casi el 96%). Aunque es difícil interpretar la naturaleza, detrás de dichas diferencias, la fase de la enfermedad no parece estar relacionada. Sin embargo, la relevancia biológica de la NRG1- β 1 podría explicar la presencia de estos subgrupos, ya que su expresión es importante a nivel del endotelio vascular, donde tendría efectos beneficiosos promoviendo el carácter pro-angiogénico del endotelio, facilitando su proliferación, supervivencia y protegiéndolo frente a la toxicidad mediada por estrés oxidativo [315-320]. Todo ello, debido entre otros elementos, a la presencia de factores angiogénicos como son VEGF o “angiopoietin-1” [321]. Aunque en nuestro estudio, observamos un incremento de la expresión de EC-VEGF en celíacos, también vimos una disminución de C-VEGF, y no encontramos modificaciones de los niveles de VEGF o “angiopoietin-1” lo que hace difícil que esta pueda ser la causa de la presencia de las dos subpoblaciones. Por otro lado, ha sido sugerido que NRG1- β 1 se podría acumular debido a la reducción en la presencia de sus receptores ERBB3 o ERBB4 [317, 322], lo que podría determinar, en nuestro caso, la coexistencia de los dos subgrupos de acuerdo a la expresión del receptor. Sin embargo, nuestros datos ni avalan, ni rechazan dicha hipótesis, que de ser así, podría apuntar a la existencia de un fenotipo antiangiogénico en los celíacos, a pesar de los elevados niveles de NRG1- β 1. Una evidencia indirecta de este fenómeno, y de la existencia de un potencial fenotipo antiangiogénico en los celíacos a pesar de los niveles de NRG1- β 1, se observa en los accidentes cerebro-vasculares, donde el riesgo en niños celíacos cuando comen gluten es ligeramente mayor para, tras 5 años de dieta sin gluten, hacerse similar al del resto de la población [323]. Esto pone de manifiesto, un potencial carácter antiangiogénico del fenotipo del celíaco, donde parece que la NRG1- β 1 aunque este elevada, no puede actuar al menos a nivel del endotelio vascular, ya que aquellos niños que presentan

valores de la proteína mayores, deberían tener una protección frente a este tipo de eventos, cosa que no parece ocurrir.

Otra evidencia del fenotipo antiangiogénico en el celíaco a pesar de los elevados niveles de NRG1- β 1, radica en el hecho de que como resultado de nuestro análisis, los niveles de VEGF o de “angiopoyetina” no se encontraron alterados en los celíacos. Sin embargo, en modelos animales experimentales de fallo cardíaco, se ha observado que el tratamiento con NRG1- β 1, incrementa la expresión de ambas proteínas lo que favorece la pronta recuperación del tejido por incremento en la vasculatura [324], hecho que no se ha observado ocurra en nuestra población. Por otro lado, la NRG1- β 1 es una proteína asociada con la función inmunológica, donde su variación en la concentración o incluso la presencia de mutaciones en su secuencia de aminoácidos, podría afectar a las poblaciones de células inmunes y disminuir la producción de citoquinas pro-inflamatorias o atenuar el depósito de anticuerpos [319, 325-329]. En paralelo, los niveles elevados de la NRG1- β 1 promueven acciones beneficiosas a nivel del tejido, sobre todo en estados patológicos, donde esta proteína fomenta la expresión de mediadores para la regeneración tisular, mientras que atenúa los mecanismos inflamatorios [320, 325]. Así, para determinar si la existencia de los dos subgrupos pudiera relacionarse con la función inmunológica de los celíacos, establecimos una comparación donde enfrentamos los valores de concentración de NRG1- β 1 en celíacos en relación con el título de anticuerpos circulantes, como una medida indirecta de la función inmune en estos pacientes y a su vez de la agresividad de la enfermedad [330]. Como se mostró en el apartado de resultados, la correlación entre niveles de NRG1- β 1 con la función inmunológica de los celíacos parece mostrar la existencia de una tendencia a que cuando la concentración de NRG1- β 1 está aumentada, la función inmune medida por el título de anticuerpos es menor. Sin embargo, antes de descartar esta hipótesis, dado el hecho de que tras establecer dicha correlación no se obtuvieron valores significativos, cabe mencionar que el resultado puede verse afectado porque en este estudio sólo se incluyó un reducido número de muestras donde se conocían los valores exactos de anticuerpo anti-EMA o anti-TG2. En otras palabras, pudiera ser que los diferentes valores de la proteína encontrados en los subgrupos para NRG1- β 1, fueran causa de variaciones inmunitarias, (ya que como se mostró en el apartado 1.3 de resultados, células privadas de la función inmune son responsables de los

elevados niveles NRG1- β 1 en el suero de pacientes). Esto, se traduciría en una reducción de la agresividad en la fase activa de la enfermedad en paralelo a los niveles de concentración de la proteína. Dada la potencial relevancia de este fenómeno no solo en el pronóstico y en la agresividad de la enfermedad, sino también incluso como potencial herramienta en el tratamiento farmacológico de los celíacos, estudios donde se incluyan un mayor número de participantes, están garantizados para discriminar la naturaleza de dichas diferencias.

Finalmente, los niveles de NRG1- β 1 se correlacionan de manera negativa con la edad, es decir, los niños más pequeños, presentan valores de concentración de NRG1- β 1 mayores aunque el sexo no parece ser un factor que influya en la aparición de las sub-poblaciones de NRG1- β 1 según se mostró en el apartado de resultados. En conjunto, todos estos resultados ponen en relieve que aunque la presencia de NRG1- β 1 es constitutiva de la población celíaca, sus valores podrían usarse como criterio para el reconocimiento de la celiaquía independientemente de la presencia de gluten o no en la dieta, especialmente en niños que poseen valores umbral por encima de 5000 pg/ml y que tienen edades menores.

C. Validación de “Pentraxin-3”.

Como resultado del primer estudio para encontrar potenciales marcadores de pronóstico mediante proteómica y del análisis “heat map” y diagrama Venn, los niveles de “Pentraxin-3” se encontraron elevados en los celíacos independiente de la fase de la enfermedad, cuando se compararon con los controles sanos. Por este motivo, realizamos una validación posterior, a través de un ELISA, donde medimos los niveles de la proteína en el suero de cada paciente y participante. Como se mostró en el apartado de resultados, la concentración de “Pentraxin-3” aparecía aumentada en los celíacos durante la fase activa de la enfermedad (aunque no alcanzó la significación estadística), mientras que en aquellos celíacos que no comen gluten, disminuía significativamente respecto de los controles. Además la especificidad y sensibilidad del marcador, mostró que “Pentraxin-3” es un marcador relativamente bueno para la identificación de la celiaquía cuando el gluten no está presente en la dieta, siempre y cuando sus niveles estén por debajo de 0.48 ng/ml, lo que significa que por debajo de este valor umbral, los celíacos serían diagnosticados con una alta especificidad y

sensibilidad. A pesar de todos estos resultados, los datos obtenidos en esta fase del estudio no concuerdan con aquellos encontrados tras la proteómica, donde se observaban valores de expresión de “Pentraxin-3” similares entre celíacos independientemente de la fase de la enfermedad y mayores que los controles. Como ya se explicó en apartados anteriores, por la propia metodología en la que se abordan los estudios por proteómica, es decir, utilizando conjuntos de muestras y no individuos aislados, es posible introducir sesgos en los análisis y por tanto sus resultados deben ser validados.

Lo que nuestros datos muestran es que los celíacos no tratados presentan una tendencia a tener los niveles de “Pentraxin-3” un poco más elevados que los controles, mientras que cuando los pacientes están tratados, porque siguen una dieta sin gluten, sus niveles se encuentran por debajo, lo que convierte a la “Pentraxin-3” en un posible marcador de pronóstico de la celiaquía, cuando los niños no están comiendo gluten. Sin lugar a dudas estas diferencias en la expresión de “Pentraxin-3” reflejan que la modulación de dicha proteína en los celíacos es dependiente de la fase inmunológica relacionada con la ingestión de gluten. En este contexto, se sabe que la “Pentraxin-3” es una proteína que responde a fase aguda en situaciones inflamatorias y autoinmunológicas, como ocurre en el lupus sistémico eritematoso o en la artritis reumatoide, donde “Pentraxin-3” aumenta en el suero de los pacientes, relacionándose su concentración en sangre con la severidad de los síntomas [331, 332]. En celíacos adultos, la presencia del gluten durante la fase aguda de la enfermedad, conlleva aumentos de “Pentraxin-3” en la sangre de los pacientes en paralelo con la presencia de anticuerpos anti-gliadina deamidada, mientras que en la dieta sin gluten dichos valores se hacen similares a los controles [333]. Además la concentración de la proteína está asociada con la agresividad de la enfermedad celíaca, ya que se observan valores mayores cuando las biopsias intestinales presentan un Marsh más elevado [334]. En nuestro estudio, encontramos un perfil similar para “Pentraxin-3”, ya que los niños celíacos en la fase activa de la enfermedad expresan valores más elevados que los celíacos en dieta sin gluten o que los controles aunque, no alcanzaron la significación estadística. Por otro lado, a diferencia de los estudios en adultos, nuestros resultados sí que muestran una disminución significativa de los niveles de “Pentraxin-3” en los celíacos durante la dieta sin gluten, respecto de los controles o de los celíacos

en fase aguda. Estas diferencias entre estudios probablemente están relacionadas con el papel de la “Pentraxin-3” en la inmunidad.

Los niños no tienen la misma respuesta inmunológica que los adultos y en particular, su respuesta innata mediada por el componente celular muestra respuestas débiles a los estímulos inflamatorios, o presenta cascadas de señalización inmaduras que afectan a la secreción de moléculas bioactivas como son TNF- α o IL-15 [335-341]. En el contexto de la enfermedad celiaca, se ha hipotetizado que la presencia del gluten, activa la respuesta innata mediada por IL-15 [334] que facilitaría la producción de “Pentraxin-3” por parte de los macrófagos, neutrófilos o fibroblastos [35], dicha expresión controlaría la respuesta inflamatoria ya que la “Pentraxin-3” podría interactuar con TNF- α o IL-15 [334, 342]. A su vez, la sobre expresión de “Pentraxin-3” tras la exposición al gluten, modularía otras respuestas inmunológicas intestinales mediadas a través del TLR4 y del NF-kB [343]. Recordemos que en el caso de los niños, todos estos componentes se encuentran expresados en un grado menor, lo que facilitaría también una menor expresión de “Pentraxin-3”, como se desprende de los resultados de nuestro estudio. Esta respuesta al gluten durante la fase aguda diferencial entre niños y adultos a nivel inmunológico, explicaría la diferencias encontradas en los niveles de “Pentraxin-3” entre nuestros resultados en niños y estudios previos en adultos. Por otro lado, en adultos celíacos durante la dieta sin gluten, los valores de “Pentraxin-3” son similares a los controles, mientras que en nuestro estudio, los niños celíacos presentan una concentración de la proteína significativamente menor cuando se comparan con los controles. A este respecto, los estudios realizados en adultos tienen una limitante, puesto que miden los niveles de “Pentraxin-3” tras un año de dieta sin gluten, sin embargo aunque la morfología de la mucosa digestiva se encuentre en remisión, otros factores solubles y expresados a consecuencia de la fase activa de la celiaquía, tardan más años en normalizarse, por eso se ha sugerido la necesidad de un tiempo mayor de seguimiento especialmente en adultos [344]. Además el adulto puede tardar décadas en ser diagnosticado lo que favorece un deterioro de los mecanismos fisiológicos y regulatorios al mismo tiempo que es frecuente que tenga otras enfermedades inflamatorias asociadas, lo que sin lugar a dudas afecta a los niveles de “Pentraxin-3” incluso durante la dieta sin gluten [345], como hemos observamos en nuestro estudio con niños, en comparación con estudios anteriores en adultos.

Por último, es interesante analizar el papel del aumento o disminución de los niveles de “Pentraxin-3” en el contexto vascular de los celíacos, tratando de encontrar una función como agente estimulador o inhibidor de la angiogénesis. En este contexto, se sabe que los niveles de la “Pentraxin-3” afectan directa o indirectamente a la biología vascular. Por un lado, afectando a células endoteliales [332], y por otro, a componentes del vaso sanguíneo muy vinculados a la respuesta inflamatoria, como es el caso de las arteritis, de las vasculitis o incluso de la enfermedad arterial coronaria, donde los defectos en la morfología y función de los vasos sanguíneos corren en paralelo con incrementos de la “Pentraxin-3” [346-348]. De hecho, la elevación de dicha proteína tendría un efecto anti-angiogénico ya que afecta a la proliferación y quimiotaxis de las células endoteliales [349] o a la producción de otros factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis, como es el FGF [350]. Por otro lado, niveles bajos de la proteína también ejercerían acciones antiangiogénicas disminuyendo la formación de vasos o contribuyendo con la agregación plaquetaria y la trombosis [351, 352]. Estos datos ponen de manifiesto que los niveles de “Pentraxin-3” fuera del rango fisiológico, ya sea por aumento o disminución, tienen un carácter inhibitorio de la angiogénesis. Lo que explicaría que los celíacos en fase activa tengan una menor angiogénesis y a su vez apunta a la posibilidad de que los mismo celíacos, cuando el gluten no se incluye en la dieta, también continúen presentando un fenotipo antiangiogénico.

D. Validación de ADAMTS-1.

El array de proteómica, mostró que la proteína ADAMTS-1 estaba aumentada en los celíacos ya sea en el suero o en fibroblastos intestinales, independientemente de la fase de la enfermedad como se mostró en el apartado resultados. Tras la validación del marcador mediante un ELISA observamos por un lado que la concentración de ADAMTS-1 en celíacos es mayor que en los controles sanos compatibles con el HLA de la celiaquía, mientras que es menor que los valores para los controles sanos con un HLA diferente del DQ2/DQ8. Esto pone en relieve, las diferencias tan grandes existentes para este marcador dependiendo solamente del genotipo para el HLA. Recordemos que los controles negativos para HLA DQ2/DQ8 presentan concentraciones de ADAMTS-1 muy por encima de aquellos controles con un HLA positivo. Además los niños celíacos presentan concentraciones para ADAMTS-1

mayores que los controles enfermos de otras enfermedades diferentes de la celiaquía, como se mostró en el apartado de resultados. A pesar de esta variación, dichos resultados hay que tomarlos con cautela, ya que el perfil genético de los niños controles que tienen trastornos digestivos no es conocido. Estos niños podrían ser DQ2 o DQ8 de ahí que puedan presentar valores tan similares a los controles sanos para DQ2 o DQ8 positivos. Por otro lado, aunque estos niños son negativos para los anticuerpos anti-TG2 y EMA, no han sido biopsiados, esto significa que pueden no haber sido diagnosticados de enfermedad celiaca aun siendo celíacos, ya que padecen trastornos digestivos.

Por otro lado, como mostró en el apartado de resultados, los valores de ADAMTS-1 encontrados en celíacos, especialmente en una dieta sin gluten, pueden ser buenos marcadores para la detección precoz de la celiaquía ya que encontramos valores de especificidad y sensibilidad de más del 92%. Así, los niveles de ADAMTS-1, podrían discriminar de una manera eficaz, la celiaquía especialmente cuando los niños siguen una dieta sin gluten, frente a los controles con el mismo perfil genético DQ2 y DQ8. Aproximadamente un 30-40% de la población sana es compatible con el perfil genético de los celíacos, especialmente para el DQ2 [67, 274]. Sin embargo, una determinación del perfil HLA no es suficiente para poder hacer un diagnóstico de la predisposición a la celiaquía, debido a que este HLA se comparte con otros dos tercios de población sana, que por cierto nunca desarrollará la enfermedad. En este contexto, ADAMTS-1 es un marcador cuyos niveles se ven asociados al HLA y por consiguiente es capaz de diagnosticar la celiaquía cuando el gluten no está presente en la dieta, con una sensibilidad y especificidad muy altas. Aunque no hemos encontrado una relación directa entre ADAMTS-1 y el HLA DQ2 o DQ8 de los celíacos, en otros escenarios patológicos, se observan relaciones entre el tipo de HLA y la producción de otros miembros de la familia de ADAMTS. Por ejemplo, durante la psoriasis o en la púrpura trombocitopénica trombótica, el HLA no sólo predispone a padecer la enfermedad (como en la celiaquía), sino que favorece que varíe la expresión y la funcionalidad de algunas formas de ADAMTS [353, 354]. La relación entre tipos de HLA y niveles de ADAMTS, puede explicar las diferencias que observamos entre grupos controles, donde observamos que para un HLA DQ2 y DQ8 positivo en niños sanos, los niveles de ADAMTS-1 son menores, que los que encontramos en niños sanos que no tienen dicho perfil HLA. Sin embargo, en celíacos y especialmente en aquellos que siguen una dieta

sin gluten, los niveles de esta proteína se encuentran muy elevados en relación con los niños no celíacos pero positivos para DQ2 y DQ8, esto refleja que los niveles de esta proteína se encuentran elevados de manera constitutiva en los celíacos. Sin embargo, la concentración de ADAMTS-1 durante la fase activada enfermedad, disminuye y aunque presentan una tendencia a ser mayor que la encontrada en los controles sanos con similar HLA, no alcanzo la significación estadística. A la luz de nuestros resultados, es difícil explicar la naturaleza de las diferencias aquí mostradas. Sin embargo, se ha observado que en otros procesos inflamatorios y autoinmunológicos, la existencia de la enfermedad aguda conlleva la producción de anticuerpos frente a otras proteínas de la familia ADAMTS, lo que afecta a su expresión o a su funcionalidad. De hecho, en las fases activas de la púrpura trombocitopénica trombótica y de otras microangiopatías, los niveles de ADAMTS-13 se ven reducidos por la producción de anticuerpos frente a esta proteínas, este hecho resta funcionalidad a la proteína al mismo tiempo que afecta a su concentración [354-356]. Algo similar puede ocurrir durante la fase activa de la celiaquía, donde hemos observado que los niveles de ADAMTS-1 se encontrarían reducidos. Por cierto, cabe destacar que ciertos estímulos inflamatorios pueden estar implicados en la regulación de los niveles de expresión de ADAMTS-1, hecho que sería muy relevante en la celiaquía en fase aguda y que podría ser la causa detrás de la disminución de expresión de la proteína observada, respecto de sus niveles en celíacos tratados [357].

Si atendemos a la función de ADAMTS-1, como es una proteasa localizada en el espacio extracelular, está implicada en la degradación proteolítica del colágeno y de los proteoglicanos del condroitín sulfato [358-362]. Debido a esta actividad, participa en la reorganización de la matriz extracelular, lo que tiene un efecto inhibitorio en la formación de los vasos sanguíneos [363, 364]. Además, dichas acciones antiangiogénicas por parte de ADAMTS-1, se encuentran potenciadas porque secuestra el factor proangiogénico VEGF inhabilitándolo para su función [364], como también interviene en la liberación de otros factores activos inhibitorios de la angiogénesis [365]. En condiciones fisiológicas, existe una regulación de los vasos sanguíneos mediante la liberación de factores proangiogénicos que cuando abundan, como es el caso del VEGF, favorecen el aumento de ADAMTS-1, que regula y frena el incremento en la formación de dichos vasos sanguíneos [366]. Sin embargo durante la celiaquía, independientemente de las fases de la enfermedad, los niveles de VEGF se encuentran

inalterados y son similares a los controles sanos (como observamos tras el estudio de proteómica; resultados no mostrados), aunque los niveles de ADAMTS-1 permanecen elevados (cuando el gluten no está presente) o disminuidos (en la presencia del gluten). Todo esto, parece indicar que la variación de la proteína ADAMTS-1 obedecería a una regulación patológica y constitutiva de la población celíaca. En otros contextos patológicos, se ha observado que la desregulación de ADAMTS-1 se traduce en una reorganización patológica de la matriz extracelular que conlleva una alteración también en el número de vasos [367]. Y esto de ser así en los celíacos, confirmaría la hipótesis de que los celíacos presentan un fenotipo antiangiogénico.

Por otro lado, en estados inflamatorios como es la reparación de heridas, se ha observado que durante la fase inicial donde la inflamación es relevante, ADAMTS-1 permanece disminuida lo que favorece la proliferación de fibroblastos y células endoteliales [368], algo que también se ha observado en los celíacos durante a fase activa, especialmente para fibroblastos intestinales [369, 370]. En otras palabras, la inflamación asociada en celíacos durante la fase activa, favorecería la presencia de bajos niveles de ADAMTS-1 que implica aumentos de la proliferación de fibroblastos y cambios en la matriz extracelular, que junto con otras proteínas como la TG2 contribuirían con la patogenia de la enfermedad. Por el contrario, la elevación patológica de ADAMTS-1 inhibe las acciones del FGF en el contexto de la inflamación cuando los estímulos inflamatorios se reducen [368], lo que por un lado detiene la proliferación de células endoteliales y de los fibroblastos, mientras que por otro disminuye indirectamente la formación de vasos sanguíneos. Así, es concebible que ADAMTS-1 actué de la misma manera en celíacos donde durante la dieta sin gluten, cuando el estímulo inflamatorio ha cesado, ADAMTS-1 volvería a aumentar de manera patológica, pudiendo detener la proliferación de los fibroblastos de la mucosa o en los vasos sanguíneos, ejerciendo acciones antiangiogénicas en pro un perfil vascular inhibitorio. En definitiva, ADAMTS-1 es un marcador de diagnóstico precoz de celiaquía, ya que sus niveles aparecen constitutivamente alterados en niños celíacos cuando no incorporan gluten en la dieta. Los niveles de este marcador, son sensibles para distinguir a los celíacos de aquellos en la población que comparte el mismo HLA cuando su concentración en sangre está por encima de 62.4 ng/ml, aunque también es sensible para discriminar la celiaquía frente a población incompatible genéticamente, cuando los niveles de ADAMTS-1 son mayores de 469 ng/ml.

2.2 Limitaciones de nuestro estudio de validación.

Los estudios incluidos en el presente trabajo, ya sean los resultantes de la proteómica o los validados por ELISA en suero, ponen de manifiesto la existencia de al menos 3 marcadores (NRG1- β 1, "Pentraxin-3" y ADAMTS-1), que se encuentran circulantes en la sangre de los celíacos principalmente durante la dieta libre de gluten. A la luz de nuestros resultados, parece que estos marcadores podrían ser útiles en el pronóstico de la celiaquía aun cuando el gluten no se ha incluido en la dieta. Sin embargo, la propia metodología usada en nuestro estudio puede introducir sesgos que conviene descartar, antes de aceptar el uso de dichos marcadores en clínica. Es importante destacar que la incorporación del gluten en la dieta comienza al rededor de los 6 meses de edad. Sin embargo, en nuestros estudios, los niños que comían gluten fueron primeramente diagnosticados de celiaquía, para seguir una dieta sin gluten y es este el periodo donde la concentración de los 3 marcadores fue medida. En este contexto, cabe la posibilidad que la presencia del gluten altere la fisiología de los niños celíacos, que a consecuencia de ello ven los valores de dichos marcadores alterados incluso cuando el gluten ya no está presente en la dieta. De ser así, los marcadores descritos en este trabajo no serían constitutivos de celiaquía, sino una consecuencia de la posible impronta que el gluten pueda dejar. Es importante descartar dicha posibilidad mediante la realización de un estudio prospectivo, donde se estudien los valores de los marcadores en niños antes de la ingestión del gluten (al rededor de 6 meses), para correlacionar su presencia con el posterior desarrollo de la celiaquía.

Aunque un estudio prospectivo, no ha sido realizado aún, durante la toma de muestras para el presente trabajo, el biobanco que suministró las muestras de sangre aquí usadas, también recolectó células endoteliales que derivan de cordones umbilicales de niños en riesgo de padecer celiaquía. A este grupo, pertenecen niños con una relación de parentesco de primer y segundo grado, en familias donde la celiaquía esta presente en varias generaciones. Este material es lo más parecido a muestras que proceden de niños antes de la incorporación del gluten y por consiguiente decidimos analizarlo. De todos los marcadores validados en nuestro estudio, ADAMTS-1 fue el único que mostró un incremento de expresión significativo, cuando comparamos las líneas celulares de bebés de riesgo, frente a los controles. Como resultado del análisis en el suero de celíacos, especialmente durante la dieta sin gluten, (descrito en el apartado de resultados del presente trabajo), los valores de

ADAMTS-1 se encontraron aumentados respecto de los controles. Los resultados aquí mostrados con células endoteliales de bebés de riesgo, apuntan a la idea de que al menos, los valores de ADAMTS-1, podrían encontrarse alterados en la población celiaca de manera constitutiva. Los demás marcadores (TIMP-4, NRG1- β 1 o “Pentraxin-3”), no mostraron diferencias significativas entre los grupos. Aunque la expresión de “Pentraxin-3” apareció muy disminuida en relación con los controles. Estos resultados se han de tomar con cautela por dos motivos. En primer lugar, que un marcador no aparezca aumentado en las células endoteliales de bebés en riesgo de celiaquía, no significa que no sea constitutivo de la población celiaca, ya que los niveles del marcador en sangre se deben a la aportación de diferentes tipos celulares. Por otro lado, no sabemos aún si los niños en alto riesgo de ser celíacos, incluidos en esta fase del estudio, desarrollaran la enfermedad. Aunque sí que es interesante observar, que células procedentes de niños con riesgo de celiaquía que aun no han comido gluten, sobre expresan ADAMTS-1. Sin lugar a dudas, una validación prospectiva, demostrará la relevancia clínica de los descubrimientos aquí descritos.

3. Estudio de “Angiostatin” como marcador de celiaquía.

Aunque los niveles de la proteína “Angiostatin” no se encontraron alterados entre celíacos y controles tras el array de proteómica, algunos estudios preliminares que realizamos mostraron que esta proteína podía estar alterada en los celíacos. Por este motivo, decidimos incluirla en nuestro estudio. La concentración de “Angiostatin” está aumentada en los celíacos durante la fase activa de la enfermedad, para luego caer y hacerse similar a los controles durante la dieta sin gluten, como se mostró en el apartado de resultados. Esto refleja que la “Angiostatin” es una proteína modulada en respuesta al gluten durante la fase activa de la enfermedad.

Si atendemos a su función, la “Angiostatin” es una proteína de 38KD que se escinde a partir del “Plasminogen” hepático, que cuando se activa, se rompe en fragmentos más pequeños en la sangre, del que la “Angiostatin” se correspondería con los aminoácidos entre las posiciones 79 a 466 [371-373]. Desde el punto de vista funcional, esta proteína está relacionada con la inhibición de la angiogénesis, porque afecta a la proliferación, migración o a la capacidad de formar tubos en células endoteliales, mientras que aumenta la apoptosis, o disminuye la permeabilidad de los vasos sanguíneos [373-375]. Sin embargo, estas acciones no son directas, sino que se

realizan, o bien a través de estímulos inflamatorios que alteran la producción de su precursor, "Plasminogen" [376], o mediante una regulación ejercida por las citoquinas. Así, por un lado ciertas citoquinas controlan la expresión de dicha proteína, como se observa tras la inhibición farmacológica de TNF- α en la colitis ulcerosa [377]. O por otro lado, las citoquinas bloquean las acciones anti-angiogénicas de "Angiostatin", como se observa tras la ablación de la IL-12, ya sea por la reducción de su síntesis o de su receptor [378]. Además, el incremento en la "Angiostatin", favorece la síntesis y liberación de citoquinas, donde los macrófagos responden a incrementos de dicha proteína aumentando la liberación de IL-12 [378].

Las acciones de la "Angiostatin" no solo se circunscriben a las citoquinas, ya que presenta otros efectos sobre el componente celular inmunológico. Por ejemplo, aumentos en la producción de "Angiostatin" pueden regular y reducir el número de infiltrados, como se ha observado en ciertos contextos tumorales [379]. Sin embargo, esta regulación no es unidireccional, ya que los niveles de "Angiostatin" afectan a las células inmunológicas, mientras que la actividad de dichas células es responsable de la expresión de la proteína. Este proceso, está muy marcado en los neutrófilos, que generan actividad proteasa, lo que favorece la síntesis de "Angiostatin" [380], mientras que elevados niveles de la proteína inactivan su migración [381]. En su conjunto, lo que todos estos datos reflejan es que la "Angiostatin" actúa como un intermediario entre el sistema inmunológico y la regulación de la angiogénesis, donde los niveles de la proteína ejercen un conjunto de acciones reguladoras, que finalmente se traducen en la alteración de la angiogénesis. Esto puede ser muy relevante durante la celiaquía, especialmente en la fase activa de la enfermedad, donde se observa un incremento en el reclutamiento de neutrófilos [382], lo que explicaría el aumento de la "Angiostatin" observado en nuestro estudio. La elevación serológica de dicha proteína, explicaría a su vez, el incremento de IL-12 observado en la sangre de niños celíacos durante la fase activa [383], que junto con las acciones de la TG2 [269-272], resultarían en los cambios morfológicos encontrados en los vasos sanguíneos de la mucosa digestiva de celíacos [247] durante la fase activa. La eliminación del gluten, suprime los infiltrados de neutrófilos [382], lo que explicaría la disminución de los niveles de "Angiostatin" observados en nuestro estudio y por consiguiente una "normalización" de la estructura vascular digestiva [247] a través de la reducción de la IL-12 [383].

Independientemente de la participación en la patogenia de la enfermedad celiaca por parte de la "Angiostatin", cabe preguntarse si esta proteína podría ser un buen marcador para la identificación de la celiacía. En efecto, de su especificidad y sensibilidad en celíacos durante la fase activa mostró valores de más de 95% lo que determina que la "Angiostatin" es un buen marcador en la determinación de la celiacía para niños donde el gluten ya está incorporado en la dieta. Todo esto, especialmente cuando se sobrepasa el valor umbral de 230.6 ng/ml, por encima del cual ya podemos decir que el niño se encuentra en la fase aguda de la enfermedad. Además, como ya se mostró en los resultados, si se abandona el gluten, los niveles de la "Angiostatin" se reducirían progresivamente y se encontrarían por debajo de 253 ng/ml. En otras palabras, esto sería indicativo de la remisión para un celíaco. Sin embargo, para que este marcador sea útil en el diagnóstico de la celiacía de fase aguda, su elevación debe ser anterior a la presencia de los títulos de anticuerpos, que aparecen en la sangre de los celíacos y que se usan de rutina en el diagnóstico. Recordemos que existe un desfase entre la incorporación del gluten en la dieta y la presencia de títulos detectables de anticuerpos en la sangre de los pacientes, lo que dificulta el diagnóstico. Es importante, por lo tanto, determinar si los niveles de "Angiostatin" se encuentran elevados en la sangre antes de la detección de los anticuerpos anti-TG2 o EMA. Algunas evidencias, apuntan a la idea de que los niveles de "Angiostatin" se elevarían rápidamente en los estadios iniciales de la enfermedad. Así, la expresión de esta proteína se incrementa como consecuencia de la actividad inmunológica innata, lo que evidencia que los niveles de "Angiostatin" circulantes aparezcan probablemente, mucho antes de que se puedan detectar los anticuerpos típicos de celiacía, ya que éstos son un producto de la inmunidad adquirida. Aunque en nuestro estudio no se ha determinado el momento de la elevación de "Angiostatin" en relación con la aparición de anticuerpos EMA o anti-TG2, lo que si sabemos, es que la presencia de ambos marcadores obedece a procesos independiente. En efecto, cuando enfrentamos los valores de "Angiostatin" con los niveles de anticuerpos en la sangre de los niños celíacos incluidos en nuestro estudio, no encontramos una correlación significativa entre ambos. Tampoco encontramos una correlación, en relación con el sexo o la edad. Además, observamos que aquellos niños celíacos que tienen niveles de anticuerpos más bajos o más elevados, no presentaban ningún perfil distintivo concomitante para "Angiostatin". En otras palabras, los niveles del marcador, se modulan

independientemente de la presencia o ausencia de los anticuerpos típicos de celiaquía, lo que parece apuntar a la hipótesis de que “Angiostatin” pudiera servir como marcador de fases iniciales de la enfermedad, cuando el gluten se acaba de introducir en la dieta. Sin lugar a dudas, estudios posteriores a la presente tesis, serán necesarios para determinar en que momento de la enfermedad los niveles de “Angiostatin” se elevan en la sangre respecto del título de anticuerpos. Otra posible aplicación, de la elevación de “Angostatin” en la sangre, podría ser el seguimiento de los pacientes que siguen una dieta sin gluten. Recordemos que niveles de “Angiostatin” en celíacos por debajo de 253 ng/ml son indicativos de una adherencia correcta a la dieta sin gluten. Esta evaluación, podría ser de especial interés en aquellos casos atípicos donde el título de anticuerpos no está bien definido.

4. Implicaciones de nuestro estudio.

4.1 Implicaciones diagnósticas.

De todos los potenciales marcadores encontrados inicialmente en nuestro estudio, la NRG1- β 1, “Pentraxin-3”, ADAMTS-1 y “Angiostatin” mostraron resultados consistentes y útiles en la identificación de los celíacos especialmente cuando el gluten no está presente. Además salvo para “Pentraxin-3”, todos los marcadores aquí encontrados, no han sido descritos anteriormente para la celiaquía, y por tanto constituyen una herramienta muy novedosa especialmente en el diagnóstico. De acuerdo con los resultados obtenidos en la fase clínica de nuestro estudio, ambas proteínas, ADAMTS-1 y “Angiostatin”, son marcadores tremendamente sensibles y específicos para la identificación de los celíacos.

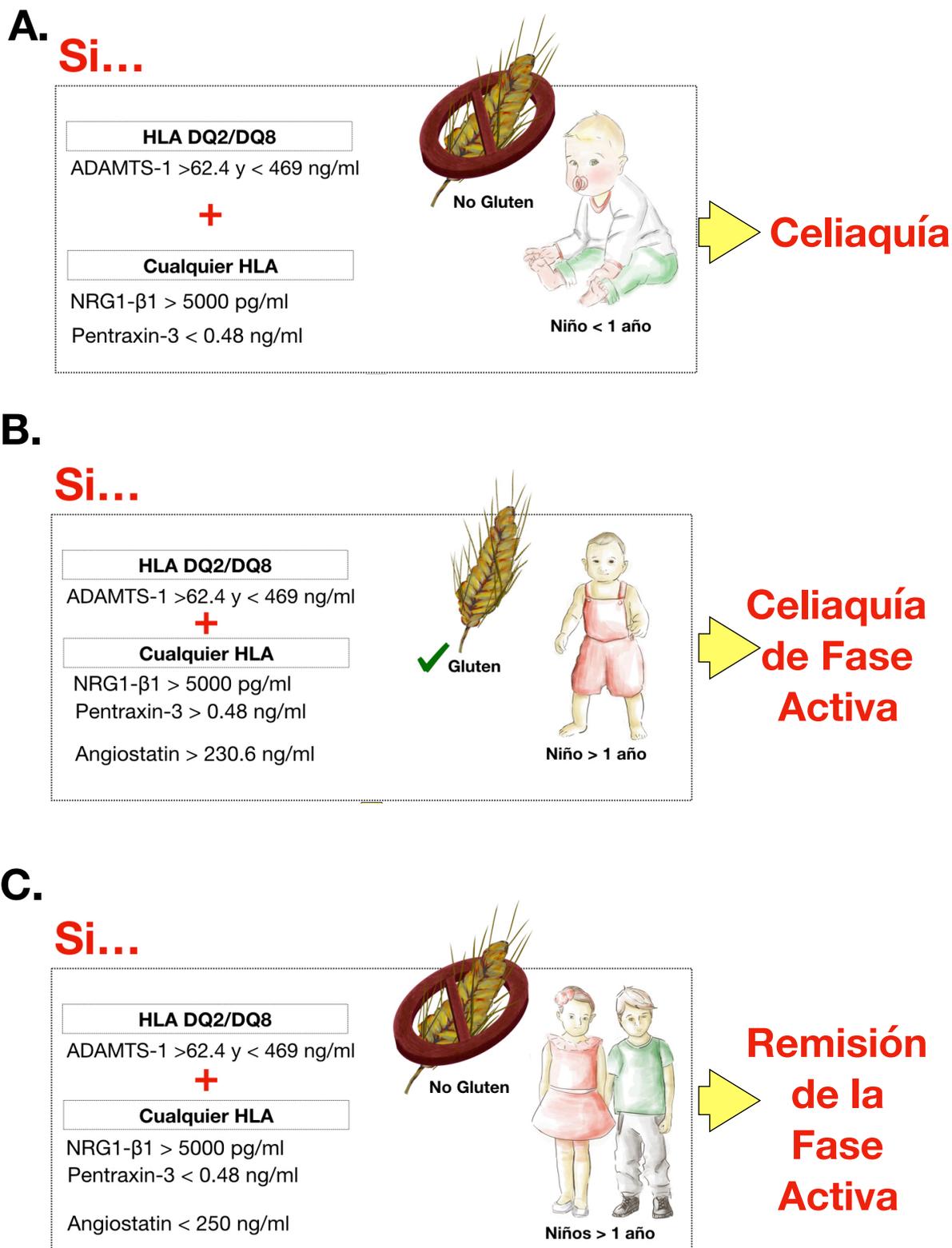
Es interesante destacar, que ADAMTS-1 es un marcador de los celíacos especialmente cuando el gluten no está presente, y por tanto es útil para la identificación de la enfermedad, antes de la incorporación del gluten. Este marcador, aparece aumentado frente a los individuos que no son celíacos pero que son genéticamente compatibles, recordemos que el DQ2/DQ8 del HLA aparece en todos los celíacos pero también se comparte con otro 30% de la población sana. Como los niveles de ADAMTS-1 son específicos de celiaquía, sus valores pueden ser usados para discriminar quienes son celíacos de los que no lo son, incluso cuando comparten la misma genética DQ2 o DQ8. En otras palabras, esta proteína podría usarse para discriminar en ese 30% de la población genéticamente compatible, quienes realmente

padecen la enfermedad. A su vez, los niveles de este marcador pueden ser complementados, simultáneamente con "Pentraxin-3", ya que esta proteína está disminuida durante la dieta sin gluten, y ambas medidas pueden incrementar la sensibilidad del diagnóstico. Además, como los niveles de "Pentraxin-3" son distintivos de los celíacos que no comen gluten frente a controles, independientemente del HLA, esta medida complementa a la de ADAMTS-1, que si es específica del HLA. Otra combinación posible, es la identificación de ADAMTS-1 junto con NRG1- β 1, ya que esta última proteína aparece aumentada en el suero de niños celíacos independientemente del estado de la enfermedad, y difiere de los valores de los controles independientemente de si son o no genéticamente compatibles. A su vez, esta proteína es muy sensible para la identificación de la celiaquía, especialmente en un 40% de los pacientes que se corresponden con niños de edades más tempranas, donde, la NRG1- β 1 aparece muy elevada. Una de las limitaciones en el uso de ADAMTS-1, es que es una proteína muy eficaz para discriminar la celiaquía, pero principalmente en una población genéticamente compatible. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, su combinación con "Pentraxin-3" y con NRG1- β 1, especialmente si los valores de esta última están por encima de 5000 pg/ml, puede facilitar la identificación de niños celíacos frente a cualquier población tenga o no el HLA compatible. En otras palabras, la identificación de ADAMTS-1 junto con NRG1- β 1 y "Pentraxin-3", podría estar indicada para discriminar aquellos casos de niños que no tienen una genética compatible de la celiaquía, sin necesidad de hacer un test genético.

Finalmente, la "Angiostatin" aparece aumentada exclusivamente en niños celíacos que comen gluten. Por tanto, a la luz de nuestros resultados, "Angiostatin" constituye un marcador de fase activa, es decir, cuando se incorpora gluten en la dieta y sería un complemento de ADAMTS-1 junto con los otros dos marcadores. En este caso, la combinación de ADAMTS-1, NRG1- β 1 y "Angiostatin" podría facilitar el diagnóstico de niños celíacos cuando el gluten está presente en la dieta. Esta identificación sería útil, especialmente en fases iniciales, donde no necesariamente existe un cuadro clínico y los marcadores serológicos usados, no son aun detectables. Sin embargo, tras la eliminación del gluten, la combinación de "Pentraxin-3" y "Angiostatin" facilitaría el seguimiento de la recuperación durante las fases iniciales de la dieta sin gluten. La

figura 16 muestra un algoritmo diagnóstico donde se describen los posibles escenarios de usos de los marcadores, en relación con la presencia o ausencia del gluten en la dieta.

Figura16. Algoritmo diagnóstico donde se describen los posibles usos de los marcadores de acuerdo con la edad del paciente, así como la presencia del gluten en la dieta y del genotipo HLA compatible o no con la celiacía. Dibujos realizados por Art Keepers (usado con permiso).



4.2 Implicaciones en la patogenia y tratamiento de los celíacos.

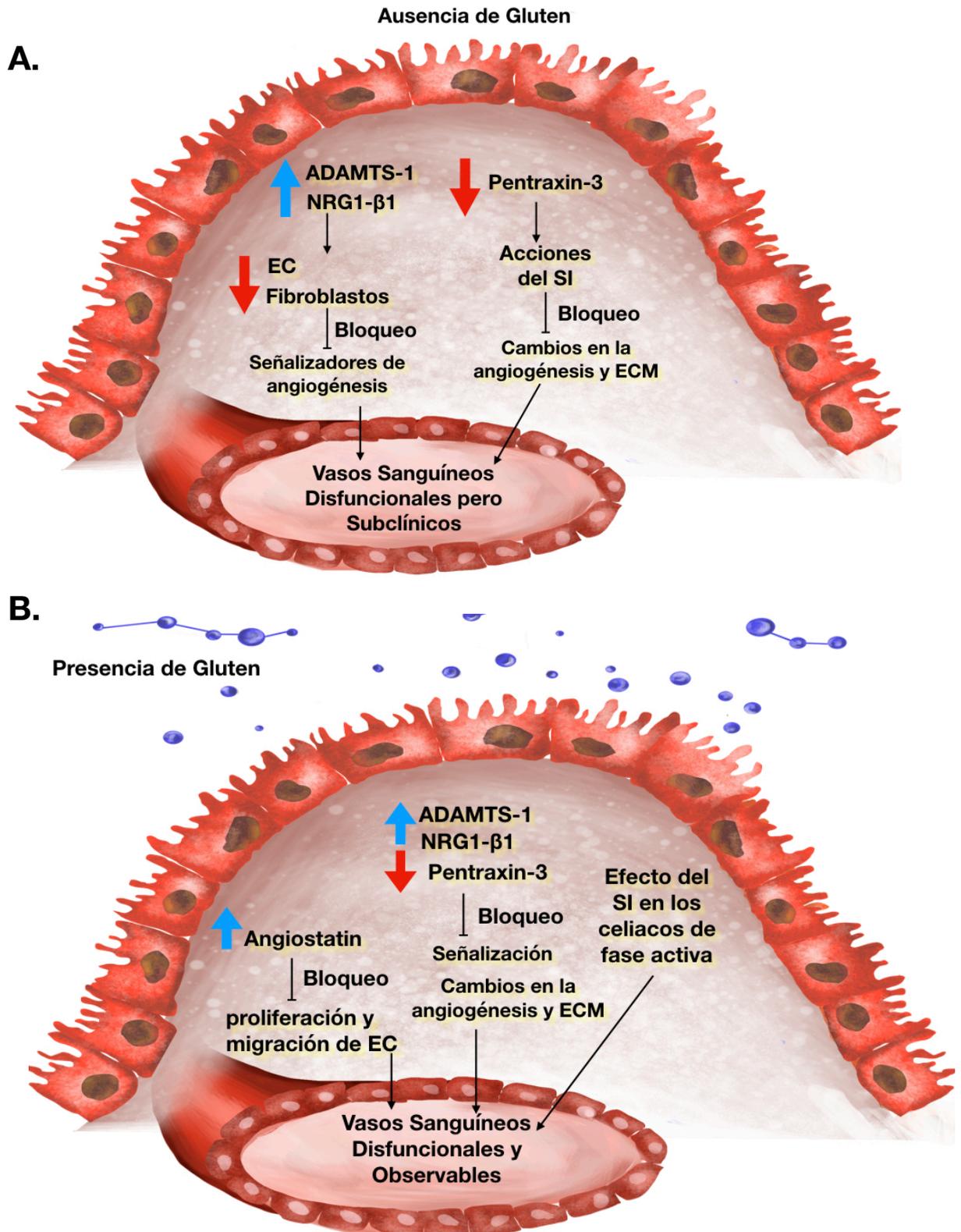
Otro hecho importante que se desprende de nuestros resultados, es la existencia de un perfil vascular concreto y característico de la celiaquía. Para entender la repercusión de dicho perfil, conviene recordar algunos hechos relacionados con la formación de los vasos sanguíneos. La angiogénesis se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los pre-existentes. En condiciones fisiológicas, el proceso de formación de estos vasos, está determinado por una serie de pasos regulados por potentes moléculas de señalización. El proceso angiogénico está regulado en primera instancia por agentes, químicos, mecánicos o biológicos que controlan el inicio de una cascada compleja de acontecimientos [384]. Como la mayoría de los vasos sanguíneos, se encuentran localizados en la membrana basal de los tejidos [385], el primer paso del proceso de angiogénesis conlleva la modificación de la unión de las células en el tejido, así como del soporte donde se localizan. Por un lado, las células endoteliales pierden su capacidad de unirse entre sí [386], mientras que las células en el estroma, como los fibroblastos, macrófagos, neutrófilos y otros tipos celulares, son activados lo que favorece el comportamiento de movilidad y de proliferación de las células endoteliales [387]. En paralelo, la matriz extracelular es degradada y así se altera su composición, todo ello mediante la actividad de diferentes enzimas, como la TG2. Entonces, el perfil modificado de fibronectina, colágeno, o laminina favorece la interacción con determinadas integrinas que en última instancia regulan la motilidad y la diferenciación de las células endoteliales [388, 389]. La nueva rama vascular que, por tanto, está en formación, implica la diferenciación de las células endoteliales en células “tip” que tienen una capacidad de movilidad importante [390], entonces, el fenotipo de las células “tip” cambia a “stalk” y por tanto adquieren un fenotipo proliferativo, donde se forma el lumen del vaso y en última instancia se genera un nicho donde la sangre puede circular [391]. Sin embargo, este proceso angiogénico que ocurre en condiciones fisiológicas, adquiere relevancia especialmente durante la inflamación crónica y la autoinmunidad [392]. Así, los marcadores encontrados en nuestro estudio, además de describir una regulación vascular diferente en celíacos frente a otros grupos de población, determinarían su potencial implicación en el desarrollo de un perfil anti-angiogénico.

En efecto, niveles elevados de ADAMTS-1, como los observados en celíacos, reducirían la proliferación de células endoteliales y de fibroblastos, lo que conlleva una

disminución de las moléculas señalizadoras del proceso angiogénico [364, 365] y además alteraría la estructura de la matriz extracelular [363]. Todas estas acciones podrían verse potenciadas por una potencial insensibilidad a los niveles de NRG1- β 1 o las variaciones de la "Pentraxin-3", que en última instancia afectan a las células endoteliales, fibroblastos, células inmunológicas y a su capacidad de orquestar la cascada angiogénica [307, 332, 349-352]. Dichas diferencias permanecerían subclínicas, ya que según se observa, los vasos sanguíneos en celíacos durante la dieta sin gluten son "normales" en morfología y función y similares a los controles [247]. Sin embargo, cuando el gluten está presente, la "Angiostatin" aumenta, lo que tendría un efecto inhibitorio en la proliferación y migración de células endoteliales o la capacidad de formar vasos [373-375], y esto se sumaría a los incrementos de "Pentraxin-3" o a los niveles constitutivos ya existentes para ADAMTS-1 y NRG1- β 1, afectando en su conjunto a la función y morfología de los vasos sanguíneos encontrados en el celíaco durante la fase aguda [247]. Todas estas variaciones se resumen en la figura 17.

Cabe destacar, que todos los cambios descritos se realizan frente a una modulación mediada por el gluten, donde esta proteína, activaría la cascada de autoinmunidad en individuos con el perfil inmunológico correcto (determinado entre otros factores por el HLA DQ2 y DQ8). Y en este contexto, el fenotipo vascular tendría que ser también uno concreto, específico y distintivo de los celíacos. En otras palabras, el gluten de la dieta solo puede producir enfermedad celíaca, cuando la persona tiene el perfil inmunológico correcto, concomitante con un perfil angiogénico concreto. Esta idea está reforzada, por el hecho de que no todos los que presentan un HLA DQ2 o DQ8 (que es propio de celiaquía) son de hecho celíacos. Recordemos que entre el 30 y el 40% de la población son positivos para el HLA, de los que como máximo un tercio desarrollaran la celiaquía, que curiosamente ocurre en aquellos que tienen el perfil angiogénico descrito en el presente trabajo. Los resultados aquí mostrados, avalarían la presencia de eventos vasculares que son independientes aunque están relacionados entre sí. Por un lado, una inhibición vascular silenciosa que ocurre en el celíaco cuando no come gluten, y por otro lado una serie de defectos vasculares inhibitorios que se manifiestan cuando el gluten está presente. Éstos últimos, se originarían como consecuencia de la presencia de anticuerpos anti-TG2, de la inflamación crónica y de otros factores que ya han sido discutidos anteriormente en el presente trabajo.

Figura 17. Cuadro donde se resume el papel de los nuevos marcadores en la patogenia de la enfermedad a través de una modificación constitutiva de los vasos sanguíneos en el celiaco. El panel **A** muestra las modificaciones de los vasos cuando el gluten no está presente y por tanto los vasos son disfuncionales, aunque dicha característica permanece subclínica. El panel **B** represente la cascada de eventos ocurridos cuando el gluten está presente donde la enfermedad se origina por la presencia de un genotipo/fenotipo inmunológico adecuado concomitante a un genotipo/fenotipo vascular concreto. EC- célula endotelial, SI- sistema inmunológico, ECM- matriz extracelular. Dibujos realizados por Art Keepers (usado con permiso).



A la luz de nuestro resultados, la celiaquía se originaría por la presencia de un perfil angiogénico inhibitorio diferencial y constitutivo del celiaco que no es consecuencia sino la causa en el devenir de la enfermedad, junto con un sistema inmunológico propio de la celiaquía. Este hecho, no sólo está avalado con los resultados mostrados en el presente trabajo, sino también con datos publicados recientemente, donde los niveles de una proteína anti-angiogénica, (“Pigment Epithelium-Derived Factor”), se encuentran aumentados en población celiaca adulta independientemente de la presencia o ausencia del gluten, y por tanto del efecto regulatorio de los vasos sanguíneos que pudiera tener la inflamación crónica y los anticuerpos anti-TG2 [393]. En otros contextos de enfermedad autoinmunitaria digestiva como es la enfermedad inflamatoria intestinal, la mucosa de estos pacientes presenta un incremento en los vasos sanguíneos, que expresan marcadores concretos constitutivos, como son ciertas integrinas [394]. Mientras que otros intermediarios de la respuesta angiogénica se expresan como consecuencia de la agresividad de la enfermedad [395]. En estos pacientes, por un lado la inflamación crónica mediada por citoquinas [396, 397] y un componente inmunológico alterado [398-400] favorecerían la aparición de un perfil vascular característico. Sin embargo, los vasos sanguíneos alterados constitutivamente, mediante variaciones en su permeabilidad o en el transporte y difusión de nutrientes y factores de crecimiento, son la causa detrás de la inflamación exacerbada o de la autoinmunidad inflamatoria [396, 401], y por tanto están directamente vinculados con la patogenia. En otras palabras, existiría una regulación patológica de la angiogenesis propia de la actividad de la enfermedad, simultáneamente a un perfil vascular propio del grupo poblacional que padece la enfermedad y sin el cual la propia enfermedad no se desarrollaría. A la luz de todos los resultados aquí mostrados, hipotetizamos la posibilidad de que el tipo de vasos sanguíneos en los celiacos, sea causa y al mismo tiempo efecto y por consiguiente, si no existe el componente inmune propio del celiaco, ni el vascular adecuado, la persona no desarrollará la celiaquía, aunque el gluten esté presente en la dieta. Por último, la hipótesis del perfil angiogénico, como una de las causas de la celiaquía junto con el perfil inmunológico, abre un capítulo muy interesante, no sólo en la identificación y patogenia de la enfermedad, sino en su tratamiento. En efecto, diferentes fármacos han sido descritos para aumentar los vasos sanguíneos modulando algunos de los intermediarios antiangiogénicos encontrados en nuestro estudio, como

las estatistas para “Angioestatin” [402] o las catequinas para reducir los niveles de ADAMTS-1 [403]. Sin lugar a dudas, estudios posteriores al presente trabajo, están garantizados para esclarecer el papel fascinante del perfil vascular en los celíacos y encontrar aplicaciones en el diagnóstico y por qué no, en el tratamiento de estos pacientes.

6. Conclusiones

1. Los celíacos presentan un perfil diferencial relacionado con los vasos sanguíneos, independientemente de la presencia del gluten en la dieta. Este perfil diferencial es constitutivo de la población celiaca. A su vez, dicho perfil, que coincide con un fenotipo antiangiogénico, implica la sobre expresión y disminución de diferentes proteínas relacionadas con los vasos sanguíneos.
2. Los niveles de ADAMTS-1, NRG-1 β 1 aparecen alterados constitutivamente en los celíacos y muestran valores de sensibilidad y especificidad muy elevados en fases clínicas 2 y 3, lo que los hace ser buenos candidatos para la identificación de la celiaquía en niños cuando el gluten no está presente en la dieta. Otros marcadores como "Pentraxin-3" o "Angiostatin" pueden ser complementarios en la identificación del celíaco y más útiles en casos donde el gluten esté introducido o en el seguimiento de los pacientes durante la dieta sin gluten y la remisión de la fase activa de la celiaquía.

7. Bibliografía

1. FAO, How To feed the world 2050. 2013: Rome.
2. Young, E., et al., A population study of food intolerance. *Lancet*, 1994. **343**(8906): p. 1127-30.
3. Zopf, Y., et al., *The differential diagnosis of food intolerance*. *Dtsch Arztebl Int*, 2009. **106**(21): p. 359-69; quiz 369-70; 4 p following 370.
4. Gupta, R., et al., Time trends in allergic disorders in the UK. *Thorax*, 2007. **62**(1): p. 91-6.
5. Hadley, C., Food allergies on the rise? Determining the prevalence of food allergies, and how quickly it is increasing, is the first step in tackling the problem. *EMBO Rep*, 2006. **7**(11): p. 1080-3.
6. Long, K.H., et al., The economics of coeliac disease: a population-based study. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010. **32**(2): p. 261-9.
7. Roser, M. and H. Ritchie, *Yields and Land Use in Agriculture*. 2018, OurWorldInData.org.
8. Elmadfa I, A.W., Muskat E, Fritzsche D, Cremer HD,, *Die grosse GU Nährwert Tabelle*. 1998, Munich: Gräfe and Unzer GmbH.
9. Biesiekierski, J.R., *What is gluten?* *J Gastroenterol Hepatol*, 2017. **32 Suppl 1**: p. 78-81.
10. Wieser, H., Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol*, 2007. **24**(2): p. 115-9.
11. Anand, B.S., J. Piris, and S.C. Truelove, The role of various cereals in coeliac disease. *Q J Med*, 1978. **47**(185): p. 101-110.
12. Pinto-Sanchez, M.I., et al., Safety of Adding Oats to a Gluten-Free Diet for Patients With Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis of Clinical and Observational Studies. *Gastroenterology*, 2017. **153**(2): p. 395-409 e3.
13. Euromonitor, *Bread, Cakes and Pastries: A Global Market Overview*. 2014, Euromonitor.
14. Hoppe, C., et al., Intake and sources of gluten in 20- to 75-year-old Danish adults: a national dietary survey. *Eur J Nutr*, 2017. **56**(1): p. 107-117.
15. Shewry, P.R., *Wheat*. *J Exp Bot*, 2009. **60**(6): p. 1537-53.
16. Lohi, S., et al., Increasing prevalence of coeliac disease over time. *Aliment Pharmacol Ther*, 2007. **26**(9): p. 1217-25.
17. Kondrashova, A., et al., Lower economic status and inferior hygienic environment may protect against celiac disease. *Ann Med*, 2008. **40**(3): p. 223-31.
18. Kucek, L., et al., *A Grounded Guide to Gluten: How Modern Genotypes and Processing Impact Wheat Sensitivity*. *ComprehensiveReviewsinFoodScienceandFoodSafety*, 2015. **14**: p. 285-302.
19. Anderson, R.P., et al., In vivo antigen challenge in celiac disease identifies a single transglutaminase-modified peptide as the dominant A-gliadin T-cell epitope. *Nat Med*, 2000. **6**(3): p. 337-42.

20. Arentz-Hansen, H., et al., The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med*, 2000. **191**(4): p. 603-12.
21. Hausch, F., et al., Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002. **283**(4): p. G996-G1003.
22. Fasano, A., et al., Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet*, 2000. **355**(9214): p. 1518-9.
23. Madara, J.L. and J.S. Trier, Structural abnormalities of jejunal epithelial cell membranes in celiac sprue. *Lab Invest*, 1980. **43**(3): p. 254-61.
24. Drago, S., et al., Gliadin, zonulin and gut permeability: Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol*, 2006. **41**(4): p. 408-19.
25. Rauhavirta, T., et al., Epithelial transport and deamidation of gliadin peptides: a role for coeliac disease patient immunoglobulin A. *Clin Exp Immunol*, 2011. **164**(1): p. 127-36.
26. Sander, G.R., et al., Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. *FEBS Lett*, 2005. **579**(21): p. 4851-5.
27. Maiuri, L., et al., Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet*, 2003. **362**(9377): p. 30-7.
28. Qiao, S.W., 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**(3): p. 1757-62.
29. Shan, L., et al., Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science*, 2002. **297**(5590): p. 2275-9.
30. Camarca, A., et al., Intestinal T cell responses to gluten peptides are largely heterogeneous: implications for a peptide-based therapy in celiac disease. *J Immunol*, 2009. **182**(7): p. 4158-66.
31. Dicke, W.K., H.A. Weijers, and J.H. Van De Kamer, Coeliac disease. II. The presence in wheat of a factor having a deleterious effect in cases of coeliac disease. *Acta Paediatr*, 1953. **42**(1): p. 34-42.
32. Van De Kamer, J.H., H.A. Weijers, and W.K. Dicke, Coeliac disease. IV. An investigation into the injurious constituents of wheat in connection with their action on patients with coeliac disease. *Acta Paediatr*, 1953. **42**(3): p. 223-31.
33. Maki, M., O. Hallstrom, and A. Marttinen, Reaction of human non-collagenous polypeptides with coeliac disease autoantibodies. *Lancet*, 1991. **338**(8769): p. 724-5.

34. Di Sabatino, A., et al., Epithelium derived interleukin 15 regulates intraepithelial lymphocyte Th1 cytokine production, cytotoxicity, and survival in coeliac disease. *Gut*, 2006. **55**(4): p. 469-77.
35. Hue, S., et al., A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity*, 2004. **21**(3): p. 367-77.
36. Maiuri, L., et al., IL-15 drives the specific migration of CD94+ and TCR-gammadelta+ intraepithelial lymphocytes in organ cultures of treated celiac patients. *Am J Gastroenterol*, 2001. **96**(1): p. 150-6.
37. Iacomino, G., et al., Celiac disease: role of intestinal compartments in the mucosal immune response. *Mol Cell Biochem*, 2016. **411**(1-2): p. 341-9.
38. Maiuri, L., et al., Interleukin 15 mediates epithelial changes in celiac disease. *Gastroenterology*, 2000. **119**(4): p. 996-1006.
39. Mention, J.J., et al., Interleukin 15: a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology*, 2003. **125**(3): p. 730-45.
40. Meresse, B., et al., Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity*, 2004. **21**(3): p. 357-66.
41. Meresse, B., et al., Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunol*, 2009. **2**(1): p. 8-23.
42. Han, A., et al., Dietary gluten triggers concomitant activation of CD4+ and CD8+ alphabeta T cells and gammadelta T cells in celiac disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(32): p. 13073-8.
43. Jarvinen, T.T., et al., Intraepithelial lymphocytes in celiac disease. *Am J Gastroenterol*, 2003. **98**(6): p. 1332-7.
44. Abadie, V., V. Discepolo, and B. Jabri, Intraepithelial lymphocytes in celiac disease immunopathology. *Semin Immunopathol*, 2012. **34**(4): p. 551-66.
45. Jabri, B. and E. Ebert, Human CD8+ intraepithelial lymphocytes: a unique model to study the regulation of effector cytotoxic T lymphocytes in tissue. *Immunol Rev*, 2007. **215**: p. 202-14.
46. Nilsen, E.M., et al., Gluten induces an intestinal cytokine response strongly dominated by interferon gamma in patients with celiac disease. *Gastroenterology*, 1998. **115**(3): p. 551-63.
47. Abadie, V. and B. Jabri, IL-15: a central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunol Rev*, 2014. **260**(1): p. 221-34.
48. Kasaian, M.T., et al., IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity. *Immunity*, 2002. **16**(4): p. 559-69.

49. Korneychuk, N., et al., Interleukin 15 and CD4(+) T cells cooperate to promote small intestinal enteropathy in response to dietary antigen. *Gastroenterology*, 2014. **146**(4): p. 1017-27.
50. Meresse, B., G. Malamut, and N. Cerf-Bensussan, *Celiac disease: an immunological jigsaw*. *Immunity*, 2012. **36**(6): p. 907-19.
51. Monteleone, G., et al., Role of interferon alpha in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease. *Gut*, 2001. **48**(3): p. 425-9.
52. Perera, L., et al., Expression of nonclassical class I molecules by intestinal epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis*, 2007. **13**(3): p. 298-307.
53. Bruce, S.E., I. Bjarnason, and T.J. Peters, Human jejunal transglutaminase: demonstration of activity, enzyme kinetics and substrate specificity with special relation to gliadin and coeliac disease. *Clin Sci (Lond)*, 1985. **68**(5): p. 573-9.
54. Piper, J.L., G.M. Gray, and C. Khosla, High selectivity of human tissue transglutaminase for immunoactive gliadin peptides: implications for celiac sprue. *Biochemistry*, 2002. **41**(1): p. 386-93.
55. Molberg, O., et al., Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med*, 1998. **4**(6): p. 713-7.
56. van de Wal, Y., et al., Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity. *J Immunol*, 1998. **161**(4): p. 1585-8.
57. Di Niro, R., et al., High abundance of plasma cells secreting transglutaminase 2-specific IgA autoantibodies with limited somatic hypermutation in celiac disease intestinal lesions. *Nat Med*, 2012. **18**(3): p. 441-5.
58. Iversen, R., et al., Igs as Substrates for Transglutaminase 2: Implications for Autoantibody Production in Celiac Disease. *J Immunol*, 2015. **195**(11): p. 5159-68.
59. Mäki, M., Autoantibodies as markers of autoimmunity in coeliac disease pathogenesis, in *Gastrointestinal immunology and gluten-sensitive disease*, C Feighery and C. O'Farrelly, Editors. 1994, Oak Tree Press: Dublin.
60. Sollid, L.M., et al., Autoantibodies in coeliac disease: tissue transglutaminase--guilt by association? *Gut*, 1997. **41**(6): p. 851-2.
61. Congia, M., et al., A high frequency of the A30, B18, DR3, DRw52, DQw2 extended haplotype in Sardinian celiac disease patients: further evidence that disease susceptibility is conferred by DQ A1*0501, B1*0201. *Tissue Antigens*, 1992. **39**(2): p. 78-83.
62. Karell, K., et al., HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol*, 2003. **64**(4): p. 469-77.
63. Sollid, L.M., et al., Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer. *J Exp Med*, 1989. **169**(1): p. 345-50.

64. Castellanos-Rubio, A., et al., A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease. *Science*, 2016. **352**(6281): p. 91-5.
65. Gutierrez-Achury, J., et al., Fine mapping in the MHC region accounts for 18% additional genetic risk for celiac disease. *Nat Genet*, 2015. **47**(6): p. 577-8.
66. Hadithi, M., et al., Accuracy of serologic tests and HLA-DQ typing for diagnosing celiac disease. *Ann Intern Med*, 2007. **147**(5): p. 294-302.
67. Karhus, L.L., et al., The distribution of HLA DQ2 and DQ8 haplotypes and their association with health indicators in a general Danish population. *United European Gastroenterol J*, 2018. **6**(6): p. 866-878.
68. Lebwohl, B., et al., *Diagnosis of celiac disease*. *Gastrointest Endosc Clin N Am*, 2012. **22**(4): p. 661-77.
69. Sollid, L.M. and E. Thorsby, The primary association of celiac disease to a given HLA-DQ alpha/beta heterodimer explains the divergent HLA-DR associations observed in various Caucasian populations. *Tissue Antigens*, 1990. **36**(3): p. 136-7.
70. Dogan, Y., S. Yildirmaz, and I.H. Ozercan, Prevalence of celiac disease among first-degree relatives of patients with celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012. **55**(2): p. 205-8.
71. Ploski, R., et al., On the HLA-DQ(alpha 1*0501, beta 1*0201)-associated susceptibility in celiac disease: a possible gene dosage effect of DQB1*0201. *Tissue Antigens*, 1993. **41**(4): p. 173-7.
72. Rubio-Tapia, A., et al., Predictors of family risk for celiac disease: a population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2008. **6**(9): p. 983-7.
73. Kuja-Halkola, R., et al., Heritability of non-HLA genetics in coeliac disease: a population-based study in 107 000 twins. *Gut*, 2016. **65**(11): p. 1793-1798.
74. Ivarsson, A., et al., Epidemic of coeliac disease in Swedish children. *Acta Paediatr*, 2000. **89**(2): p. 165-71.
75. Lionetti, E., et al., Introduction of gluten, HLA status, and the risk of celiac disease in children. *N Engl J Med*, 2014. **371**(14): p. 1295-303.
76. Vriezinga, S.L., et al., Randomized feeding intervention in infants at high risk for celiac disease. *N Engl J Med*, 2014. **371**(14): p. 1304-15.
77. Andren Aronsson, C., et al., Effects of Gluten Intake on Risk of Celiac Disease: A Case-Control Study on a Swedish Birth Cohort. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2016. **14**(3): p. 403-409 e3.
78. Crespo-Escobar, P., et al., The role of gluten consumption at an early age in celiac disease development: a further analysis of the prospective PreventCD cohort study. *Am J Clin Nutr*, 2017. **105**(4): p. 890-896.
79. Marild, K., et al., Antibiotic exposure and the development of coeliac disease: a nationwide case-control study. *BMC Gastroenterol*, 2013. **13**: p. 109.

80. Riddle, M.S., et al., Pathogen-specific risk of celiac disease following bacterial causes of foodborne illness: a retrospective cohort study. *Dig Dis Sci*, 2013. **58**(11): p. 3242-5.
81. Stene, L.C., et al., Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *Am J Gastroenterol*, 2006. **101**(10): p. 2333-40.
82. Stordal, K., et al., Association between maternal iron supplementation during pregnancy and risk of celiac disease in children. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2014. **12**(4): p. 624-31 e1-2.
83. Marild, K., et al., Pregnancy outcome and risk of celiac disease in offspring: a nationwide case-control study. *Gastroenterology*, 2012. **142**(1): p. 39-45 e3.
84. Nadal, I., et al., Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *J Med Microbiol*, 2007. **56**(Pt 12): p. 1669-74.
85. Nistal, E., et al., Differences in faecal bacteria populations and faecal bacteria metabolism in healthy adults and celiac disease patients. *Biochimie*, 2012. **94**(8): p. 1724-9.
86. Olivares, M., et al., Increased prevalence of pathogenic bacteria in the gut microbiota of infants at risk of developing celiac disease: The PROFICEL study. *Gut Microbes*, 2018. **9**(6): p. 551-558.
87. Olivares, M., et al., The HLA-DQ2 genotype selects for early intestinal microbiota composition in infants at high risk of developing coeliac disease. *Gut*, 2015. **64**(3): p. 406-17.
88. Liu, E., et al., Risk of pediatric celiac disease according to HLA haplotype and country. *N Engl J Med*, 2014. **371**(1): p. 42-9.
89. Rewers, M., Epidemiology of celiac disease: what are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease? *Gastroenterology*, 2005. **128**(4 Suppl 1): p. S47-51.
90. Bingley, P.J., et al., Undiagnosed coeliac disease at age seven: population based prospective birth cohort study. *BMJ*, 2004. **328**(7435): p. 322-3.
91. Visakorpi, J.K. and M. Maki, Changing clinical features of coeliac disease. *Acta Paediatr Suppl*, 1994. **83**(395): p. 10-3.
92. Young, W.F. and E.M. Pringle, 110 children with coeliac disease, 1950-1969. *Arch Dis Child*, 1971. **46**(248): p. 421-36.
93. Kivela, L., et al., Presentation of Celiac Disease in Finnish Children Is No Longer Changing: A 50-Year Perspective. *J Pediatr*, 2015. **167**(5): p. 1109-15 e1.
94. Ludvigsson, J.F., et al., Coeliac disease and risk of mood disorders--a general population-based cohort study. *J Affect Disord*, 2007. **99**(1-3): p. 117-26.
95. Rashid, M., et al., Celiac disease: evaluation of the diagnosis and dietary compliance in Canadian children. *Pediatrics*, 2005. **116**(6): p. e754-9.

96. Zis, P., T. Julian, and M. Hadjivassiliou, Headache Associated with Coeliac Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 2018. **10**(10).
97. Al-Bawardy, B., et al., Celiac disease: a clinical review. *Abdom Radiol (NY)*, 2017. **42**(2): p. 351-360.
98. Telega, G., T.R. Bennet, and S. Werlin, Emerging new clinical patterns in the presentation of celiac disease. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 2008. **162**(2): p. 164-8.
99. Sanders, D.S., et al., A primary care cross-sectional study of undiagnosed adult coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2003. **15**(4): p. 407-13.
100. Skowera, A., et al., High prevalence of serum markers of coeliac disease in patients with chronic fatigue syndrome. *J Clin Pathol*, 2001. **54**(4): p. 335-6.
101. Halfdanarson, T.R., M.R. Litzow, and J.A. Murray, *Hematologic manifestations of celiac disease*. *Blood*, 2007. **109**(2): p. 412-21.
102. Bonamico, M., et al., [Hepatic damage in celiac disease in children]. *Minerva Pediatr*, 1986. **38**(21): p. 959-62.
103. Novacek, G., et al., Prevalence and clinical importance of hypertransaminasaemia in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1999. **11**(3): p. 283-8.
104. Bendl, B.J. and P.B. Williams, Histopathological changes in the jejunal mucosa in dermatitis herpetiformis. *Can Med Assoc J*, 1968. **98**(12): p. 575-7.
105. Collin, P., et al., High incidence and prevalence of adult coeliac disease. Augmented diagnostic approach. *Scand J Gastroenterol*, 1997. **32**(11): p. 1129-33.
106. Abenavoli, L., et al., Cutaneous manifestations in celiac disease. *World J Gastroenterol*, 2006. **12**(6): p. 843-52.
107. Rodrigo, L., et al., Cutaneous and Mucosal Manifestations Associated with Celiac Disease. *Nutrients*, 2018. **10**(7).
108. Mearns, E.S., et al., Neurological Manifestations of Neuropathy and Ataxia in Celiac Disease: A Systematic Review. *Nutrients*, 2019. **11**(2).
109. Bashiri, H., et al., Celiac Disease and Epilepsy: The Effect of Gluten-Free Diet on Seizure Control. *Adv Clin Exp Med*, 2016. **25**(4): p. 751-4.
110. Dimitrova, A.K., et al., Prevalence of migraine in patients with celiac disease and inflammatory bowel disease. *Headache*, 2013. **53**(2): p. 344-55.
111. Fois, A., et al., Celiac disease and epilepsy in pediatric patients. *Childs Nerv Syst*, 1994. **10**(7): p. 450-4.
112. Moreno, M.L., et al., Stratification of bone fracture risk in patients with celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2004. **2**(2): p. 127-34.
113. Pantaleoni, S., et al., Bone mineral density at diagnosis of celiac disease and after 1 year of gluten-free diet. *ScientificWorldJournal*, 2014. **2014**: p. 173082.

114. Vestergaard, P. and L. Mosekilde, Fracture risk in patients with celiac Disease, Crohn's disease, and ulcerative colitis: a nationwide follow-up study of 16,416 patients in Denmark. *Am J Epidemiol*, 2002. **156**(1): p. 1-10.
115. Nisihara, R., et al., Celiac disease and fibromyalgia: Is there an association? *Rev Esp Enferm Dig*, 2016. **108**(2): p. 107-8.
116. Zipser, R.D., et al., Presentations of adult celiac disease in a nationwide patient support group. *Dig Dis Sci*, 2003. **48**(4): p. 761-4.
117. Souto-Souza, D., et al., Association between developmental defects of enamel and celiac disease: A meta-analysis. *Arch Oral Biol*, 2018. **87**: p. 180-190.
118. Casella, G., et al., Neurological disorders and celiac disease. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2016. **62**(2): p. 197-206.
119. Daynes, G., Bread and tears; naughtiness, depression and fits due to wheat sensitivity. *Proc R Soc Med*, 1956. **49**(7): p. 391-4.
120. Zylberberg, H.M., et al., Depression and insomnia among individuals with celiac disease or on a gluten-free diet in the USA: results from a national survey. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2017. **29**(9): p. 1091-1096.
121. Rubio-Tapia, A., et al., The prevalence of celiac disease in the United States. *Am J Gastroenterol*, 2012. **107**(10): p. 1538-44; quiz 1537, 1545.
122. Choung, R.S., et al., Prevalence and Morbidity of Undiagnosed Celiac Disease From a Community-Based Study. *Gastroenterology*, 2017. **152**(4): p. 830-839 e5.
123. Singh, P., et al., Global Prevalence of Celiac Disease: Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2018. **16**(6): p. 823-836 e2.
124. Fasano, A., et al., Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med*, 2003. **163**(3): p. 286-92.
125. Kim, H.S., et al., Time Trends in the Prevalence of Celiac Disease and Gluten-Free Diet in the US Population: Results From the National Health and Nutrition Examination Surveys 2009-2014. *JAMA Intern Med*, 2016. **176**(11): p. 1716-1717.
126. Choung, R.S., et al., Trends and racial/ethnic disparities in gluten-sensitive problems in the United States: findings from the National Health and Nutrition Examination Surveys from 1988 to 2012. *Am J Gastroenterol*, 2015. **110**(3): p. 455-61.
127. Krigel, A., et al., Ethnic Variations in Duodenal Villous Atrophy Consistent With Celiac Disease in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2016. **14**(8): p. 1105-11.
128. Carlsson, A.K., et al., Serological screening for celiac disease in healthy 2.5-year-old children in Sweden. *Pediatrics*, 2001. **107**(1): p. 42-5.
129. Collin, P., et al., Review article: coeliac disease in later life must not be missed. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018. **47**(5): p. 563-572.

130. Csizmadia, C.G., et al., An iceberg of childhood coeliac disease in the Netherlands. *Lancet*, 1999. **353**(9155): p. 813-4.
131. Kolho, K.L., M.A. Farkkila, and E. Savilahti, Undiagnosed coeliac disease is common in Finnish adults. *Scand J Gastroenterol*, 1998. **33**(12): p. 1280-3.
132. Maki, M., et al., Prevalence of Celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med*, 2003. **348**(25): p. 2517-24.
133. Walker, M.M., et al., Detection of celiac disease and lymphocytic enteropathy by parallel serology and histopathology in a population-based study. *Gastroenterology*, 2010. **139**(1): p. 112-9.
134. West, J., et al., Seroprevalence, correlates, and characteristics of undetected coeliac disease in England. *Gut*, 2003. **52**(7): p. 960-5.
135. Catassi, C., et al., Antiendomysium versus antigliadin antibodies in screening the general population for coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*, 2000. **35**(7): p. 732-6.
136. Tommasini, A., et al., Mass screening for coeliac disease using antihuman transglutaminase antibody assay. *Arch Dis Child*, 2004. **89**(6): p. 512-5.
137. Trevisiol, C., et al., Screening for coeliac disease in healthy blood donors at two immuno-transfusion centres in north-east Italy. *Ital J Gastroenterol Hepatol*, 1999. **31**(7): p. 584-6.
138. Volta, U., et al., High prevalence of celiac disease in Italian general population. *Dig Dis Sci*, 2001. **46**(7): p. 1500-5.
139. Catassi, C., et al., Why is coeliac disease endemic in the people of the Sahara? *Lancet*, 1999. **354**(9179): p. 647-8.
140. Barada, K., et al., Celiac disease in Middle Eastern and North African countries: a new burden? *World J Gastroenterol*, 2010. **16**(12): p. 1449-57.
141. Cummins, A.G. and I.C. Roberts-Thomson, Prevalence of celiac disease in the Asia-Pacific region. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009. **24**(8): p. 1347-51.
142. Kang, J.Y., et al., Systematic review: worldwide variation in the frequency of coeliac disease and changes over time. *Aliment Pharmacol Ther*, 2013. **38**(3): p. 226-45.
143. Rubio-Tapia, A., et al., Increased prevalence and mortality in undiagnosed celiac disease. *Gastroenterology*, 2009. **137**(1): p. 88-93.
144. Catassi, C., et al., Natural history of celiac disease autoimmunity in a USA cohort followed since 1974. *Ann Med*, 2010. **42**(7): p. 530-8.
145. Greco, L., et al., Burden of celiac disease in the Mediterranean area. *World J Gastroenterol*, 2011. **17**(45): p. 4971-8.
146. Fernandez-Fernandez, S., et al., Prevalence of Celiac Disease in a Long-term Study of a Spanish At-genetic-risk Cohort From the General Population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2019. **68**(3): p. 364-370.

147. Riestra, S., et al., Prevalence of Coeliac disease in the general population of northern Spain. Strategies of serologic screening. *Scand J Gastroenterol*, 2000. **35**(4): p. 398-402.
148. Choung, R.S., et al., Less Hidden Celiac Disease But Increased Gluten Avoidance Without a Diagnosis in the United States: Findings From the National Health and Nutrition Examination Surveys From 2009 to 2014. *Mayo Clin Proc*, 2016.
149. Gasbarrini, G., et al., Celiac disease in the 21st century: issues of under- and over-diagnosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2009. **22**(1): p. 1-7.
150. Mohammadibakhsh, R., et al., Celiac disease in Iran: a systematic review and meta-analysis. *Electron Physician*, 2017. **9**(3): p. 3883-3895.
151. Downey, L., et al., Recognition, assessment, and management of coeliac disease: summary of updated NICE guidance. *BMJ*, 2015. **351**: p. h4513.
152. Force, U.S.P.S.T., et al., Screening for Celiac Disease: US Preventive Services Task Force Recommendation Statement. *JAMA*, 2017. **317**(12): p. 1252-1257.
153. Husby, S., et al., European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012. **54**(1): p. 136-60.
154. Korponay-Szabo, I.R., R. Troncone, and V. Discepolo, *Adaptive diagnosis of coeliac disease*. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2015. **29**(3): p. 381-98.
155. Dieterich, W., et al., Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med*, 1997. **3**(7): p. 797-801.
156. Ladinsker, B., E. Rossipal, and K. Pittschieler, Endomysium antibodies in coeliac disease: an improved method. *Gut*, 1994. **35**(6): p. 776-8.
157. Kaukinen, K., et al., Resurrection of gliadin antibodies in coeliac disease. Deamidated gliadin peptide antibody test provides additional diagnostic benefit. *Scand J Gastroenterol*, 2007. **42**(12): p. 1428-33.
158. Lewis, N.R. and B.B. Scott, Meta-analysis: deamidated gliadin peptide antibody and tissue transglutaminase antibody compared as screening tests for coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2010. **31**(1): p. 73-81.
159. Giersiepen, K., et al., Accuracy of diagnostic antibody tests for coeliac disease in children: summary of an evidence report. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012. **54**(2): p. 229-41.
160. Korponay-Szabo, I.R., et al., Elevation of IgG antibodies against tissue transglutaminase as a diagnostic tool for coeliac disease in selective IgA deficiency. *Gut*, 2003. **52**(11): p. 1567-71.
161. Korponay-Szabo, I.R., et al., Missing endomysial and reticulin binding of coeliac antibodies in transglutaminase 2 knockout tissues. *Gut*, 2003. **52**(2): p. 199-204.
162. Cataldo, F., et al., Celiac disease and selective immunoglobulin A deficiency. *J Pediatr*, 1997. **131**(2): p. 306-8.

163. Cataldo, F., et al., Prevalence and clinical features of selective immunoglobulin A deficiency in coeliac disease: an Italian multicentre study. Italian Society of Paediatric Gastroenterology and Hepatology (SIGEP) and "Club del Tenue" Working Groups on Coeliac Disease. *Gut*, 1998. **42**(3): p. 362-5.
164. Collin, P., et al., Selective IgA deficiency and coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*, 1992. **27**(5): p. 367-71.
165. Clemente, M.G., et al., Immune reaction against the cytoskeleton in coeliac disease. *Gut*, 2000. **47**(4): p. 520-6.
166. Korponay-Szabo, I.R., et al., Tissue transglutaminase is the target in both rodent and primate tissues for celiac disease-specific autoantibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000. **31**(5): p. 520-7.
167. Teesalu, K., et al., Increased levels of IgA antibodies against desmin in children with coeliac disease. *Int Arch Allergy Immunol*, 2001. **126**(2): p. 157-66.
168. Teppo, A.M., et al., Antibodies to 90 kilodalton glycoprotein in childhood and adolescent celiac disease: relationship to reticulin antibodies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1987. **6**(6): p. 908-14.
169. Tuckova, L., et al., Anti-gliadin antibodies in patients with celiac disease cross-react with enterocytes and human calreticulin. *Clin Immunol Immunopathol*, 1997. **85**(3): p. 289-96.
170. Doyev, R., et al., Ultra-short Celiac Disease Is a Distinct and Milder Phenotype of the Disease in Children. *Dig Dis Sci*, 2019. **64**(1): p. 167-172.
171. Lebwohl, B., D.S. Sanders, and P.H.R. Green, *Coeliac disease*. *Lancet*, 2018. **391**(10115): p. 70-81.
172. Hopper, A.D., S.S. Cross, and D.S. Sanders, Patchy villous atrophy in adult patients with suspected gluten-sensitive enteropathy: is a multiple duodenal biopsy strategy appropriate? *Endoscopy*, 2008. **40**(3): p. 219-24.
173. Ravelli, A., et al., How patchy is patchy villous atrophy?: distribution pattern of histological lesions in the duodenum of children with celiac disease. *Am J Gastroenterol*, 2010. **105**(9): p. 2103-10.
174. Marsh, M.N., Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue'). *Gastroenterology*, 1992. **102**(1): p. 330-54.
175. Oberhuber, G., G. Granditsch, and H. Vogelsang, The histopathology of coeliac disease: time for a standardized report scheme for pathologists. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 1999. **11**(10): p. 1185-94.
176. Kuitunen, P., I. Kosnai, and E. Savilahti, Morphometric study of the jejunal mucosa in various childhood enteropathies with special reference to intraepithelial lymphocytes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 1982. **1**(4): p. 525-31.

177. Savilahti, E., A. Arato, and M. Verkasalo, Intestinal gamma/delta receptor-bearing T lymphocytes in celiac disease and inflammatory bowel diseases in children. Constant increase in celiac disease. *Pediatr Res*, 1990. **28**(6): p. 579-81.
178. Selby, W.S., et al., Lymphocyte subpopulations in the human small intestine. The findings in normal mucosa and in the mucosa of patients with adult coeliac disease. *Clin Exp Immunol*, 1983. **52**(1): p. 219-28.
179. Lancaster-Smith, M., S. Joyce, and P. Kumar, Immunoglobulins in the jejunal mucosa in adult coeliac disease and dermatitis herpetiformis after the reintroduction of dietary gluten. *Gut*, 1977. **18**(11): p. 887-91.
180. Savilahti, E., Intestinal immunoglobulins in children with coeliac disease. *Gut*, 1972. **13**(12): p. 958-64.
181. Savilahti, E., Immunoglobulin-containing cells in the intestinal mucosa and immunoglobulins in the intestinal juice in children. *Clin Exp Immunol*, 1972. **11**(3): p. 415-25.
182. Collin, P., et al., Antiendomysial and antihuman recombinant tissue transglutaminase antibodies in the diagnosis of coeliac disease: a biopsy-proven European multicentre study. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2005. **17**(1): p. 85-91.
183. Fabiani, E., et al., Anti-human versus anti-guinea pig tissue transglutaminase antibodies as the first-level serological screening test for coeliac disease in the general population. *Dig Liver Dis*, 2004. **36**(10): p. 671-6.
184. Sulkanen, S., et al., Tissue transglutaminase autoantibody enzyme-linked immunosorbent assay in detecting celiac disease. *Gastroenterology*, 1998. **115**(6): p. 1322-8.
185. Hopper, A.D., et al., Pre-endoscopy serological testing for coeliac disease: evaluation of a clinical decision tool. *BMJ*, 2007. **334**(7596): p. 729.
186. Rostami, K., et al., Sensitivity of antiendomysium and antigliadin antibodies in untreated celiac disease: disappointing in clinical practice. *Am J Gastroenterol*, 1999. **94**(4): p. 888-94.
187. Korponay-Szabo, I.R., et al., Coeliac disease case finding and diet monitoring by point-of-care testing. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005. **22**(8): p. 729-37.
188. Raivio, T., et al., Self transglutaminase-based rapid coeliac disease antibody detection by a lateral flow method. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. **24**(1): p. 147-54.
189. Farrace, M.G., et al., Presence of anti-"tissue" transglutaminase antibodies in inflammatory intestinal diseases: an apoptosis-associated event? *Cell Death Differ*, 2001. **8**(7): p. 767-70.
190. Lidar, M., et al., Infectious serologies and autoantibodies in inflammatory bowel disease: insinuations at a true pathogenic role. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. **1173**: p. 640-8.

191. Peracchi, M., et al., Tissue transglutaminase antibodies in patients with end-stage heart failure. *Am J Gastroenterol*, 2002. **97**(11): p. 2850-4.
192. Pereda, I., et al., Antitissue transglutaminase antibodies in HIV infection and effect of highly active antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2001. **27**(5): p. 507-8.
193. Sardy, M., et al., Epidermal transglutaminase (TGase 3) is the autoantigen of dermatitis herpetiformis. *J Exp Med*, 2002. **195**(6): p. 747-57.
194. Szondy, Z., et al., Transglutaminase 2 dysfunctions in the development of autoimmune disorders: celiac disease and TG2^{-/-} mouse. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 2011. **78**: p. 295-345.
195. Iversen, R., et al., Transglutaminase 2-specific autoantibodies in celiac disease target clustered, N-terminal epitopes not displayed on the surface of cells. *J Immunol*, 2013. **190**(12): p. 5981-91.
196. Simon-Vecsei, Z., et al., A single conformational transglutaminase 2 epitope contributed by three domains is critical for celiac antibody binding and effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(2): p. 431-6.
197. Husby, S., J.A. Murray, and D.A. Katzka, AGA Clinical Practice Update on Diagnosis and Monitoring of Celiac Disease-Changing Utility of Serology and Histologic Measures: Expert Review. *Gastroenterology*, 2019. **156**(4): p. 885-889.
198. Sardy, M., et al., Tissue transglutaminase ELISA positivity in autoimmune disease independent of gluten-sensitive disease. *Clin Chim Acta*, 2007. **376**(1-2): p. 126-35.
199. Rubio-Tapia, A., et al., ACG clinical guidelines: diagnosis and management of celiac disease. *Am J Gastroenterol*, 2013. **108**(5): p. 656-76; quiz 677.
200. Rostom, A., et al., The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: a systematic review. *Gastroenterology*, 2005. **128**(4 Suppl 1): p. S38-46.
201. Salmi, T.T., et al., Endomysial antibody-negative coeliac disease: clinical characteristics and intestinal autoantibody deposits. *Gut*, 2006. **55**(12): p. 1746-53.
202. Korponay-Szabo, I.R., et al., In vivo targeting of intestinal and extraintestinal transglutaminase 2 by coeliac autoantibodies. *Gut*, 2004. **53**(5): p. 641-8.
203. Koskinen, O., et al., Gluten-dependent small bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in overt and mild enteropathy coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2008. **47**(4): p. 436-42.
204. Kaukinen, K., et al., Small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits in coeliac disease without villous atrophy: a prospective and randomized clinical study. *Scand J Gastroenterol*, 2005. **40**(5): p. 564-72.
205. Kurppa, K., et al., Celiac disease without villous atrophy in children: a prospective study. *J Pediatr*, 2010. **157**(3): p. 373-80, 380 e1.

206. Salmi, T.T., et al., Immunoglobulin A autoantibodies against transglutaminase 2 in the small intestinal mucosa predict forthcoming coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006. **24**(3): p. 541-52.
207. Tosco, A., et al., Immunoglobulin A anti-tissue transglutaminase antibody deposits in the small intestinal mucosa of children with no villous atrophy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2008. **47**(3): p. 293-8.
208. Lebwohl, B., et al., Prior endoscopy in patients with newly diagnosed celiac disease: a missed opportunity? *Dig Dis Sci*, 2013. **58**(5): p. 1293-8.
209. Sanders, D.S., et al., Changing face of adult coeliac disease: experience of a single university hospital in South Yorkshire. *Postgrad Med J*, 2002. **78**(915): p. 31-3.
210. DeGaetani, M., et al., Villous atrophy and negative celiac serology: a diagnostic and therapeutic dilemma. *Am J Gastroenterol*, 2013. **108**(5): p. 647-53.
211. Taavela, J., et al., Validation of morphometric analyses of small-intestinal biopsy readouts in celiac disease. *PLoS One*, 2013. **8**(10): p. e76163.
212. Lahdeaho, M.L., et al., Celiac disease: from inflammation to atrophy: a long-term follow-up study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2005. **41**(1): p. 44-8.
213. Dixit, R., et al., Celiac disease is diagnosed less frequently in young adult males. *Dig Dis Sci*, 2014. **59**(7): p. 1509-12.
214. Jamma, S., et al., Celiac crisis is a rare but serious complication of celiac disease in adults. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2010. **8**(7): p. 587-90.
215. Babar, M.I., et al., Celiac disease and celiac crisis in children. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2011. **21**(8): p. 487-90.
216. Radlovic, N., et al., Celiac crisis in children in Serbia. *Ital J Pediatr*, 2016. **42**: p. 25.
217. Waheed, N., et al., Celiac Crisis: A Rare Or Rarely Recognized Disease. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2016. **28**(4): p. 672-675.
218. Catassi, C., et al., Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet*, 1994. **343**(8891): p. 200-3.
219. Askling, J., et al., Cancer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with celiac disease or dermatitis herpetiformis. *Gastroenterology*, 2002. **123**(5): p. 1428-35.
220. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2016*. *CA Cancer J Clin*, 2016. **66**(1): p. 7-30.
221. Brousse, N. and J.W. Meijer, Malignant complications of coeliac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2005. **19**(3): p. 401-12.
222. Young, J.I., et al., Treatment and Survival of Small-bowel Adenocarcinoma in the United States: A Comparison With Colon Cancer. *Dis Colon Rectum*, 2016. **59**(4): p. 306-15.

223. Al-Toma, A., et al., Survival in refractory coeliac disease and enteropathy-associated T-cell lymphoma: retrospective evaluation of single-centre experience. *Gut*, 2007. **56**(10): p. 1373-8.
224. Delabie, J., et al., Enteropathy-associated T-cell lymphoma: clinical and histological findings from the international peripheral T-cell lymphoma project. *Blood*, 2011. **118**(1): p. 148-55.
225. Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten, in Codex Committee on Nutrition and Foods for Special Dietary Uses. 2008.
226. Catassi, C., et al., A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr*, 2007. **85**(1): p. 160-6.
227. Gray, A.M. and I.N. Papanicolas, Impact of symptoms on quality of life before and after diagnosis of coeliac disease: results from a UK population survey. *BMC Health Serv Res*, 2010. **10**: p. 105.
228. Leffler, D.A., et al., Etiologies and predictors of diagnosis in nonresponsive celiac disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007. **5**(4): p. 445-50.
229. Abdulkarim, A.S., et al., Etiology of nonresponsive celiac disease: results of a systematic approach. *Am J Gastroenterol*, 2002. **97**(8): p. 2016-21.
230. Malamut, G., et al., Presentation and long-term follow-up of refractory celiac disease: comparison of type I with type II. *Gastroenterology*, 2009. **136**(1): p. 81-90.
231. Roshan, B., et al., The incidence and clinical spectrum of refractory celiac disease in a north american referral center. *Am J Gastroenterol*, 2011. **106**(5): p. 923-8.
232. Rubio-Tapia, A., et al., Clinical staging and survival in refractory celiac disease: a single center experience. *Gastroenterology*, 2009. **136**(1): p. 99-107; quiz 352-3.
233. Rubio-Tapia, A., et al., Severe spruelike enteropathy associated with olmesartan. *Mayo Clin Proc*, 2012. **87**(8): p. 732-8.
234. Bhat, N., et al., Olmesartan-related sprue-like enteropathy. *Indian J Gastroenterol*, 2014. **33**(6): p. 564-7.
235. Eusebio, M., et al., Olmesartan-Induced Enteropathy: An Unusual Cause of Villous Atrophy. *GE Port J Gastroenterol*, 2016. **23**(2): p. 91-95.
236. Kulai, T., et al., Duodenal Villous Atrophy in a TTG-Negative Patient Taking Olmesartan: A Case Report and Review of the Literature. *Can J Gastroenterol Hepatol*, 2016. **2016**: p. 6091571.
237. Pallav, K., et al., Noncoeliac enteropathy: the differential diagnosis of villous atrophy in contemporary clinical practice. *Aliment Pharmacol Ther*, 2012. **35**(3): p. 380-90.
238. Theophile, H., et al., Five cases of sprue-like enteropathy in patients treated by olmesartan. *Dig Liver Dis*, 2014. **46**(5): p. 465-9.

239. Machado, I., et al., Sprue-like enteropathy associated with olmesartan in a patient with villous atrophy, HLA-DQ2 genotype and antinuclear antibodies. *Rev Esp Enferm Dig*, 2016. **108**(11): p. 732-733.
240. Cammarota, G., et al., Letter: telmisartan associated enteropathy - is there any class effect? Authors' reply. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014. **40**(5): p. 570.
241. Cyrany, J., et al., Letter: telmisartan-associated enteropathy - is there any class effect? *Aliment Pharmacol Ther*, 2014. **40**(5): p. 569-70.
242. Herman, M.L., et al., A Case of Severe Sprue-Like Enteropathy Associated With Valsartan. *ACG Case Rep J*, 2015. **2**(2): p. 92-4.
243. Marthey, L., et al., Olmesartan-associated enteropathy: results of a national survey. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014. **40**(9): p. 1103-9.
244. Shiner, M. and J. Ballard, Antigen-antibody reactions in jejunal mucosa in childhood coeliac disease after gluten challenge. *Lancet*, 1972. **1**(7762): p. 1202-5.
245. Shiner, M., Ultrastructural changes suggestive of immune reactions in the jejunal mucosa of coeliac children following gluten challenge. *Gut*, 1973. **14**(1): p. 1-12.
246. Cook, W. and G. Holmes, *Coeliac disease*. 1980, London: Churchill Livingstone.
247. Myrsky, E., et al., Altered small-bowel mucosal vascular network in untreated coeliac disease. *Scand J Gastroenterol*, 2009. **44**(2): p. 162-7.
248. Castellanos-Rubio, A., et al., Angiogenesis-related gene expression analysis in celiac disease. *Autoimmunity*, 2012. **45**(3): p. 264-70.
249. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 671-5.
250. Oliveiros, J., Venny. An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams. 2007.
251. Roncoroni, L., et al., Isolation and culture of fibroblasts from endoscopic duodenal biopsies of celiac patients. *J Transl Med*, 2009. **7**: p. 40.
252. Greger, R. and U. Windhorst, *Comprehensive human physiology*. 1 ed. 1996, Berlin: Springer-Verlag. 2529.
253. Boushel, R., Metabolic control of muscle blood flow during exercise in humans. *Can J Appl Physiol*, 2003. **28**(5): p. 754-73.
254. Snipes, R.L., Intestinal absorptive surface in mammals of different sizes. *Adv Anat Embryol Cell Biol*, 1997. **138**: p. III-VIII, 1-90.
255. Jeays, A.D., et al., A framework for the modeling of gut blood flow regulation and postprandial hyperaemia. *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(9): p. 1393-8.
256. Chou, C.C. and R.W. Coatney, Nutrient-induced changes in intestinal blood flow in the dog. *Br Vet J*, 1994. **150**(5): p. 423-37.
257. Koffert, J., et al., Effects of meal and incretins in the regulation of splanchnic blood flow. *Endocr Connect*, 2017. **6**(3): p. 179-187.

258. Madsen, J.L., S.B. Sondergaard, and S. Moller, Meal-induced changes in splanchnic blood flow and oxygen uptake in middle-aged healthy humans. *Scand J Gastroenterol*, 2006. **41**(1): p. 87-92.
259. Puvi-Rajasingham, S. and C.J. Mathias, Effect of meal size on post-prandial blood pressure and on postural hypotension in primary autonomic failure. *Clin Auton Res*, 1996. **6**(2): p. 111-4.
260. Vanis, L., et al., Effects of small intestinal glucose load on blood pressure, splanchnic blood flow, glycemia, and GLP-1 release in healthy older subjects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011. **300**(6): p. R1524-31.
261. Fara, J.W., E.H. Rubinstein, and R.R. Sonnenschein, Intestinal hormones in mesenteric vasodilation after intraduodenal agents. *Am J Physiol*, 1972. **223**(5): p. 1058-67.
262. Gentilcore, D., et al., Effects of intraduodenal glucose, fat, and protein on blood pressure, heart rate, and splanchnic blood flow in healthy older subjects. *Am J Clin Nutr*, 2008. **87**(1): p. 156-61.
263. O'Donovan, D., et al., Postprandial hypotension in response to duodenal glucose delivery in healthy older subjects. *J Physiol*, 2002. **540**(Pt 2): p. 673-9.
264. Coletta, M., et al., Effect of bread gluten content on gastrointestinal function: a crossover MRI study on healthy humans. *Br J Nutr*, 2016. **115**(1): p. 55-61.
265. Sidery, M.B., I.A. Macdonald, and P.E. Blackshaw, Superior mesenteric artery blood flow and gastric emptying in humans and the differential effects of high fat and high carbohydrate meals. *Gut*, 1994. **35**(2): p. 186-90.
266. Massironi, S., et al., Effects of a Gluten-Containing Meal on Gastric Emptying and Gallbladder Contraction. *Nutrients*, 2018. **10**(7).
267. Chou, C.C. and R.H. Gallavan, *Blood flow and intestinal motility*. *Fed Proc*, 1982. **41**(6): p. 2090-5.
268. Zhang, Z.H., et al., Differences and significance of motilin, vasoactive intestinal peptide and gastrin in blood and gallbladder tissues of patients with gallstones. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2008. **7**(1): p. 58-64.
269. Myrsky, E., et al., Celiac disease IgA modulates vascular permeability in vitro through the activity of transglutaminase 2 and RhoA. *Cell Mol Life Sci*, 2009. **66**(20): p. 3375-85.
270. Kalliokoski, S., et al., Celiac Disease-Specific TG2-Targeted Autoantibodies Inhibit Angiogenesis Ex Vivo and In Vivo in Mice by Interfering with Endothelial Cell Dynamics. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e65887.
271. Martucciello, S., et al., RhoB is associated with the anti-angiogenic effects of celiac patient transglutaminase 2-targeted autoantibodies. *J Mol Med (Berl)*, 2012. **90**(7): p. 817-26.

272. Caja, S., et al., Inhibition of transglutaminase 2 enzymatic activity ameliorates the anti-angiogenic effects of coeliac disease autoantibodies. *Scand J Gastroenterol*, 2010. **45**(4): p. 421-7.
273. Wang, Z., et al., A novel extracellular role for tissue transglutaminase in matrix-bound VEGF-mediated angiogenesis. *Cell Death Dis*, 2013. **4**: p. e808.
274. Cecilio, L.A. and M.W. Bonatto, The prevalence of HLA DQ2 and DQ8 in patients with celiac disease, in family and in general population. *Arq Bras Cir Dig*, 2015. **28**(3): p. 183-5.
275. da Silva, G.B., et al., Expression of the Classical and Nonclassical HLA Molecules in Breast Cancer. *Int J Breast Cancer*, 2013. **2013**: p. 250435.
276. Tlsty, T.D. and P.W. Hein, Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. **11**(1): p. 54-9.
277. Le Bouteiller, P., et al., Soluble HLA-G and control of angiogenesis. *J Reprod Immunol*, 2007. **76**(1-2): p. 17-22.
278. Taylor, J.A., et al., A spontaneous model for autoimmune myocarditis using the human MHC molecule HLA-DQ8. *J Immunol*, 2004. **172**(4): p. 2651-8.
279. Hinz, B., et al., Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol*, 2012. **180**(4): p. 1340-55.
280. desJardins-Park, H.E., D.S. Foster, and M.T. Longaker, *Fibroblasts and wound healing: an update*. *Regen Med*, 2018. **13**(5): p. 491-495.
281. Kalluri, R. and M. Zeisberg, *Fibroblasts in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(5): p. 392-401.
282. Smith, R.S., et al., Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol*, 1997. **151**(2): p. 317-22.
283. Ge, Y., et al., Stem Cell Lineage Infidelity Drives Wound Repair and Cancer. *Cell*, 2017. **169**(4): p. 636-650 e14.
284. Plikus, M.V., et al., Regeneration of fat cells from myofibroblasts during wound healing. *Science*, 2017. **355**(6326): p. 748-752.
285. Martin, T.A., K.G. Harding, and W.G. Jiang, Regulation of angiogenesis and endothelial cell motility by matrix-bound fibroblasts. *Angiogenesis*, 1999. **3**(1): p. 69-76.
286. Furuya, S. and K. Furuya, Subepithelial fibroblasts in intestinal villi: roles in intercellular communication. *Int Rev Cytol*, 2007. **264**: p. 165-223.
287. Toyoda, H., et al., Organization of the lamina propria mucosae of rat intestinal mucosa, with special reference to the subepithelial connective tissue. *Acta Anat (Basel)*, 1997. **158**(3): p. 172-84.
288. Okada, Y., et al., Human leukocyte histocompatibility antigen class II-induced cytokines from human gingival fibroblasts promote proliferation of human umbilical vein endothelial cells: potential association with enhanced angiogenesis in chronic periodontal inflammation. *J Periodontal Res*, 2009. **44**(1): p. 103-9.

289. Higuchi, Y., et al., Gastrointestinal Fibroblasts Have Specialized, Diverse Transcriptional Phenotypes: A Comprehensive Gene Expression Analysis of Human Fibroblasts. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0129241.
290. Kurashima, Y., et al., The enzyme Cyp26b1 mediates inhibition of mast cell activation by fibroblasts to maintain skin-barrier homeostasis. *Immunity*, 2014. **40**(4): p. 530-41.
291. Nair, D.G., et al., Inflammatory cytokines promote growth of intestinal smooth muscle cells by induced expression of PDGF-Rbeta. *J Cell Mol Med*, 2014. **18**(3): p. 444-54.
292. Rinn, J.L., et al., A dermal HOX transcriptional program regulates site-specific epidermal fate. *Genes Dev*, 2008. **22**(3): p. 303-7.
293. Yamaguchi, Y., et al., Regulation of keratin 9 in nonpalmoplantar keratinocytes by palmoplantar fibroblasts through epithelial-mesenchymal interactions. *J Invest Dermatol*, 1999. **112**(4): p. 483-8.
294. Farin, H.F., J.H. Van Es, and H. Clevers, Redundant sources of Wnt regulate intestinal stem cells and promote formation of Paneth cells. *Gastroenterology*, 2012. **143**(6): p. 1518-1529 e7.
295. Kabiri, Z., et al., Stroma provides an intestinal stem cell niche in the absence of epithelial Wnts. *Development*, 2014. **141**(11): p. 2206-15.
296. Powell, D.W., et al., Mesenchymal cells of the intestinal lamina propria. *Annu Rev Physiol*, 2011. **73**: p. 213-37.
297. Roncoroni, L., et al., Extracellular matrix proteins and displacement of cultured fibroblasts from duodenal biopsies in celiac patients and controls. *J Transl Med*, 2013. **11**: p. 91.
298. Collighan, R.J. and M. Griffin, Transglutaminase 2 cross-linking of matrix proteins: biological significance and medical applications. *Amino Acids*, 2009. **36**(4): p. 659-70.
299. Barnabas, O., H. Wang, and X.M. Gao, Role of estrogen in angiogenesis in cardiovascular diseases. *J Geriatr Cardiol*, 2013. **10**(4): p. 377-82.
300. Losordo, D.W. and J.M. Isner, *Estrogen and angiogenesis: A review*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001. **21**(1): p. 6-12.
301. Sieveking, D.P., et al., A sex-specific role for androgens in angiogenesis. *J Exp Med*, 2010. **207**(2): p. 345-52.
302. Cattaneo, M.G., et al., Sex-specific eNOS activity and function in human endothelial cells. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 9612.
303. Pursiheimo, A., et al., Optimization of Statistical Methods Impact on Quantitative Proteomics Data. *J Proteome Res*, 2015. **14**(10): p. 4118-26.
304. Hayes, N.V. and W.J. Gullick, The neuregulin family of genes and their multiple splice variants in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2008. **13**(2): p. 205-14.

305. Veikkolainen, V., et al., Function of ERBB4 is determined by alternative splicing. *Cell Cycle*, 2011. **10**(16): p. 2647-57.
306. Wang, R., et al., Decreased plasma levels of neureglin-1 in drug naive patients and chronic patients with schizophrenia. *Neurosci Lett*, 2015. **606**: p. 220-4.
307. Kamezaki, A., et al., Visualization of Neuregulin 1 ectodomain shedding reveals its local processing in vitro and in vivo. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 28873.
308. Zhang, H.X., et al., Explorative study on the expression of neuregulin-1 gene in peripheral blood of schizophrenia. *Neurosci Lett*, 2008. **438**(1): p. 1-5.
309. Zeng, Z., et al., Serum neuregulin-1beta levels are positively correlated with VEGF and angiopoietin-1 levels in patients with diabetes and unstable angina pectoris. *Int J Cardiol*, 2013. **168**(3): p. 3077-9.
310. Hama, Y., et al., Level of plasma neuregulin-1 SMDF is reduced in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 2015. **587**: p. 17-21.
311. Wang, Y., et al., NRG-1 Stimulates Serum DJ-1 Increase in Breast Cancers. *Pathol Oncol Res*, 2019. **25**(1): p. 71-79.
312. Odiete, O., M.F. Hill, and D.B. Sawyer, Neuregulin in cardiovascular development and disease. *Circ Res*, 2012. **111**(10): p. 1376-85.
313. Chang, K.A., et al., Plasma soluble neuregulin-1 as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. *Neurochem Int*, 2016. **97**: p. 1-7.
314. Torres, C., et al., Prognosis Relevance of Serum Cytokines in Pancreatic Cancer. *Biomed Res Int*, 2015. **2015**: p. 518284.
315. Citri, A., K.B. Skaria, and Y. Yarden, The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res*, 2003. **284**(1): p. 54-65.
316. Cote, G.M., et al., Neuregulin-1alpha and beta isoform expression in cardiac microvascular endothelial cells and function in cardiac myocytes in vitro. *Exp Cell Res*, 2005. **311**(1): p. 135-46.
317. Lok, J., et al., Neuregulin-1 signaling in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009. **29**(1): p. 39-43.
318. Rupert, C.E. and K.L.K. Coulombe, IGF1 and NRG1 Enhance Proliferation, Metabolic Maturity, and the Force-Frequency Response in hESC-Derived Engineered Cardiac Tissues. *Stem Cells Int*, 2017. **2017**: p. 7648409.
319. Wu, L., et al., Neuregulin1-beta decreases IL-1beta-induced neutrophil adhesion to human brain microvascular endothelial cells. *Transl Stroke Res*, 2015. **6**(2): p. 116-24.
320. Xu, Z., et al., Extended therapeutic window and functional recovery after intraarterial administration of neuregulin-1 after focal ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006. **26**(4): p. 527-35.
321. Wu, C., et al., Expression and secretion of neuregulin-1 in cardiac microvascular endothelial cells treated with angiogenic factors. *Exp Ther Med*, 2018. **15**(4): p. 3577-3581.

322. Meetze, K., et al., Neuregulin 1 expression is a predictive biomarker for response to AV-203, an ERBB3 inhibitory antibody, in human tumor models. *Clin Cancer Res*, 2015. **21**(5): p. 1106-14.
323. Ludvigsson, J.F., et al., Risk of stroke in 28,000 patients with celiac disease: a nationwide cohort study in Sweden. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2012. **21**(8): p. 860-7.
324. Gui, C., et al., Neuregulin-1 Promotes Myocardial Angiogenesis in the Rat Model of Diabetic Cardiomyopathy. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **46**(6): p. 2325-2334.
325. Alizadeh, A., et al., Neuregulin-1 elicits a regulatory immune response following traumatic spinal cord injury. *J Neuroinflammation*, 2018. **15**(1): p. 53.
326. Marballi, K., et al., In vivo and in vitro genetic evidence of involvement of neuregulin 1 in immune system dysregulation. *J Mol Med (Berl)*, 2010. **88**(11): p. 1133-41.
327. Ryzhov, S., et al., ERBB signaling attenuates proinflammatory activation of nonclassical monocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017. **312**(5): p. H907-H918.
328. Vermeulen, Z., et al., Inhibitory actions of the NRG-1/ErbB4 pathway in macrophages during tissue fibrosis in the heart, skin, and lung. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017. **313**(5): p. H934-H945.
329. Zhou, Q., et al., The protective role of neuregulin-1: A potential therapy for sepsis-induced cardiomyopathy. *Eur J Pharmacol*, 2016. **788**: p. 234-240.
330. Rahmati, A., et al., Correlation of tissue transglutaminase antibody with duodenal histologic marsh grading. *Middle East J Dig Dis*, 2014. **6**(3): p. 131-6.
331. Assandri, R., et al., Pentraxin 3 Plasma Levels and Disease Activity in Systemic Lupus Erythematosus. *Autoimmune Dis*, 2015. **2015**: p. 354014.
332. Luchetti, M.M., et al., Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol*, 2000. **119**(1): p. 196-202.
333. Assandri, R., et al., Pentraxin 3 serum levels in celiac patients: evidences and perspectives. *Recent Pat Food Nutr Agric*, 2014. **6**(2): p. 82-92.
334. Assandri, R. and A. Montanelli, Pentraxin 3 and biopsy status in celiac patients. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2018. **11**(3): p. 225-232.
335. Al-Hertani, W., et al., Human newborn polymorphonuclear neutrophils exhibit decreased levels of MyD88 and attenuated p38 phosphorylation in response to lipopolysaccharide. *Clin Invest Med*, 2007. **30**(2): p. E44-53.
336. Ivarsson, M.A., et al., Differentiation and functional regulation of human fetal NK cells. *J Clin Invest*, 2013. **123**(9): p. 3889-901.
337. Nussbaum, C., et al., Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny. *J Leukoc Biol*, 2013. **93**(2): p. 175-84.

338. Sadeghi, K., et al., Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. *J Infect Dis*, 2007. **195**(2): p. 296-302.
339. Schuller, S.S., et al., Preterm neonates display altered plasmacytoid dendritic cell function and morphology. *J Leukoc Biol*, 2013. **93**(5): p. 781-8.
340. Simon, A.K., G.A. Hollander, and A. McMichael, Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci*, 2015. **282**(1821): p. 20143085.
341. Yan, S.R., et al., Role of MyD88 in diminished tumor necrosis factor alpha production by newborn mononuclear cells in response to lipopolysaccharide. *Infect Immun*, 2004. **72**(3): p. 1223-9.
342. Han, B., et al., TNFalpha-induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK. *J Immunol*, 2005. **175**(12): p. 8303-11.
343. Assandri, R., et al., Innate immune system: the no man's land where discover new biomarkers for gluten-related-disorders. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2015. **8**(2): p. 95-8.
344. Silvester, J.A. and M. Rashid, Long-term follow-up of individuals with celiac disease: an evaluation of current practice guidelines. *Can J Gastroenterol*, 2007. **21**(9): p. 557-64.
345. Poddar, U., Pediatric and adult celiac disease: similarities and differences. *Indian J Gastroenterol*, 2013. **32**(5): p. 283-8.
346. Chu, Y., et al., Pentraxin-3 in coronary artery disease: A meta-analysis. *Cytokine*, 2019. **119**: p. 197-201.
347. Dagna, L., et al., Pentraxin-3 as a marker of disease activity in Takayasu arteritis. *Ann Intern Med*, 2011. **155**(7): p. 425-33.
348. Fazzini, F., et al., PTX3 in small-vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation. *Arthritis Rheum*, 2001. **44**(12): p. 2841-50.
349. Leali, D., et al., Long pentraxin-3 inhibits FGF8b-dependent angiogenesis and growth of steroid hormone-regulated tumors. *Mol Cancer Ther*, 2011. **10**(9): p. 1600-10.
350. Presta, M., et al., Long Pentraxin-3 Modulates the Angiogenic Activity of Fibroblast Growth Factor-2. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 2327.
351. Bonacina, F., et al., Vascular pentraxin 3 controls arterial thrombosis by targeting collagen and fibrinogen induced platelets aggregation. *Biochim Biophys Acta*, 2016. **1862**(6): p. 1182-90.
352. Rodriguez-Grande, B., et al., Pentraxin 3 mediates neurogenesis and angiogenesis after cerebral ischaemia. *J Neuroinflammation*, 2015. **12**: p. 15.
353. Prinz, J.C., Human Leukocyte Antigen-Class I Alleles and the Autoreactive T Cell Response in Psoriasis Pathogenesis. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 954.

354. Scully, M., et al., Human leukocyte antigen association in idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: evidence for an immunogenetic link. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(2): p. 257-62.
355. Coppo, P., et al., Predictive features of severe acquired ADAMTS13 deficiency in idiopathic thrombotic microangiopathies: the French TMA reference center experience. *PLoS One*, 2010. **5**(4): p. e10208.
356. Yang, S., et al., ADAMTS13 activity and antigen during therapy and follow-up of patients with idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura: correlation with clinical outcome. *Haematologica*, 2011. **96**(10): p. 1521-7.
357. Kuno, K., et al., Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thrombospondin motifs as an inflammation associated gene. *J Biol Chem*, 1997. **272**(1): p. 556-62.
358. Kuno, K., et al., ADAMTS-1 cleaves a cartilage proteoglycan, aggrecan. *FEBS Lett*, 2000. **478**(3): p. 241-5.
359. Lind, T., M.A. Birch, and N. McKie, Purification of an insect derived recombinant human ADAMTS-1 reveals novel gelatin (type I collagen) degrading activities. *Mol Cell Biochem*, 2006. **281**(1-2): p. 95-102.
360. Rehn, A.P., et al., ADAMTS-1 increases the three-dimensional growth of osteoblasts through type I collagen processing. *Bone*, 2007. **41**(2): p. 231-8.
361. Rodriguez-Manzaneque, J.C., et al., Cleavage of syndecan-4 by ADAMTS1 provokes defects in adhesion. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(4): p. 800-10.
362. Sandy, J.D., et al., Versican V1 proteolysis in human aorta in vivo occurs at the Glu441-Ala442 bond, a site that is cleaved by recombinant ADAMTS-1 and ADAMTS-4. *J Biol Chem*, 2001. **276**(16): p. 13372-8.
363. Iruela-Arispe, M.L., D. Carpizo, and A. Luque, ADAMTS1: a matrix metalloprotease with angioinhibitory properties. *Ann N Y Acad Sci*, 2003. **995**: p. 183-90.
364. Luque, A., D.R. Carpizo, and M.L. Iruela-Arispe, ADAMTS1/METH1 inhibits endothelial cell proliferation by direct binding and sequestration of VEGF165. *J Biol Chem*, 2003. **278**(26): p. 23656-65.
365. Lee, N.V., et al., ADAMTS1 mediates the release of antiangiogenic polypeptides from TSP1 and 2. *EMBO J*, 2006. **25**(22): p. 5270-83.
366. Xu, Z., Y. Yu, and E.J. Duh, Vascular endothelial growth factor upregulates expression of ADAMTS1 in endothelial cells through protein kinase C signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2006. **47**(9): p. 4059-66.
367. Tan Ide, A., C. Ricciardelli, and D.L. Russell, The metalloproteinase ADAMTS1: a comprehensive review of its role in tumorigenic and metastatic pathways. *Int J Cancer*, 2013. **133**(10): p. 2263-76.

368. Krampert, M., et al., ADAMTS1 proteinase is up-regulated in wounded skin and regulates migration of fibroblasts and endothelial cells. *J Biol Chem*, 2005. **280**(25): p. 23844-52.
369. Barone, M.V., et al., Growth factor-like activity of gliadin, an alimentary protein: implications for coeliac disease. *Gut*, 2007. **56**(4): p. 480-8.
370. Barone, M.V., et al., Gliadin-mediated proliferation and innate immune activation in celiac disease are due to alterations in vesicular trafficking. *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e17039.
371. Butera, D., et al., Characterization of a reduced form of plasma plasminogen as the precursor for angiostatin formation. *J Biol Chem*, 2014. **289**(5): p. 2992-3000.
372. Falcone, D.J., et al., Macrophage formation of angiostatin during inflammation. A byproduct of the activation of plasminogen. *J Biol Chem*, 1998. **273**(47): p. 31480-5.
373. O'Reilly, M.S., et al., Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994. **79**(2): p. 315-28.
374. Chen, Y.H., et al., Anti-angiogenesis mediated by angiostatin K1-3, K1-4 and K1-4.5. Involvement of p53, FasL, AKT and mRNA deregulation. *Thromb Haemost*, 2006. **95**(4): p. 668-77.
375. Sima, J., et al., The effect of angiostatin on vascular leakage and VEGF expression in rat retina. *FEBS Lett*, 2004. **564**(1-2): p. 19-23.
376. Twining, S.S., P.M. Wilson, and C. Ngamkitidechakul, Extrahepatic synthesis of plasminogen in the human cornea is up-regulated by interleukins-1alpha and -1beta. *Biochem J*, 1999. **339 (Pt 3)**: p. 705-12.
377. Deng, X., et al., Mesalamine restores angiogenic balance in experimental ulcerative colitis by reducing expression of endostatin and angiostatin: novel molecular mechanism for therapeutic action of mesalamine. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009. **331**(3): p. 1071-8.
378. Albin, A., et al., Angiostatin anti-angiogenesis requires IL-12: the innate immune system as a key target. *J Transl Med*, 2009. **7**: p. 5.
379. Benelli, R., et al., Neutrophils as a key cellular target for angiostatin: implications for regulation of angiogenesis and inflammation. *FASEB J*, 2002. **16**(2): p. 267-9.
380. Scapini, P., et al., Generation of biologically active angiostatin kringle 1-3 by activated human neutrophils. *J Immunol*, 2002. **168**(11): p. 5798-804.
381. Aulakh, G.K., et al., Angiostatin inhibits activation and migration of neutrophils. *Cell Tissue Res*, 2014. **355**(2): p. 375-96.
382. Diosdado, B., et al., Neutrophil recruitment and barrier impairment in celiac disease: a genomic study. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007. **5**(5): p. 574-81.
383. Bjorck, S., et al., Serum cytokine pattern in young children with screening detected coeliac disease. *Clin Exp Immunol*, 2015. **179**(2): p. 230-5.

384. Lamalice, L., F. Le Boeuf, and J. Huot, Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res*, 2007. **100**(6): p. 782-94.
385. Delgado, V.M., et al., Modulation of endothelial cell migration and angiogenesis: a novel function for the "tandem-repeat" lectin galectin-8. *FASEB J*, 2011. **25**(1): p. 242-54.
386. Carmeliet, P. and R.K. Jain, Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature*, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
387. Herbert, S.P. and D.Y. Stainier, Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(9): p. 551-64.
388. Estrach, S., et al., Laminin-binding integrins induce Dll4 expression and Notch signaling in endothelial cells. *Circ Res*, 2011. **109**(2): p. 172-82.
389. Fukushi, J., I.T. Makagiansar, and W.B. Stallcup, NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. *Mol Biol Cell*, 2004. **15**(8): p. 3580-90.
390. De Smet, F., et al., Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009. **29**(5): p. 639-49.
391. Chen, W., et al., The endothelial tip-stalk cell selection and shuffling during angiogenesis. *J Cell Commun Signal*, 2019.
392. Potente, M., H. Gerhardt, and P. Carmeliet, *Basic and therapeutic aspects of angiogenesis*. *Cell*, 2011. **146**(6): p. 873-87.
393. Akpınar, M.Y., et al., Pigment Epithelium-Derived Factor Affects Angiogenesis in Celiac Disease. *Med Princ Pract*, 2019.
394. Danese, S., et al., Angiogenesis as a novel component of inflammatory bowel disease pathogenesis. *Gastroenterology*, 2006. **130**(7): p. 2060-73.
395. Alkim, C., et al., Expression of p53, VEGF, microvessel density, and cyclin-D1 in noncancerous tissue of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*, 2009. **54**(9): p. 1979-84.
396. Benelli, R., et al., Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease. *Curr Pharm Des*, 2006. **12**(24): p. 3101-15.
397. Nathan, C., Points of control in inflammation. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 846-52.
398. Chidlow, J.H., Jr., et al., Pathogenic angiogenesis in IBD and experimental colitis: new ideas and therapeutic avenues. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007. **293**(1): p. G5-G18.
399. Neuman, M.G., Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Transl Res*, 2007. **149**(4): p. 173-86.
400. Pousa, I.D., J. Mate, and J.P. Gisbert, *Angiogenesis in inflammatory bowel disease*. *Eur J Clin Invest*, 2008. **38**(2): p. 73-81.

401. Deban, L., et al., Multiple pathogenic roles of microvasculature in inflammatory bowel disease: a Jack of all trades. *Am J Pathol*, 2008. **172**(6): p. 1457-66.
402. Tykhomyrov, A.A., et al., Statin treatment decreases serum angiostatin levels in patients with ischemic heart disease. *Life Sci*, 2015. **134**: p. 22-9.
403. Vankemmelbeke, M.N., et al., Selective inhibition of ADAMTS-1, -4 and -5 by catechin gallate esters. *Eur J Biochem*, 2003. **270**(11): p. 2394-403.